

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTADE DE VETERINARIA DE LUGO



**“FORMULACIÓN DE ESPORAS DE HONGOS
PARASITICIDAS EN PELLETS
NUTRICIONALES”**

Fabián Leonardo Arroyo Balán

Grupo de Investigación COPAR (GI-2120)

Dpto. de Patoloxía Animal

Facultade de Veterinaria

Universidade de Santiago de Compostela

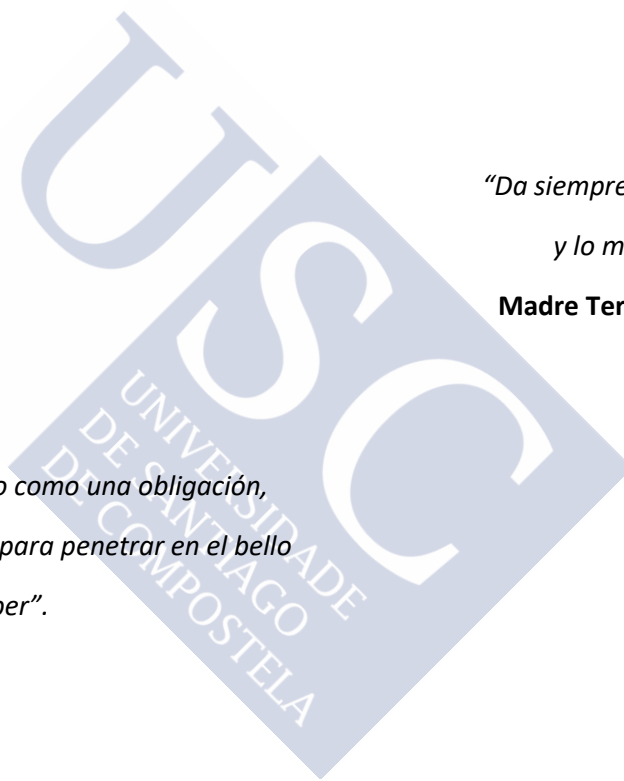
27002-Lugo

*“Nunca consideres el estudio como una obligación,
sino como una oportunidad para penetrar en el bello
y maravilloso mundo del saber”.*

Alberth Einstein

*“Da siempre lo mejor de ti;
y lo mejor vendrá...”*

Madre Teresa de Calcuta





Los Doctores María Sol Arias Vázquez, Pedro Mendoza de Gives y Adolfo Paz Silva

INFORMAN:

Que la Tesis Doctoral titulada **“Formulación de esporas de hongos parasiticidas en pellets nutricionales”**, que presenta el Graduado en Zootecnia D. FABIÁN LEONARDO ARROYO BALÁN 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 en calidad de directores, a 28 de abril de 2017.

María Sol Arias Vázquez

Pedro Mendoza de Gives

Adolfo Paz Silva

Abreviaturas

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo

CPF: Caballos positivos mediante la técnica de flotación

Dcha.: Derecha

EDTA: Ácido etilen-diamino-tetraacético

ESP: Productos antigénicos de excreción/secreción

FECR: Fecal Egg Count Reduction

HPG: Huevos por gramo de heces

Izda.: Izquierda

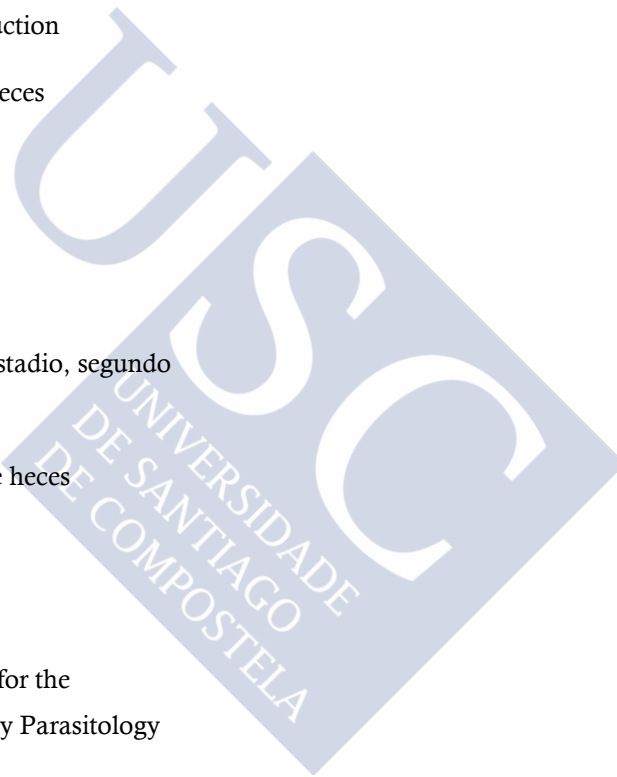
L1, L2, L3: Larva de primer estadio, segundo o tercero

OPG: Ooquistes por gramo de heces

PT: post-tratamiento

PV: peso vivo

WAAVP: World Association for the Advancement of the Veterinary Parasitology



Financiación

La actividad aquí reflejada ha sido subvencionada, en parte, mediante el Proyecto de Investigación “INCORPORACIÓN DE HONGOS PARASITICIDAS AUTÓCTONOS A PIENSOS COMERCIALES PARA PREVENIR LA INFECCIÓN DE ANIMALES DE RENTA” (AGL2012-34355; Ministerio de Economía y Competitividad; FEDER).

Origen de las imágenes incluidas en la Memoria

Todas las imágenes y esquemas de la presente Memoria son originales del autor y del Grupo de Investigación COPAR (GI-2120).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo va dedicado especialmente a mis padres **D. Laureano Arroyo Quijano y Dña. María Guadalupe Balán Ramírez**, gracias a ellos soy lo que soy, han sido, son y seguirán siendo mí el pilar de mi vida, inspiración y ejemplo a seguir. A cada uno de mis hermanos **Fredy Laureano, Martha Guadalupe, Joaquina de Monserrat, Teresita del Rocío y Luis Fernando** por formar parte de una gran familia, por creer en mí y apoyarme siempre, y por estar juntos en las buenas y en las malas. También un cariñoso recuerdo a mis sobrinos: **Ángel, Monserrat, José, Fredy, Daniel, Paola, Gerardo, Jannia, María y Danna Guadalupe**, por darme todo su amor incondicional, y a los más pequeños **María Monserrat y Luis Fernando**, gracias a cada uno.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que de un modo u otro, han contribuido a la realización del presente trabajo y en concreto:

Al gobierno del **Estado de Campeche** que a través de la **Fundación Pablo García** obtuve la beca **CONACYT-Fundación Pablo García**, para realizar estudios de posgrado.

A mis Directores de Tesis, la **Profa. Dra. María Sol Arias Vázquez**, por su gran aportación de conocimientos y experiencia en el tema, por todos los grandes momentos vividos y sobre todo su amistad; al **Dr. Pedro Mendoza de Gives** por su apoyo y amistad; al **Prof. Dr. Adolfo Paz-Silva**, por la gran oportunidad que me dio de pertenecer a este gran grupo de investigadores, por todo lo brindado hacia mi persona, en cuanto a conocimientos a la investigación y también musicales,

A la **Profa. Dra. Rita Sánchez-Andrade**, por su paciencia y por sus muy acertados consejos; al **Dr. José Luis Suárez García de Paredes**, doy gracias a la vida por darme la oportunidad de conocer a un gran apasionado de los animales y amante de su trabajo.

A los Catedráticos del Departamento de Patología Animal, **Profa. Dra. M^a Patrocinio Morrondo Pelayo y Prof. Dr. Pablo Díez Baños**, por brindarme la oportunidad de trabajar en la Unidad de Parasitología de esta Facultad.

A los Profesores **Dres. Rosario Panadero Fontán, Ceferino López Sáñez y Pablo Díez Fernández**, por su disponibilidad y colaboración dentro de la Unidad de Parasitología.

A La **Dra. Cristiana Cazapal Monteiro**, por su amistad, carisma y buenos momentos que hemos compartido en el laboratorio y en campo. Al **Dr. Jaime Sanchís** y al **Dr. Rodrigo Bonilla** por su amistad y sus buenos consejos que me ayudaron a no desanimarme en el final.

A **Silvia Miguélez** por la aportación de sus conocimientos y ayuda en este trabajo, por su alegría, compañerismo y buena convivencia. Al buen **José Ángel Hernández Malagón** gracias por su amistad y apoyo incondicional. A **Esther Navarro** por su amistad dentro y fuera del laboratorio.

A mis amigos de Cuernavaca (Morelos, México), y en especial a la **Dra. María Eugenia López Arellano** y a la investigadora **Rosa Valero Cos**, por su valiosísima

A **Andreu** por su gran amistad y apoyo a mi llegada a este departamento. Para mis compañeras de Enfermedades Parasitarias, **Dra. Eva Cabanelas**, que contagiaba alegría con su sonrisa; de igual forma a la **Dra. Ana Pérez** por los buenos momentos compartidos dentro del laboratorio.

A la **Dra. Silvina Fernández** y **Dr. Carlos Saumell**, de la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (Tandil, Argentina) por recibirme en su Facultad y hacerme parte de la familia de parasitólogos argentinos.

A mis compañeros de trabajo de **Seaboard Foods**, en especial al grupo denominado "**Borrachos sin Fronteras**", a cada uno de ellos por hacerme más amena la estancia y la espera.

A todos y cada uno de ustedes, MUCHÍSIMAS GRACIAS.

TABLA DE CONTENIDO

1.- ANTECEDENTES.....	11
1.1. HELMINTOS DEL APARATO DIGESTIVO FRECUENTES EN ANIMALES EN PASTOREO	12
1.1.1. Trematodos	13
1.1.2. Nematodos ascáridos.....	18
1.1.3. Nematodos estrongilados	22
1.2. LUCHA FRENTE A LOS PARÁSITOS	27
1.2.1. Control farmacológico	27
1.2.2. Principales medidas de prevención de helmintosis digestivas.....	29
1.2.3. Métodos de control alternativos.....	31
1.3. HONGOS PARASITICIDAS.....	33
1.3.1. Hongos parasiticidas en control biológico.....	35
1.3.2. Especies de hongos con actividad parasiticida	36
1.3.3. Ensayos con hongos parasiticidas	46
1.3.4. Formulaciones comerciales de hongos con actividad parasiticida.....	51
1.3.5. Efectos adversos de hongos con actividad parasiticida.....	52
1.4. PRODUCCIÓN DE HONGOS CON ACTIVIDAD PARASITICIDA	54
1.4.1. Medios de cultivo sólidos	55
1.4.2. Medios de cultivo líquidos	58
1.4.3. Medios de cultivo mixtos.....	60
1.5. FORMAS DE ADMINISTRACIÓN DE ESPORAS DE HONGOS PARASITICIDAS	62
1.5.1. Por vía oral.....	62
1.5.2. Directamente sobre el suelo	65
1.6. RETOS A RESOLVER EN EL EMPLEO DE HONGOS PARASITICIDAS.....	66
2.- OBJETIVOS	69
3.- UNIDAD TEMÁTICA.....	71
4.- PUBLICACIONES.....	77
4.1. PUBLICACIÓN N° 1.	78
Effect of the filamentous fungus <i>Mucor circinelloides</i> on the development of eggs of the rumen fluke <i>Calicophoron daubneyi</i> (Paramphistomidae). <i>Journal of Parasitology</i> . 2017 Feb 6. doi: 10.1645/16-76	78
4.2. PUBLICACIÓN N° 2.	79
The capability of the fungus <i>Mucor circinelloides</i> to maintain parasitocidal activity after the industrial feed pelleting enhances the possibilities of biological control of livestock parasites. <i>Biological Control</i> 2016. 92: 38–44.	79
4.3. PUBLICACIÓN N° 3.	80

Formulating *Duddingtonia flagrans* in nutritional pellets for the sustainable control of equine strongyles. Journal of Science, Technology and Environment. 2015. ISSN: 2227-9296. Volume 5, Issue 1, Article ID 3000249, 16 pages..... 80

5.- DISCUSIÓN GENERAL	82
6.- CONCLUSIONES	91
7.- CONCLUSIONS	93
8.- RESUMEN	95
9.- SUMMARY	101
10.- BIBLIOGRAFÍA	106





I.- ANTECEDENTES



1.1. HELMINTOS DEL APARATO DIGESTIVO FRECUENTES EN ANIMALES EN PASTOREO



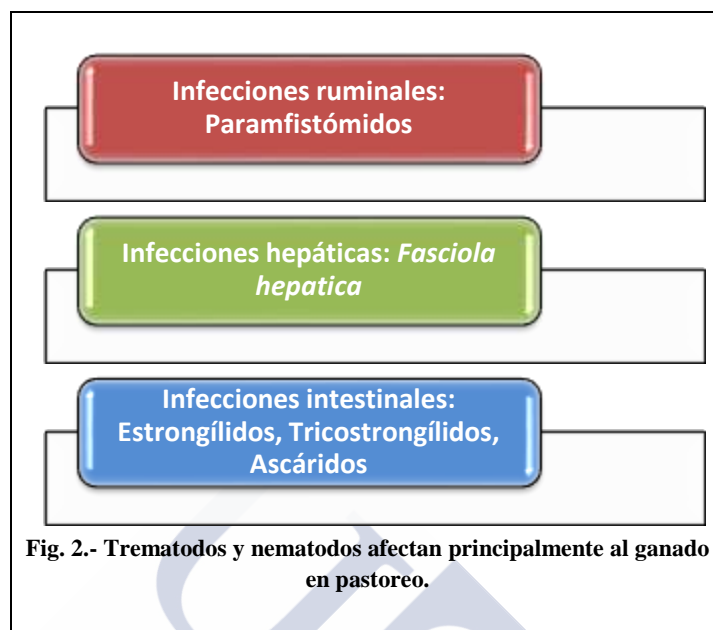
Fig. 1.- Los sistemas en pastoreo aseguran la nutrición de los animales.

Una parte importante del esfuerzo que dedican los ganaderos para obtener una rentabilidad adecuada de su actividad se orienta al control de parásitos que afectan a los animales. Los países desarrollados, disponen de antihelmínticos de alta eficacia y las condiciones higiénico-sanitarias y de manejo son aceptables, de manera que las parasitosis clínicas son cada vez menos frecuentes, y el uso de estos fármacos (muy generalizado) se dirige fundamentalmente a evitar las pérdidas económicas asociadas a

infecciones subclínicas (Nielsen *et al.*, 2007; Kenyon y Jackson, 2012). Entre estas, destacan por su frecuencia e importancia las helmintosis gastrointestinales, que afectan en especial a los animales en pastoreo debido a que la mayoría de estos parásitos desarrollan una fase de su ciclo biológico en el medio, donde alcanzan los estadios infectivos que al ser ingeridos con el alimento, se situarán como adultos en diferentes localizaciones en los hospedadores definitivos (Tabla 1) (Fig. 1).

Tabla 1.- Localización de los principales helmintos gastrointestinales en animales en pastoreo.		
	Juveniles	Adultos
<i>Fasciola hepatica</i>	Parénquima hepático	Conductos biliares
<i>Paramphistomum spp.</i>	Intestino delgado y abomaso	Rumen y retículo
Estronglidos	Distintas localizaciones	Ciego y colon
Tricostronglidos	Mucosa intestinal	Abomaso e intestino
Ascáridos	Hígado-pulmón	Intestino delgado

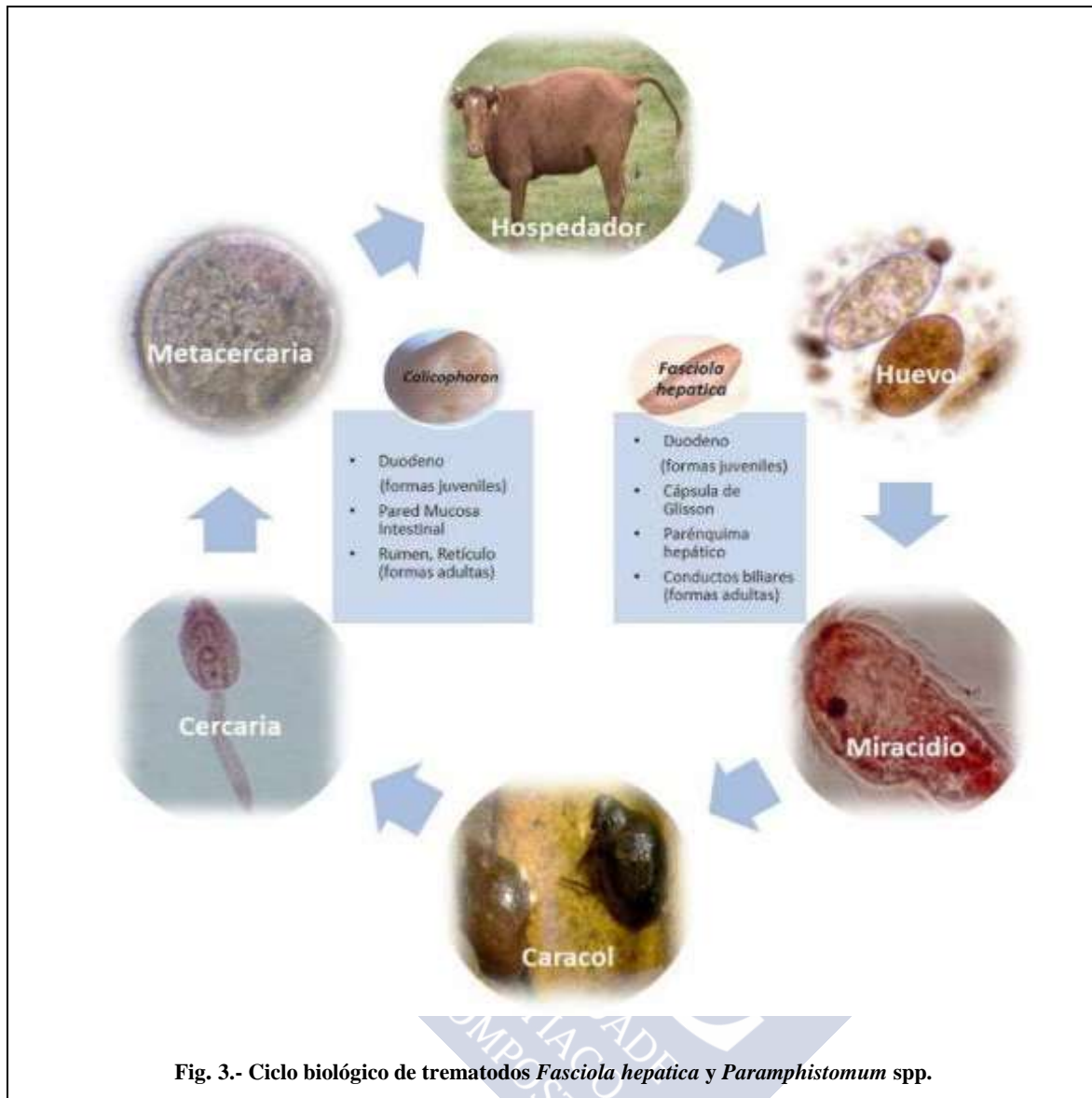
Las infecciones más importantes por helmintos gastrointestinales están causadas por trematodos y nematodos (Fig. 2).



1.1.1. Trematodos

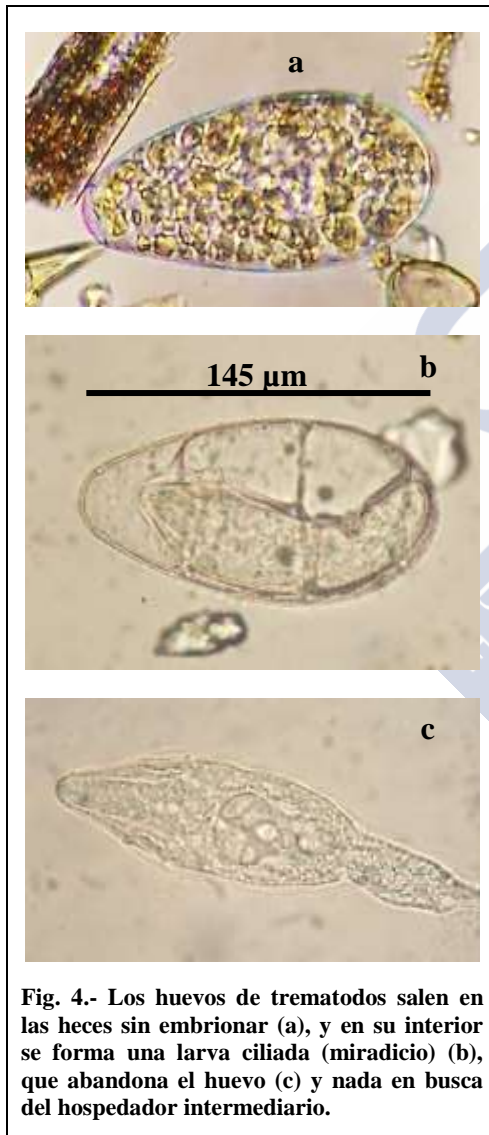
a) Ciclo biológico de *Fasciola hepática* y *Paramphistomum* spp.

Las infecciones parasitarias más frecuentes en los animales que pastan en prados húmedos, especialmente en grandes y pequeños rumiantes, son las trematodosis causadas por *Fasciola hepática* y *Paramphistomum* spp. Ambos tienen una fase externa del ciclo similar, y utilizan como hospedadores intermediarios caracoles del género *Galba* principalmente, aunque los paramfistómidos también pueden emplear moluscos acuáticos de los géneros *Bulinus*, *Glyptarissus*, *Indoplanorbis* o *Planorbis* (Szmídt-Adjídé *et al.*, 2000). Para que el ciclo se perpetúe es necesario que los huevos de los trematodos caigan en los hábitats del hospedador intermediario (Fig. 3).



Los parámetros climáticos que más influyen sobre la supervivencia de los huevos en el ambiente son la temperatura y la humedad. Para que los huevos prosigan su desarrollo, deben liberarse de las heces, ya que en caso contrario no evolucionan aunque sean óptimas las condiciones ambientales (Rowcliffe y Ollerenshaw, 1960). Sin embargo, pueden permanecer viables en las heces desde unas semanas hasta varios meses, dependiendo del grado de humedad de la materia fecal.

La temperatura favorable para el desarrollo del miracidio comprende entre 10°-30°C, pero valores inferiores a 10°C impiden el desarrollo de los huevos, y a medida que aumenta la temperatura se acorta el tiempo necesario para el desarrollo óptimo de los miracidios (Soulsby, 1987). A 12°C se requieren 60 días; a 15°C unos 40 días y a 26°C alrededor de 12 días para que en el interior del huevo se forma una larva ciliada, el miracidio (Fig. 4).



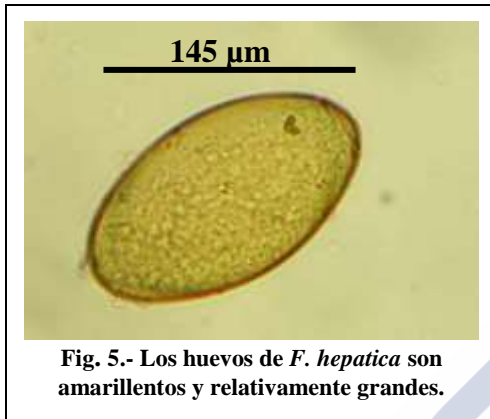
En condiciones naturales, los huevos de *F. hepatica* permanecen viables durante bastante tiempo a temperaturas bajas, e incluso sobreviven al invierno si las temperaturas mínimas no son extremas; posteriormente, durante la primavera y ante condiciones ambientales favorables, continuarán su desarrollo. El efecto de la temperatura sobre el desarrollo del huevo está asociado a una humedad mínima constante que le permita estar rodeado de una película de agua (Luzón-Peña, 1991).

La eclosión de los huevos en medio líquido favorece la liberación de los miracidios, que levantan el opérculo y salen en busca del caracol; si lo encuentran, penetran a través de su pie y se multiplican asexualmente, pudiendo un solo miracidio dar lugar a cientos de cercarias, que dejan el caracol y nadan libremente próximas a la superficie del agua, para enquistarse en las plantas del entorno formando las metacercarias. La duración de la fase externa en condiciones óptimas de temperatura y humedad es de 2-4 semanas (Andrews, 1999).

Las metacercarias de ambos parásitos ingeridas por el hospedador definitivo con la hierba o el agua de bebida se

desenquistan en el duodeno, y a partir de este momento el ciclo endógeno de estos trematodos es muy distinto. Las adolecarias de *F. hepatica* atraviesan la pared intestinal y emigran a través del parénquima hepático hasta los conductos biliares (y vesícula biliar en las especies animales que la tienen), en donde maduran a adultos de color pardo rojizo, con forma de hoja, y que miden aproximadamente 30 x 13 mm.

Las formas juveniles de los paramfistomos penetran en la submucosa del intestino, allí crecen durante 6-8 semanas, y entonces comienzan una migración retrógrada hasta llegar al abomaso y posteriormente al rumen, en cuyo lumen se asientan definitivamente entre las microvellosidades para transformarse en adultos (Rojo y Ferre, 1999).



En ambos trematodos, los huevos salen al exterior mezclados con las heces del hospedador. *F. hepatica* produce gran cantidad de huevos (3000-5000 al día) amarillentos, operculados y relativamente grandes (130-150 x 60-90 μm) (Fig. 5); los de *Paramphistomum* son muy parecidos, pero de color gris pálido porque no están teñidos por la bilis (Muro-Álvarez y Ramajo-Martín, 1999).

b) Epidemiología de trematodos *F. hepatica* y *Paramphistomum* spp.

La presencia de estas infecciones está asociada a ambientes húmedos, con abundante vegetación y temperaturas moderadas, que favorecen el desarrollo del ciclo externo. En general, el máximo riesgo coincide con las estaciones lluviosas, que benefician la multiplicación y propagación de los caracoles y la disgregación de las heces, lo que facilita la dispersión de los huevos de los trematodos y en consecuencia que se origine mayor cantidad de metacercarias en las zonas encharcadas.

La temperatura regula la estacionalidad de la infección, y la humedad determina su severidad. Cuando la temperatura media día/noche no desciende de 10°C y hay suficiente humedad, los moluscos pueden mantenerse activos durante todo el año. Así, cuanto mayor sea su número en los pastos, más posibilidades de éxito tendrán los ciclos de *F. hepatica* y de *Paramphistomum*. En otoño-invierno, con temperaturas máximas por debajo de 20°C y mínimas inferiores a 10°C, los caracoles tardan entre 4-8 meses en emitir cercarías (Rondelaud *et al.*, 2013).

La resistencia de las metacercarias en el medio externo es muy elevada, soportando mejor el invierno que el verano, debido a que el calor, la desecación y la luz directa del sol las hacen inviables. La cantidad de metacercarias en el pasto (y por tanto el riesgo de infección de los animales) aumenta

al final de la primavera y principio del verano, coincidiendo con las cercarias emitidas por los caracoles infectados que hibernaron bajo el lodo, y por los que se infectan en primavera. Se conoce que tras primaveras y veranos muy lluviosos, los brotes de fasciolosis se manifiestan con más intensidad en el otoño. En regiones con precipitaciones abundantes durante todo el año y sin grandes variaciones de temperatura, se observan las mayores prevalencias e intensidades de eliminación de huevos en otoño e invierno, y las más bajas en verano (Rojo y Ferre, 1999).

c) Importancia económica de las trematodosis

Se describen 2 tipos de pérdidas provocadas por trematodos parásitos. Las pérdidas más evidentes para ganaderos y veterinarios son las *directas*, que engloban bajas y confiscación de hígados de bovinos en el matadero debido a la presencia de fasciolas o lesiones causadas por ellas, aunque en realidad constituyen una pequeña parte de las pérdidas atribuibles a las trematodosis (Benavides, 1996; Becerra, 2001). Existen otras mermas difíciles de apreciar, *indirectas*, que están relacionadas con la disminución de la productividad por reducción en la ganancia de peso, de producción de leche, menor eficiencia en la conversión alimenticia, o reducción de la fertilidad (Olaechea, 2004).

Algunos estudios sostienen que la infección por *F. hepatica* provoca disminución del apetito, estableciéndose que las variaciones en la ganancia diaria de peso son superiores al 6% si se trata de infecciones leves (hasta 50 fasciolas), y que pueden llegar al 28% en animales infectados con más de 1000 metacercarias (Hope-Cawdery *et al.*, 1977). Estas pérdidas se corroboran cuando se administran tratamientos fasciolicidas, que se traducen en incrementos de peso entre 0,2 y 0,7 Kg semanales en bovinos con cargas parasitarias de 30-80 fasciolas (Dargie, 1987). Diversos estudios coinciden en destacar que en terneros en pastoreo la ganancia de peso aumenta un 8-18% cuando reciben un fasciolicida, llegando incluso a estimarse que los beneficios económicos después del tratamiento superan en 4,2 veces el coste de dicho tratamiento (Genicot *et al.*, 1991). Algunos estudios cifran la ganancia de peso de 8,2-10,8 Kg en bovinos tratados, otras investigaciones indican que los terneros nacidos de progenitoras desparasitadas con fasciolicidas pesaban entre 13,6 y 20,4 Kg más que los paridos por vacas no tratadas (Kaplan, 1994; Marley *et al.*, 1996).

La infección por *F. hepatica* también tiene un efecto deletéreo sobre la producción y la calidad de la leche. Se ha demostrado que en vacas con fasciolosis la producción de leche puede disminuir hasta

un 14%, y después de un tratamiento fasciolicida se puede recuperar hasta un 8%. Teniendo en cuenta el conjunto de la lactación, se han asociado disminuciones de la producción láctea de 90-300 Kg/lactación en vacas con fasciolosis. También se ha relacionado esta trematodosis con la disminución de sólidos totales en la leche, lo que da lugar a una menor calidad, y por ello un precio de venta más bajo (Torgerson y Claxton, 1999; Mason y McKay, 2006).

En general, la paramfistomosis suele cursar como una enteritis hemorrágica importante en rumiantes jóvenes (terneros, cabritillos y corderos), ocasionándoles alteraciones digestivas y hemáticas que pueden llegar a provocarles la muerte (Silvestre *et al.*, 2000). Existe evidencia de que estas alteraciones se deben principalmente a los trematodos juveniles, y persisten incluso cuando las formas adultas alcanzaron su localización definitiva (Fuentes *et al.*, 2015). En vacas adultas la paramfistomosis también produce pérdidas económicas por disminución de la conversión alimenticia, pérdida de peso corporal y menos producción de leche (Kathoon *et al.*, 2003).

1.1.2. Nematodos ascáridos

Los ascáridos que afectan a herbívoros son *Parascaris* spp. (equinos) y *Toxocara vitulorum* (bovinos). Los nematodos adultos se localizan preferentemente en el intestino delgado, concretamente en duodeno y yeyuno proximal, pero a veces también se pueden observar en el estómago o en el ciego (Southwood *et al.*, 1996).

a) Ciclo biológico

Las hembras eliminan cientos de miles de huevos al día que salen al exterior sin embrionar junto con las heces (Fig. 6). Son casi esféricos, de color marrón y de cubierta externa rugosa. En presencia de condiciones climáticas favorables (temperatura moderada, humedad notable), en el interior de los huevos se completan las fases de embrión, mórula, larva 1 (L1) y L2. El tiempo necesario para la embrionación es de entre 3-6 semanas en función de la temperatura y la humedad.

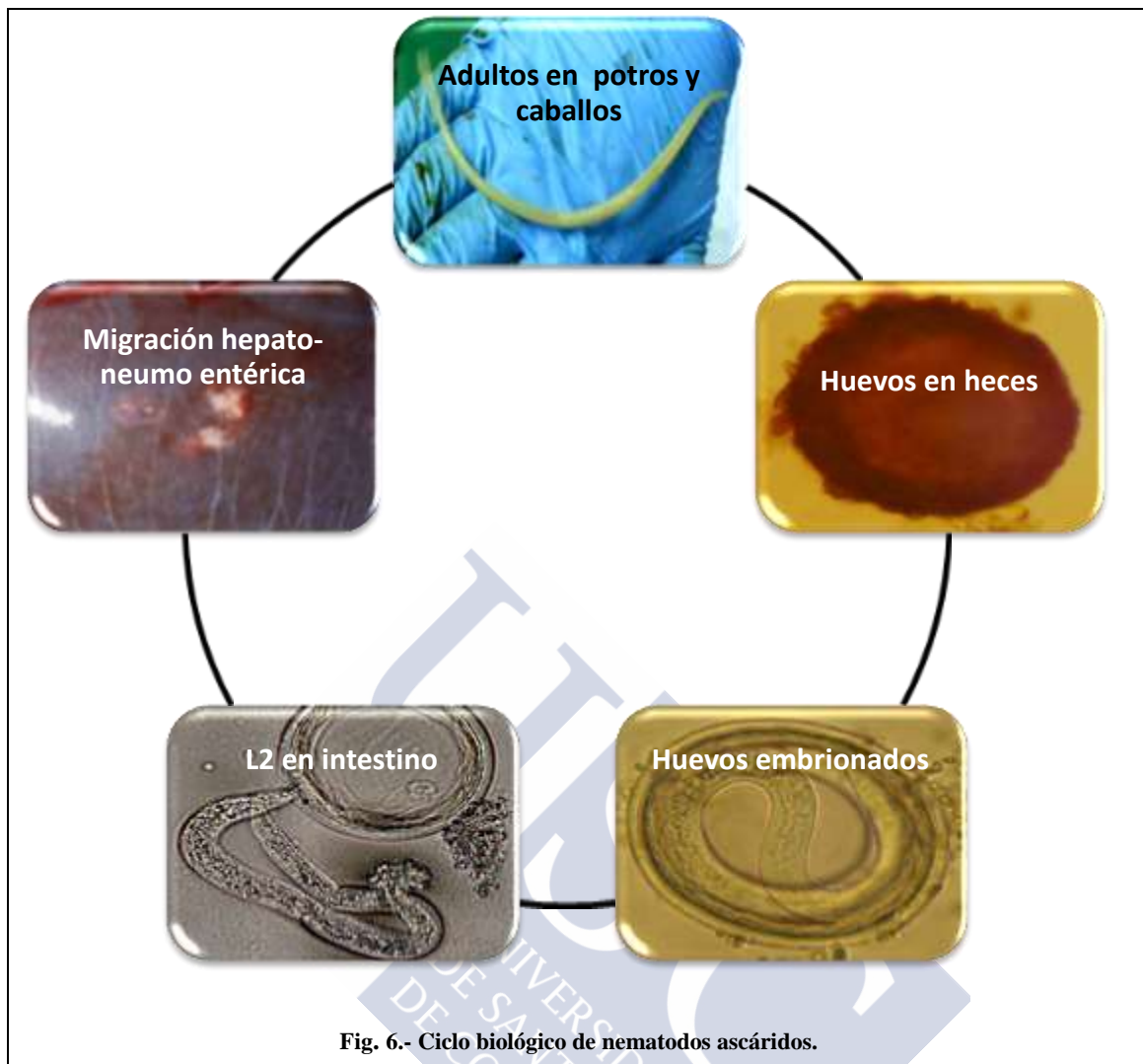


Fig. 6.- Ciclo biológico de nematodos ascáridos.

La infección tiene lugar por la ingestión de huevos que contienen L2 (Cruz *et al.*, 2012). En equinos, después de llegar al estómago y pasar al intestino, las L2 emergen del huevo y penetran la mucosa intestinal, transformándose en L3. que migran a través de vasos venosos o linfáticos y llegan al hígado (2-7 días post-infección).

A continuación, las L3 alcanzan la vena cava y se dirigen hacia los pulmones, en donde rompen las membranas alveolares y penetran en las vías aéreas. Transcurridas alrededor de 2 semanas, llegan hasta la faringe (excreciones mucosas, tos) y son deglutidas en el esófago, alcanzando el estómago y después el intestino delgado, donde se transforman en L4, L5 y finalmente en adultos (Carter *et al.*, 2011).

El periodo de prepatencia en potros dura entre 10 y 16 semanas, y no es raro observar eliminaciones masivas de huevos en animales de 10-12 semanas de edad (Lindgren *et al.*, 2008). En los potros no se produce infección transplacentaria ni galactógena (Meana y Rojo, 2010).

En el caso de *T. vitulorum*, el modo de infección de los animales es diferente en función de la edad. Los bovinos adultos se infectan ingiriendo huevos embrionados, y una vez liberadas las larvas en el intestino, comienzan la migración somática, similar a la de équidos, pero no llegan a completar la transformación en adultos porque se enquistan en tejidos y órganos en donde permanecen en hipobiosis. Si el hospedador es una hembra, algunas larvas enquistadas reanudan la migración coincidiendo con la gestación y pueden atravesar la placenta e infectar al ternero antes de que nazca, aunque la mayor migración de las larvas se produce hacia la glándula mamaria, y los recién nacidos se infectan en las 2-3 primeras semanas de vida. Las larvas entonces se desarrollan sin ningún tipo de migración; a los 15 días aproximadamente ya están formados los ascáridos adultos, y a los 20 días las hembras fecundadas comienzan la eliminación de huevos. En los bovinos, los ascáridos adultos viven unos pocos meses, en cambio las larvas somáticas son capaces de sobrevivir durante años (Meana y Rojo, 2013). Van Der Steen *et al.* (2014) señalaron que las larvas somáticas pueden permanecer en las vacas durante años e infectar a los terneros a través de la leche durante tres partos consecutivos, constituyendo en opinión de estos autores la única vía de infección.

b) Epidemiología de las ascariosis

El desarrollo exógeno de los huevos necesita condiciones favorables de temperatura y humedad, deteniéndose por debajo de 5°C o por encima de 35°C. Con buenas condiciones de humedad (> 65%) y oxigenación, la célula que contiene el huevo evoluciona hasta larva infectiva en 18-20 días. En condiciones de laboratorio, el desarrollo de las L2 de *P. equorum* tiene lugar en 37, 13, 8, 6, 5 y 4 días a las temperaturas de 15, 20, 25, 28 y 30°C, respectivamente (cit. Borchert, 1994). Una vez embrionados, los huevos de los ascáridos son muy resistentes y pueden permanecer infectivos incluso durante años (Kim *et al.*, 2012).

La fermentación y la putrefacción detienen el desarrollo de los huevos, que se reanuda si mejoran las condiciones de oxigenación, de ahí que la utilización del purín como abono pueda contribuir a la

diseminación de la infección, y únicamente la exposición prolongada a la luz ultravioleta resulta eficaz para destruir los huevos. Si se utiliza purín de porcino que vehicule *Ascaris suum* para la fertilización de prados aprovechados por ganado vacuno, los terneros podrían sufrir un cuadro de *larva migrans* (Meana y Rojo, 2013).

La falta de higiene y el hacinamiento de los animales favorecen la contaminación masiva del ambiente con huevos de ascáridos. El desequilibrio de la ración provoca que en ocasiones los animales adopten hábitos de *pica* que también favorecen la ascaridiosis. Aunque se asocia la infección con repuntes que suelen aparecer en primavera, teniendo en cuenta la gran resistencia de los huevos, las condiciones climáticas no deberían de influir demasiado, y estos picos de eliminación estarían más relacionados con la época de partos.

Son numerosos los estudios que asocian las infecciones por ascáridos con sus hospedadores más jóvenes. Bucknell *et al.* (1995) comprobaron, mediante necropsia, que solo los potros menores de 2 años tenían ascáridos. Estudios realizados mediante coprología demostraron la existencia de significación estadística al considerar la edad de los animales (Fikru *et al.*, 2005; Von Samson-Himmelstjerna *et al.*, 2007; Francisco *et al.*, 2009). Sin embargo, no se ha encontrado relación entre la intensidad y prevalencia de parasitación por helmintos, y el sexo o la raza de los caballos (Fikru *et al.*, 2005).

En diferentes regiones se han descrito infecciones por *P. univalens* que llegan a obstruir completamente el intestino delgado (Cribb *et al.*, 2006). Por el contrario, en ganado vacuno, las infecciones por *T. vitulorum* son endémicas en regiones con clima tropical y subtropical (Roberts, 1993), y escasa en países con clima más templado, como Bélgica (Goossens *et al.*, 2007; Borgsteede *et al.*, 2012).

1.1.3. Nematodos estrogilados

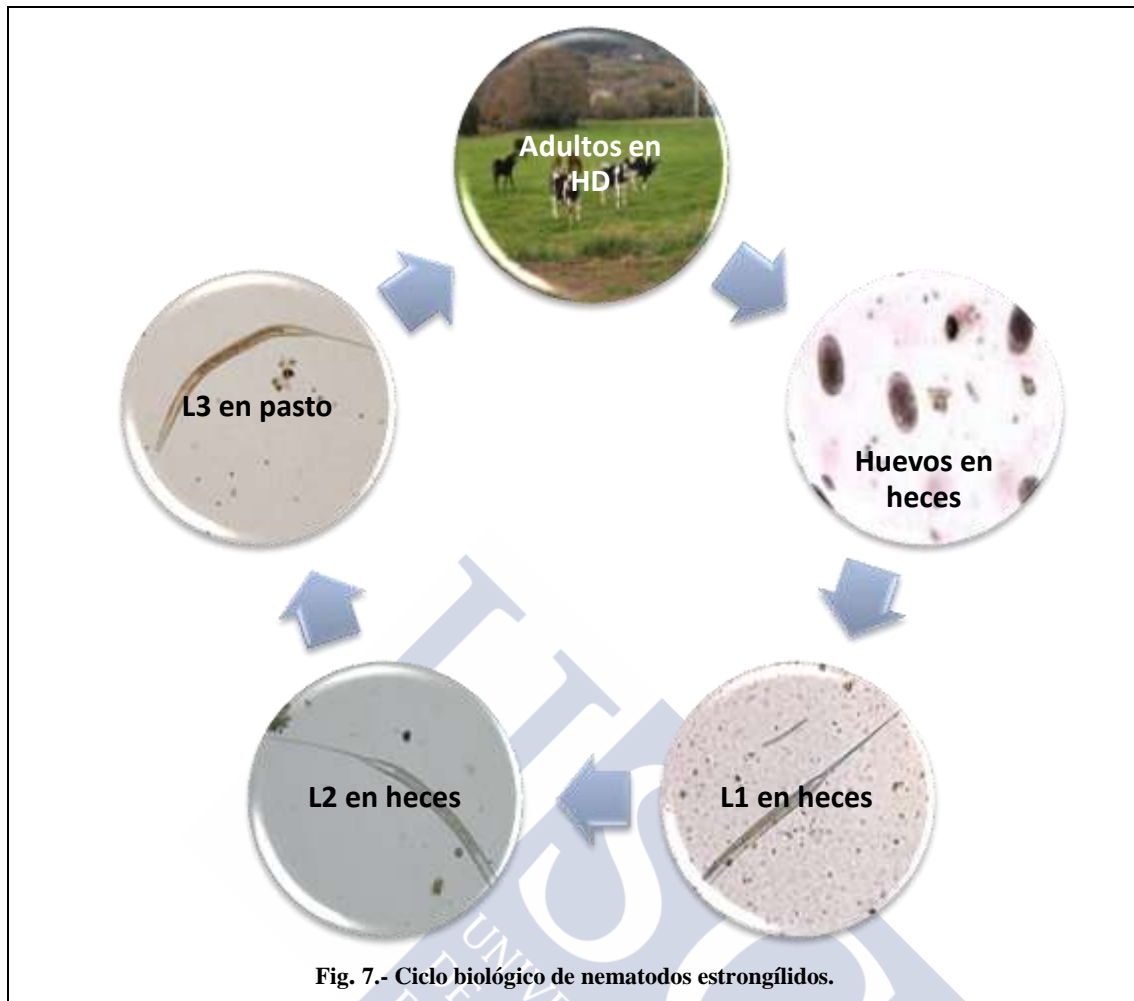
Las gastroenteritis parasitarias causadas por distintos géneros de nematodos estrogilidos y tricostrongilidos afectan a la práctica totalidad de los animales en pastoreo. En los rumiantes son más abundantes los tricostrongilidos y en los équidos predominan los estrogilidos. Su ciclo vital requiere una fase en el medio externo, donde se desarrollan distintos estadios larvarios, y otra en el hospedador, donde el nematodo alcanza el estadio adulto.

a) Ciclo biológico

En la fase exógena, los huevos eliminados por las hembras de los diferentes nematodos gastrointestinales llegan al suelo con las heces (Fig. 7). En condiciones ambientales propicias (humedad relativa >80%, temperatura de 20-35°C y presencia de oxígeno) en su interior se forman las larvas 1 (L1), que rompen el huevo (excepto *Nematodirus* spp.) y permanecen en las heces creciendo y mudando a L2 y L3. Las larvas L3 son las fases infectivas, su capacidad de migración horizontal y vertical les permite salir de las heces y ascender a la vegetación, favoreciendo que los hospedadores las ingieran cuando pastan (Fleurance *et al.*, 2007).

La fase endógena de los tricostrongilidos de los rumiantes comienza cuando las L3 llegan al tracto digestivo para localizarse cada género en su sitio predilecto (abomaso, intestino delgado o intestino grueso), y penetran entre las vellosidades intestinales o en las glándulas gástricas para mudar otras dos veces. Después tienen dos alternativas: la primera es penetrar la submucosa y permanecer en estado de latencia o hipobiosis, la segunda es transformarse en nematodos adultos. Los machos y hembras copulan, y las hembras grávidas eliminan huevos para iniciar nuevamente el ciclo biológico.

En función del tamaño que alcanzan los estrogilidos adultos de los caballos, se conocen como pequeños y grandes estrogilos. Los *grandes estrogilos* (subfamilia *Strongylinae*) realizan migraciones intraorgánicas complicadas antes de llegar al intestino grueso en donde se transforman en adultos (Corning, 2009). Los *pequeños estrogilos* o *ciatostominos* (subfamilia *Cyathostominae*) no realizan migraciones intraorgánicas, las larvas únicamente se introducen en la pared del intestino grueso y después regresan a la luz para transformarse en adultos (Matthews *et al.*, 2004).



A diferencia de los grandes estróngilos, las larvas de ciatostominos pueden inhibirse en la mucosa y submucosa de intestino grueso (ciego y colon) (Bairden *et al.*, 2006), y una vez en esta localización pueden continuar su desarrollo o permanecer enquistadas como larvas 4 durante varios años. No se conocen bien todos los factores implicados en la hipobiosis larvaria, aunque se sabe que se produce si las L3 soportan en el pasto temperaturas inferiores a 5°C durante varios días; otros factores que influyen son la predisposición genética de algunas cepas y la edad del hospedador. Los nematodos cuyas larvas entran en hipobiosis son *Ostertagia* en bovinos, *Teladorsagia*, *Cooperia* y *Haemonchus* en ovinos, y ciatostominos en caballos (Quiroz, 2005).

b) Epidemiología de las estrongilidosis y tricostrongilidosis

Los nematodos gastrointestinales están ampliamente distribuidos en aquellas regiones donde los pastos constituyen la base alimentaria de los animales, y las condiciones climáticas, principalmente la temperatura y la humedad, favorecen la eclosión y el desarrollo de los huevos hasta larvas infectivas durante todo el año (Villar, 1997; Quiroz, 2005).

Benavides (1996) estudió las preferencias climáticas de algunos nematodos de rumiantes, y comprobó que *Ostertagia* y *Nematodirus* prefieren las zonas frías y se localizan en regiones templadas y subsolares; *Haemonchus*, *Strongyloides* y *Oesophagostomum* se adaptan mejor a las regiones cálidas, y que la distribución de *Trichostrongylus* y *Cooperia* es uniforme en todo el mundo. En estudios realizados en España, García-Romero *et al.* (1994) y Almería *et al.* (2000) observaron que las infecciones más importantes correspondían al género *Ostertagia*, seguido de *Trichostrongylus*, *Haemonchus*, *Cooperia* y *Nematodirus*. *Ostertagia* presentó una marcada tendencia estacional, con mayor persistencia en primavera y otoño.

La intensidad de eliminación de huevos depende del género de nematodo y también del estado fisiológico y edad del hospedador, siendo los animales que salen por primera vez al pasto los que excretan mayor cantidad de huevos (Winks *et al.*, 1983; Omara-Opyene, 1985; Waruiru *et al.*, 1993). En zonas con clima templado y húmedo la eliminación de huevos tiene lugar durante todo el año, y cuando las estaciones son marcadas se incrementa en primavera, probablemente porque las larvas ingeridas en la estación fría anterior abandonan la hipobiosis.

El éxito de la fase exógena depende fundamentalmente de las condiciones ambientales, porque la supervivencia de las larvas infectivas está muy relacionada con el clima. En zonas con clima continental y mediterráneo la contaminación larvaria del suelo depende de la velocidad de migración de las L3 desde las heces al pasto, de su longevidad y del crecimiento de la hierba. En zonas con clima oceánico, cuando hay humedad suficiente aumenta la migración larvaria, junto con el menor crecimiento de la hierba, hace que la contaminación del pasto aumente en otoño e invierno, siendo en esta última estación cuando aumenta la excreción fecal de huevos en vacas con tricostrongilidosis (Mezo 1992). A finales de primavera y comienzo de verano, en el noroeste de España se dan condiciones óptimas de temperatura y humedad que favorecen el desarrollo larvario, en cambio en el invierno, el descenso de la temperatura y el menor crecimiento de la hierba provoca la mortalidad de las larvas.

En condiciones naturales, la supervivencia de las larvas en el pasto es mayor en los meses fríos, ya que en los calurosos el incremento de la temperatura provoca un aumento de la actividad de las larvas, que consumen rápidamente sus reservas de energía y mueren (Michel, 1985; Urquhart *et al.*, 1996). En las regiones tropicales y subtropicales existen tres tipos de climas que determinan el desarrollo de las larvas (Hansen y Perry, 1994):

- Clima húmedo tropical: proporciona un ambiente más o menos permanentemente favorable para la supervivencia y desarrollo de las larvas.
- Clima tropical y subtropical de sabana con una larga estación seca: el ambiente seco se torna hostil para la supervivencia de las larvas a medida que aumenta la estación seca. Esta situación se transforma con la llegada de las lluvias.
- Clima árido tropical y subtropical: por su escasa vegetación, es casi permanentemente desfavorable para la supervivencia larval. Sin embargo, un entorno con vegetación, en cortos períodos de precipitación puede transformarse rápidamente en un ambiente favorable, en especial para los géneros de alta patogenicidad como *Haemonchus*.

En la mayor parte de Europa, los caballos parasitados por estrongídeos eliminan mayor cantidad de huevos en verano y menos en otoño. A partir de la segunda mitad de la primavera y hasta principios de otoño, tiene lugar un desarrollo rápido de las fases de vida libre en los pastos, y los mayores porcentajes de larvas se obtienen en julio y en octubre (Lloyd, 2009). El descenso de las temperaturas a finales de otoño y durante el invierno, ralentiza o provoca el cese de este desarrollo (Ogbourne, 1972; Duncan, 1974; Herd y Willardson, 1985), aunque estas fases puedan permanecer viables e infectar a los caballos en la siguiente primavera (Nielsen *et al.*, 2007). Es importante tener en cuenta que las larvas de estrongídeos pueden sobrevivir varios meses si las temperaturas no son extremas, pero las L3 solo pueden hacerlo durante unas semanas hasta agotar sus reservas. La temperatura idónea para el desarrollo de las L1 y L2 de los ciatostomídeos es de 10-33°C. Se ha comprobado que más del 90% de las L1 y L2 no son capaces de soportar temperaturas de -6°C durante 1-4 días, pero las L3 sobreviven hasta -26°C (Medica y Sukhdeo, 1997).

Baudena *et al.* (2000) detectaron el mayor número de larvas de ciatostomídeos en el pasto en los meses fríos de otoño e invierno. Incluso la nieve favorece la supervivencia y viabilidad de huevos y larvas 3 de ciatostomídeos, porque protege a las formas parasitarias de las fluctuaciones de temperaturas, provocadas en muchos casos por las corrientes de aire (Hasslinger, 1981; Mirck, 1981; Hasslinger y Bittner, 1984; Herd y Willardson, 1985).

En relación con la humedad, la resistencia de las larvas a la desecación aumenta con el desarrollo larvario: mientras que las L1 no sobreviven, las L3 provistas de doble vaina son muy resistentes. Aunque es necesaria cierta humedad para la supervivencia y el movimiento de las L3 en el pasto, su exceso las elimina (Mfitlodze y Hutchinson, 1987).

c) Importancia económica de las estrongilidosis y tricostrongilidosis

Los efectos adversos en la productividad se manifiestan de forma diversa y a menudo son difíciles de apreciar en las infecciones subclínicas (Cordero y Rojo Vázquez, 1999). En las nematodosis gastroentéricas el signo más común es la reducción del peso vivo, que se asocia con anorexia, y reducción de la capacidad de absorción y utilización de nutrientes; además, hay que tener en cuenta que los nutrientes que se utilizarían para el crecimiento se emplean para reparar los tejidos dañados por los parásitos. Hansen y Perry (1994) observaron pérdidas de crecimiento de 0,5 kg / día en bovinos con infecciones subclínicas, mientras que en infecciones clínicas, las pérdidas durante la estación de pastoreo fueron de 15-40 Kg / animal. También se han descrito efectos adversos sobre la producción de leche, citándose reducciones de entre 150-200 L / vaca / lactación.

Desde el punto de vista reproductivo se ha indicado que puede haber retraso en el inicio de la reproducción como consecuencia del menor desarrollo de los animales. Asimismo, se ha observado que en hembras gestantes parasitadas, el peso de los terneros al nacer era menor (Rojo *et al.*, 1997). Los nematodos gastrointestinales de los bovinos provocan las mayores pérdidas económicas cuando la infección parasitaria cursa de manera subclínica (Almada, 2015), estimándose en 7,11 billones USD las pérdidas ocasionadas por las parasitosis gastrointestinales en Brasil, considerando solamente las reducciones en producción, sin contemplar los honorarios veterinarios, ni el costo del personal de campo ni los medicamentos (Grissi, 2014, Cit. por Almada, 2015).

En caballos, la presencia de larvas y adultos de ciatostominos provoca diarrea y anorexia, que se traducen en pérdida de peso y deterioro de la condición corporal (Matthews y Morris, 1995; Ionita *et al.*, 2010). Los grandes estrongilos de los équidos son más patógenos que los pequeños, ya que en la migración intraorgánica las larvas pueden provocar trombos, arteritis, cólicos e incluso la muerte (Nielsen *et al.*, 2008). En la primera década de este siglo se utilizaron antihelmínticos de manera excesiva, que disminuyó la prevalencia de las estrongilidosis en caballos, pero también provocó la aparición de resistencias (Döpfer *et al.*, 2004; Von Samson-Himmelstjerna *et al.*, 2007).

La tendencia actual, es aplicar terapia selectiva (Nielsen *et al.*, 2010), tratando únicamente los animales que superen cierta intensidad de eliminación de huevos. 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.*, 2011).

1.2. LUCHA FRENTE A LOS PARÁSITOS

1.2.1. Control farmacológico

En la mayoría de las ocasiones, el control parasitario se centra exclusivamente en la administración de tratamientos farmacológicos, y en el mercado existe una amplia gama de antihelmínticos. Su utilización sin control profesional, obedeciendo más a razones comerciales, sin realizar análisis previos ni tener en cuenta la epidemiología parasitaria de la zona, ha provocado, en las últimas décadas, la aparición de resistencias a numerosos fármacos a lo largo de todo el mundo (Montalvo-Aguilar *et al.*, 2006; Encalada Mena *et al.*, 2008; Larsen *et al.*, 2011; Arias *et al.*, 2012b). No hay que olvidar que la presencia de cepas resistentes de parásitos también aumenta en el suelo (*refugia*), y los animales en pastoreo se reinfectarán de manera continua.

En las regiones españolas en las que el ganado se mantiene en extensivo a lo largo de todo el año, solo se tratan los animales cuando los servicios veterinarios oficiales realizan algún tipo de programa sanitario obligatorio o si los animales presentan signos clínicos. En estos casos, el manejo suele ser difícil, y con frecuencia los animales no reciben la dosis correcta, debido a que no se estima correctamente el peso, y a que parte de la dosis se pierde en la administración (Arias *et al.*, 2010).

En la tabla 2 se resumen los principios activos más frecuentemente empleados frente a helmintos digestivos. Como se puede apreciar, existe un número importante de preparaciones frente a trematodos y nematodos, helmintos ampliamente diagnosticados en especies animales en pastoreo.

Es importante señalar que todo programa para el control de parásitos en animales, que se fundamente únicamente en la administración de tratamiento farmacológico, está prácticamente abocado al fracaso, entendido en el mejor de los casos como una acción con efecto temporal, que en un periodo variable de tiempo requerirá de nuevas administraciones de antiparasitarios (Arias *et al.*, 2010). El problema se agrava en especial en animales de renta, debido a que para evitar la presencia de residuos de fármacos en alimentos de origen animal que puedan ser consumidos por personas, en los sistemas actuales de explotación resulta inviable la administración de tratamientos fuera de los periodos de secado (Charlier *et al.*, 2012). De hacerlo en otras fases, sería obligatorio eliminar los

alimentos obtenidos a partir de estos animales tratados durante el periodo de supresión fijado por el fabricante (normalmente superior a un mes) para evitar que alcancen la cadena alimentaria humana.

Tabla 2.- Principios activos más frecuentemente empleados en el control de helmintos.		
Agente parasitario	Familia	Molécula
Trematodos	Bencimidazoles	Albendazol Triclabendazol
	Salicilanilidas	Oxiclozanida Closantel
	Sulfonamidas	Clorsulón
Cestodos	Tetrahidropirimidinas	Pamoato de pirantel Tartrato de pirantel
	Isquinolinas	Praziquantel
Nematodos	Bencimidazoles	Albendazol Febantel Fenbendazol Flubendazol Mebendazol Netobimin Oxfendazol Oxibendazol
	Lactonas macrocíclicas	Abamectina Doramectina Eprinomectina Ivermectina Milbemicina Moxidectina Selamectina
	Imidazotiazoles	Levamisol

1.2.2. Principales medidas de prevención de helmintosis digestivas

Debido a que los fármacos actúan en los hospedadores definitivos, y por tanto se mantiene el riesgo de nuevas infecciones, sobre todo en animales en pastoreo o en aquellos que reciben forraje fresco, resulta imprescindible tener en consideración la existencia de formas parasitarias en el medio (suelo), cuya ingestión provocará la reinfección.

Ya se ha mencionado anteriormente que es muy importante tener en cuenta la epidemiología de los parásitos para entender los procedimientos orientados a la prevención. Del conocimiento del origen de las infecciones parasitarias, intervención de hospedadores intermediarios y condiciones que favorecen su supervivencia, es posible concluir qué períodos pueden entrañar un mayor riesgo de infección (Tabla 3).

Tabla 3.- Factores epidemiológicos que intervienen en la transmisión de algunos helmintos.				
	<i>F. hepatica</i>	Paramfistómidos	Estrongílidos	Ascáridos
Fuente de infección	Ingestión de metacercarias adheridas a la hierba o que flotan en el agua de bebida		Ingestión de hierba con larvas o huevos (<i>Nematodirus</i>)	Ingestión de huevos embrionados
Hospedador intermediario	Caracoles anfibios: <i>Galba truncatula</i>		–	–
Epidemiología	Pastoreo en prados húmedos con agua estancada, suelos ácidos, temperaturas moderadas		Pastoreo en prados Desarrollo larvario óptimo >26-27°C	Falta de higiene hacinamiento
Periodo de mayor riesgo	Final de primavera y otoño		Mayor contaminación del pasto: meses fríos	Época de partos

Toda esta información resulta de indudable interés para diseñar programas de control en los que se integren medidas para la prevenir las infecciones parasitarias, como se propone en las tablas 4-6. Resulta interesante destacar que para prevenir la infección por trematodos ha de tenerse en cuenta no solo evitar la ingestión de las metacercarias, sino que también es preciso ejercer alguna acción sobre los caracoles anfibios que actúan como hospedadores intermediarios (limneidos), liberando al

medio las cercarias que posteriormente se convierten en metacercarias. Pese a que se sugiere el empleo de molusquicidas como una medida preventiva, la falta de especificidad de productos como la niclosamida frena su aplicación (Cringoli y Rinaldi, 2013). Aunque se han conseguido muy buenos resultados con extractos de papaya (*Carica papaya*) y palmera de nuez de betel (*Areca catechu*) (Jaiswal y Singh, 2009), tampoco estos productos discriminan caracoles infectados o no infectados. Esto revela la ausencia de medidas orientadas a la propagación de los caracoles que actúan como hospedadores intermediarios, lo que impediría el desarrollo de la fase externa del ciclo biológico (Tabla 4).

Tabla 4.- Procedimientos para prevenir la infección por <u>trematodos</u> .		
	Riesgo	Medidas propuestas
Fuente de infección	Ingestión de metacercarias con el agua o la hierba	
Hospedador intermediario	Caracoles anfibios: <i>Galba truncatula</i>	Uso de molusquicidas Cercado de zonas encharcadas
Epidemiología	Pastoreo en prados húmedos con agua estancada, suelos ácidos, temperaturas moderadas	Rotación de pastos Bebederos altos y cercado de zonas del pasto contaminadas
Periodo de mayor riesgo	Final de primavera y otoño	

En relación con los nematodos, se pone especial énfasis en impedir el contacto con los huevos de ascáridos, proponiéndose pautas que limiten la ingestión de estadios infectivos (con L2) (Tabla 5).

Tabla 5.- Procedimientos para prevenir la infección por <u>ascáridos</u> .		
	Riesgo	Medidas propuestas
Fuente de infección	Ingestión de huevos embrionados	Limpieza de los establos
Epidemiología	Falta de higiene Hacinamiento	No abonar con estiércol fresco Separar los animales jóvenes
Periodo de mayor riesgo	Época de partos	Alimentación de terneros con leche artificial. Tratamiento de los terneros a los 10-12 días

Dentro de los huevos de los estrogilidos, se forma una larva de primer estadio (L1) que lo abandona, y en el suelo se transforma en L2 y a continuación en L3 (fase infectiva) que migra hacia la hierba. En este caso resulta necesario evitar las condiciones que favorecen la ingesta de L3 (Tabla 6).

Tabla 6.- Procedimientos para prevenir la infección por <u>estrogilidos</u> .		
	Riesgo	Medidas propuestas
Fuente de infección	Ingestión de hierba con larvas o huevos (<i>Nematodirus</i>)	Rotación de pastos
Epidemiología	Pastoreo en prados húmedos con hierba alta Desarrollo óptimo >26-27°C	Rotación de pastos No abonar con estiércol fresco
Periodo de mayor riesgo	Meses fríos	Aprovechamiento de los prados por distintas especies

De la información resumida en las Tablas 4-6 se desprende que entre las medidas para prevenir la infección por helmintos, la única acción para dificultar la evolución de los huevos hasta los estadios infectivos consiste en aconsejar el abonado con estiércol que no sea fresco, es decir que haya experimentado fermentación, lo que obviamente conlleva la estabulación de los animales, al menos durante parte del día. Sin embargo, esta solución no es práctica para los sistemas en extensivo o semi-extensivo, aunque resulta evidente que la actuación a nivel de la materia fecal supondría una gran ayuda para disminuir en el medio la presencia de fases de riesgo.

1.2.3. Métodos de control alternativos

Al acuñar la expresión "El que está enfermo es el campo", el parasitólogo argentino Dr. Carlos Entrocasso puso claramente de manifiesto la importancia del medio en la supervivencia y difusión de los parásitos gastrointestinales (Grissi, 2014, Cit. por Almada, 2015). La búsqueda de métodos alternativos para el control de las parasitosis surge de la necesidad de desarrollar métodos complementarios al uso de antihelmínticos, y se pueden citar:

- Manejo de pastos: Puede resultar un procedimiento preventivo (introducción de animales no infectados en áreas libres, pueden alternarse con otras especies), evasivo (mover

animales de zonas infectadas a zonas no infectadas) o dilutivo (mezcla de distintas edades o especies en espacios amplios) (Barger *et al.*, 1994).

- Selección genética de individuos resistentes a parásitos: Es una solución permanente (Hooda *et al.*, 1999; González *et al.*, 2008).
- Nutrición: La suplementación con proteína ayuda a afrontar las parasitosis, disminuyendo sus efectos negativos sobre los animales afectados (Wallace *et al.*, 1996; Coop y Kyriazakis, 1999).
- Suplementación con cobre en agujas: Su eficacia ha sido probada en ganado caprino, pero ha de administrarse con una buena alimentación y controlarse estrictamente para evitar hepatotoxicidad (Martínez Ortiz de Montellano *et al.*, 2007).
- Extractos de plantas: Existe un gran número de plantas utilizadas en la medicina tradicional con componentes antiparasitarios (Paolini *et al.*, 2004; Galicia-Aguilar *et al.*, 2008; López-Aroche *et al.*, 2008).
- Bacterias nematófagas: Algunas cepas de bacterias son capaces de eliminar larvas de nematodos, las toxinas que producen estas bacterias puede que se lleguen a utilizar como nuevas moléculas de compuestos antihelmínticos (López *et al.*, 2006).
- Ácaros con actividad nematocida: Como la familia Macrochelidae (Waller y Faedo, 1996).
- Vacunas: Tienen un éxito comercial limitado (Lightowlers *et al.*, 2003; Hein y Harrison, 2005).
- Utilización de hongos parasitoides: Constituye una medida de control biológico cuya eficacia radica en reducir la viabilidad de las formas infectivas en el pasto, pero no afectan a los parásitos adultos, por lo que no son un sustituto de los fármacos antiparasitarios (Eysker *et al.*, 2006). Previenen la reinfección, evitan lesiones al reducir la carga parasitaria, y permite la adquisición de inmunidad natural (Githigia *et al.*, 1997).

1.3. HONGOS PARASITICIDAS

Teniendo en cuenta que no es posible erradicar los parásitos de las explotaciones ganaderas, se incide en el control sostenible que permita restablecer el equilibrio entre hospedadores y parásitos, manteniendo niveles de infección “tolerables”, que estimulen la respuesta inmunitaria sin afectar su salud. El proyecto Horizonte 2020 de la Unión Europea, *Worm Control in Organic Production Systems* (Thamsborg *et al.*, 2005), tratando de encontrar una solución a los problemas que conlleva el abuso de antihelmínticos, propuso el uso de forrajes con plantas bioactivas, y a pesar de obtener resultados prometedores, tampoco parece ser la solución, ya que las plantas eficaces no están disponibles en todos los mercados, y aunque así fuera, sería necesario aportar grandes cantidades de las mismas para conseguir la eficacia parasiticida.

Hace más de un siglo que se conoce la actividad helminticida de ciertos hongos del suelo frente a parásitos de plantas. El origen está en cultivos hortícolas, en los que se constató que la presencia de algunos hongos reducía la de nematodos pertenecientes a los géneros *Meloydogine*, *Heterodera*, *Ditylonchus*, *Pratylonchus* y *Tylanchus*, muy frecuentes en plantaciones de tomates, patatas, frutales, soja, etc. Al observar que los hongos aumentaban en el suelo abonado con estiércol de ganado, se consideró que la materia orgánica era la que estimulaba su desarrollo. Sin embargo, investigaciones posteriores demostraron que las larvas y los huevos de los parásitos que contenían las heces de los animales constituían el verdadero estímulo (Barron, 1977).

Los hongos que desarrollan actividad parasiticida, en condiciones naturales se alimentan de materia orgánica del

suelo (saprofitos), y ante algunos estímulos, principalmente la existencia en sus proximidades de estadios parasitarios, se transforman en organismos predadores; en ausencia de formas parasitarias, retornan a un comportamiento saprofito. Los quistes o huevos constituyen el principal estímulo para hongos endoparásitos de los géneros *Pochonia*, *Paecilomyces*, *Mucor* o *Trichoderma*, que desarrollan hifas que colonizan la superficie de huevos de los parásitos, penetrando en su interior y destruyendo



Fig. 8.- Hifa de *Mucor circinelloides* (arriba) sobre huevo de *Toxascaris leonina*, y larva L3 de ciatostomino atrapada por *Duddingtonia flagrans* (abajo).

los embriones, por lo que resultan muy eficaces frente a parásitos cuyas larvas no abandonan el huevo cuando están en el suelo, como los nematodos ascáridos (*Ascaris suum*, *Toxocara canis*, *Parascaris equorum*) o tricúridos (*Trichuris* spp.), así como los de trematodos (*Fasciola hepatica*) (Paz-Silva *et al.*, 2016) (Fig. 8). Las larvas de algunos nematodos estrogilidos (*Haemonchus*, *Ostertagia*, *Trichostrongylus*, *Cooperia*, *Cyathostomum*) son el estímulo para especies que pertenecen a los géneros *Arthrobotrys*, *Duddingtonia* y *Monacrosporium*, por lo que resultan muy útiles cuando en el medio hay larvas de estos nematodos parásitos de animales (Jansson y Nordbring-Hertz, 1979; Mukhtar *et al.*, 2013a, b) (Fig. 8).

Ante la necesidad de reducir en el suelo la cantidad de formas infectivas de parásitos que afectan al ganado en pastoreo, se sugiere una opción ecológica y sostenible, el empleo de esporas de especies de hongos que se venían utilizando en horticultura para el mismo fin. En esta línea, se ha demostrado que las esporas de ciertos hongos son capaces de atravesar el aparato digestivo de herbívoros sin perder su actividad (Larsen *et al.*, 1995; Cruz *et al.*, 2009; Ojeda-Robertos *et al.*, 2009; Cortiñas *et al.*, 2015). Por ello, se han desarrollado medios de cultivo que permiten obtener gran cantidad de esporas (Copetti *et al.*, 2009; Arias *et al.*, 2013a; Federica *et al.*, 2013), e incluso se han realizado algunas pruebas con procedimientos de liberación retardada (Sagüés *et al.*, 2011a, b, 2014). En la actualidad, uno de los problemas más importantes que impide la aplicación generalizada de esporas de hongos parasitocidas es la ausencia de un proceso de fabricación industrial de una formulación que permita poner en contacto las esporas de los hongos con las formas parasitarias que se encuentran en la materia fecal.

Dado que el concentrado se administra de forma rutinaria al ganado de renta, una opción ideal podría ser incluir las esporas en el pienso, para lograrlo es necesario previamente demostrar que son capaces de resistir el proceso de fabricación, y en especial las elevadas temperaturas que se alcanzan durante el mismo. Una vez que el concentrado sale de la fábrica, se distribuye entre las explotaciones ganaderas en sacos que permanecen almacenados hasta 2-3 meses antes de su consumo. Es por lo tanto importante comprobar que las esporas mantengan su capacidad vital y que no pierdan la actividad parasitocida durante este tiempo.

1.3.1. Hongos parasitoides en control biológico

Se define el control biológico como un “*método ecológico, diseñado por el hombre para disminuir las poblaciones parasitarias a un nivel subclínico aceptable, conservando estas poblaciones en un nivel no perjudicial, usando antagonistas vivos naturales*” (Grønvoid et al., 1996). Los organismos utilizados para el control biológico deben mantener una relación altamente específica con la especie contra la que se pretende emplear.

Resulta fundamental entender este enfoque como una medida reguladora, de naturaleza preventiva, cuyo objetivo no es acabar con el organismo diana, sino controlar su población para reducir sus efectos nocivos. Larsen (2000) señaló que, para que un organismo pueda ser utilizado como **biocontrolador** de parásitos debe presentar las siguientes características:

BIOCONTROLADOR	Ciclo de vida corto en relación con la fase de vida libre del ciclo de los parásitos.
	Alta capacidad reproductiva, de manera que se pueda ser obtener industrialmente.
	Que sea estable y de larga vida en almacenamiento.
	Competitivo con los antihelmínticos químicos disponibles comercialmente.
	Viable en las formulaciones comerciales, lo cual constituye un reto de investigación para la industria farmacéutica.
	Que el vehículo o las formulaciones sean seguras para el medio ambiente, consumidores humanos y animales.
	Barato y de fácil administración.
	Eficaz en el control de los parásitos.

En las últimas décadas se han desarrollado experiencias con **hongos** como agentes biocontroladores. Se trata de organismos vivos eucariotas que se encuentran en todo tipo de ambientes. Poseen una pared celular definida que contiene quitina, sin clorofila ni celulosa. Se reproducen sexual o asexualmente, formando esporas generalmente inmóviles. Al no poseer clorofila, tienen que descomponer materia orgánica para alimentarse, y algunos incluso son capaces de dañar a otros seres vivos (Alexopoulos y Mims, 1979).

Atendiendo a su tamaño se distinguen dos tipos de hongos, macroscópicos o *macromicetos* y microscópicos o *micromicetos*, que a su vez se pueden encontrar como estructuras unicelulares (levaduras) o pluricelulares (mohos u hongos filamentosos), e incluso dentro de una misma especie se pueden encontrar ambas formas (hongos dimórficos).

1.3.2. Especies de hongos con actividad parasitica

Las especies interesantes para el control biológico de parásitos pertenecen a hongos filamentosos, capaces de nutrirse de huevos, metacercarias, quistes o larvas que se encuentran en el ambiente (Saumell y Fernández, 2000; González Garduño *et al.*, 2005) (Fig. 9).

Existen más de 200 especies de hongos parasiticas descritas, la mayoría pertenecen a los denominados hongos imperfectos o *Deuteromycetes*, que constituyen un grupo heterogéneo y ubicuo de especies microscópicas que viven normalmente como saprofitos, ocupando diferentes nichos en el suelo, alimentándose de una amplia gama de nematodos, ya sea como recurso principal o secundario (Nordbring-Hertz *et al.*, 2006).

Algunas de las especies tienen cierto grado de flexibilidad nutricional (Den Belder y Jansen, 1994) y también pueden capturar bacterias, tardígrados, amebas y otros organismos de vida libre (Lysek y Nigenda, 1989). Estudios realizados en diferentes países han mostrado que este tipo de hongos se pueden encontrar por todo el mundo, en todo tipo de climas y hábitats (Duddington, 1951; Gray, 1987; Liu *et al.*, 1992; Sanyal, 2000; Chandrawathani *et al.*, 2002; Durand *et al.*, 2005).



Fig. 9.- Algunos hongos filamentosos desarrollan hifas que son capaces de dañar la cubierta de huevos de ascáridos.

Los hongos parasiticas han sido clasificados tradicionalmente de forma simplificada, en predadores o depredadores y endoparásitos (Barron, 1977).

Los hongos **predadores o depredadores** crecen en el ambiente formando redes extensas de hifas que constituyen el micelio. Poseen distintos mecanismos para atrapar larvas de parásitos, como hifas adhesivas o sin órganos especializados, ramas, redes y botones adhesivos, anillos constrictores y no constrictores. Hasta hace poco se defendía que todos estos mecanismos se estimulaban por el movimiento de las larvas (Grønvoid *et al.*, 1996; López-Llorca y Jansson, 2007), estrés fisiológico o nutricional, aunque algunos las forman también de forma espontánea (Mota *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2012). Ciertas investigaciones han mostrado que no es necesario que las larvas de nematodos se encuentren vivas y en movimiento (Feder *et al.*, 1963), e incluso se ha llegado a comprobar que ejemplares inanimados de los trematodos *F. hepatica* o *Calicophoron daubneyi* suponen un estímulo muy importante para la morfogénesis del hongo larvicida *Duddingtonia flagrans* (Arias *et al.*, 2011; Suárez, 2017).

Una vez que el hongo atraviesa la cutícula se origina un bulbo infectivo, cesa el movimiento de la larva, y a partir del bulbo se forma una hifa trófica que crece hasta ocupar el cuerpo en pocas horas. El proceso completo en condiciones de laboratorio, desde la captura a la destrucción total dura entre 4 y 7 días (Sagüés *et al.*, 2011b).

Los hongos **endoparásitos** se definen como parásitos obligados de larvas de parásitos. En condiciones favorables se reproducen asexualmente formando hifas fértiles, tubos y conidióforos, y cuando las circunstancias cambian desarrollan esporas como formas de resistencia (Barron, 1977). Las esporas son normalmente estructuras inmóviles, pero algunas especies forman zoosporas móviles por reproducción sexual. Cuando conidios o esporas son ingeridos o contactan con los parásitos, se adhieren a su cutícula y después de romperla penetran en el interior, germinando dentro del parásito para nutrirse de su contenido (Mankau, 1980). Los hongos que necesitan ser ingeridos solo son activos contra aquellas larvas que se nutren del medio (estadios 1 y 2) (Sagüés *et al.*, 2011b) y no son tan abundantes en la naturaleza (Larsen, 2000). El proceso completo puede llevar 2-3 semanas.

En la actualidad, parece más adecuado clasificarlos en función del modo en que se nutren de nematodos y los mecanismos que utilizan para ello, contemplando hongos con características ovicidas (Sagüés *et al.*, 2011b) y a aquellos productores de toxinas (Liu *et al.*, 2012).

a) Hongos con actividad ovicida

Hongos ovicidas u oportunistas.- Existen algunas especies oportunistas que se nutren de quistes y huevos de parásitos. La mayor parte de estos hongos son saprofitos, por lo que no necesitan la presencia de huevos de parásitos en el medio para desarrollarse y sobrevivir (Sagüés *et al.*, 2011a).

Purpureocillium lilacinum (= *Paecilomyces lilacinus*) y *Paecilomyces penetrans* son los agentes más eficaces de biocontrol de nematodos de plantas (Rahoo *et al.*, 2011; Khan *et al.*, 2012; Mukhtar *et al.*, 2013a, b), y también se han desarrollado investigaciones que prueban su utilidad frente a huevos de parásitos de animales como *Toxocara canis* (Basualdo *et al.*, 2000; Gortari *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2010), gracias a la capacidad de sus hifas para penetrar en su interior, ayudados por la secreción de serin-proteasas (Zareen *et al.*, 2001; Khan, 2006).

Las hifas de *Trichoderma harzianum* también pueden atravesar la cubierta de huevos de parásitos y la cutícula de larvas, favorecidas por la liberación de enzimas de actividad quitinasa, glucanasa y proteasa. En el interior del huevo, proliferan y liberan metabolitos tóxicos (Dos Santos *et al.*, 1992; Haran *et al.*, 1996). Ciarmela *et al.* (2002) señalaron que *T. harzianum* no ejerce efecto alguno sobre los huevos de *T. canis*.

Entre las especies más utilizadas en los últimos años destaca *Pochonia chlamydosporia* (= *Verticillium chlamydosporium*), que puede destruir huevos y nematodos hembra, aunque principalmente se define como ovicida (Lýsek y Stěrba, 1991). Diferentes autores han comprobado que durante los estadios iniciales de la infección, el hongo genera redes de micelio que entran en contacto estrecho con la cubierta de los huevos (Hernández *et al.*, 2016), por lo que son altamente eficaces frente a *T. canis*, *T. vitulorum*, *A. lumbricoides*, *A. suum* y *P. equorum* (Lýsek y Stěrba, 1991; Braga *et al.*, 2007; Carvalho *et al.*, 2010; Braga *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2011; Maciel *et al.*, 2012; De Carvalho *et al.*, 2013).



Fig. 10.- *Mucor circinelloides* es un hongo filamentoso que desarrolla hifas capaces de dañar la cubierta de huevos de parásitos.

Finalmente, estudios realizados por Arias *et al.* (2013a), Cazapal-Monteiro *et al.* (2015) y Cortiñas *et al.* (2015) probaron que *Mucor circinelloides* tiene actividad frente a huevos de helmintos responsables de zoonosis (Fig. 10). Su mecanismo de acción es análogo al de otras especies ovicidas; cuando las esporas germinan, se forma un micelio cuyas hifas se adhieren a la cubierta de los huevos, penetran en su interior y acaban destruyendo el embrión.

La actividad de que desarrollan algunos hongos sobre los huevos de ciertos parásitos incluye cuatro fases:

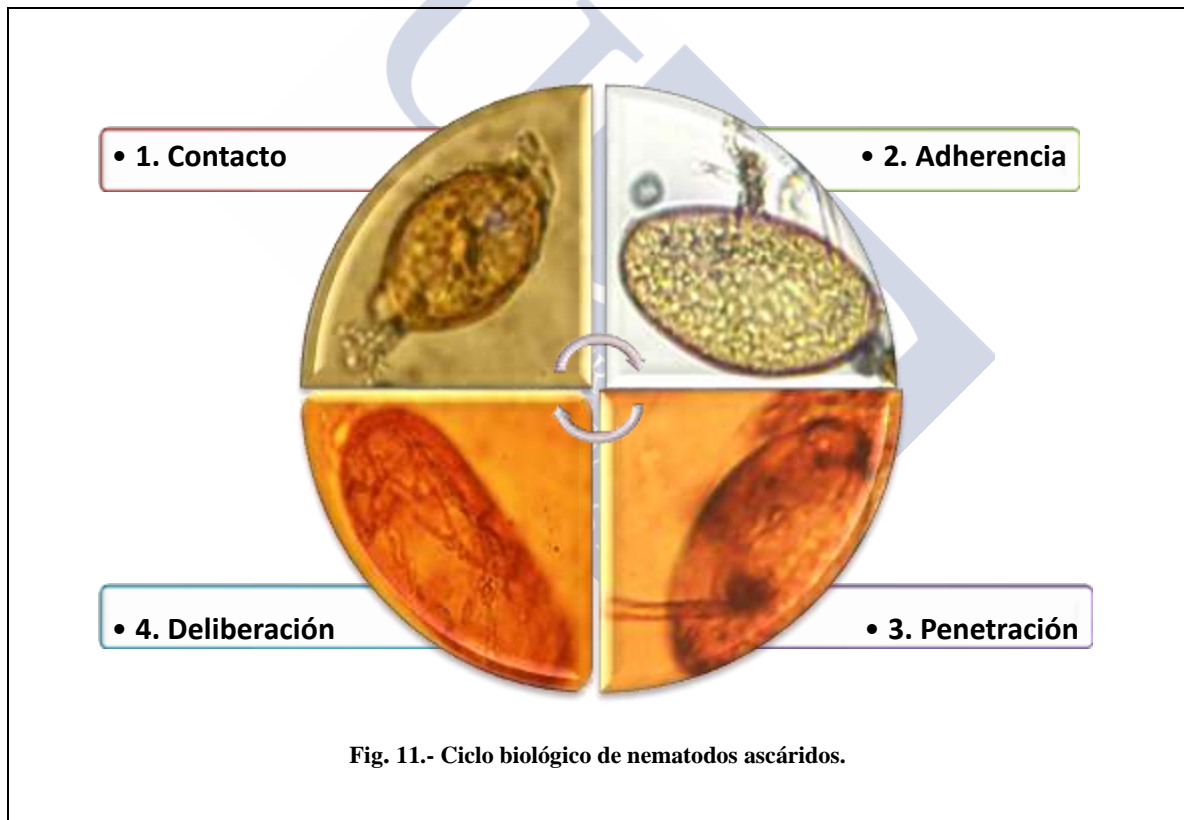


Fig. 11.- Ciclo biológico de nematodos ascáridos.

La presencia de huevos de parásitos en el suelo o en las heces promueve el desarrollo de algunas especies de hongos, que tiene como resultado la formación de hifas que se aproximan hacia la cubierta hasta entrar en **contacto** con la misma (Fig. 11). Cuando las hifas se unen de forma perpendicular, experimentan una modificación en su extremo que origina un órgano de fijación específico denominado *apresorium* o *apresorio*, que asegura la **adherencia** de las hifas a la cubierta

(Brunori *et al.*, 1985). En el interior del apresorio se forma el *haustorium* o haustorio, que hace posible la absorción del contenido interior del huevo una vez que estas hifas **penetran** la cubierta (Dunn, 1983). En esta fase participan también algunas enzimas proteasas y quitinasas (Esteves *et al.*, 2009; López-Llorca *et al.*, 2010; Larriba *et al.*, 2012). Una vez que han ingerido el interior del huevo, las hifas lo abandonan y colonizan otros huevos (**fase de deliberación**) (Lýsek y Štěřba, 1991).

b) Hongos con actividad larvicida



Fig. 12.- Larva L1 en interior de huevo (arriba) y L3 de ciatostomino atrapada por *D. flagrans* (abajo).

Algunos huevos de parásitos intestinales, como los de los nematodos estromatodidos, en el medio evolucionan hasta que en su interior se forma una larva (Fig. 12), que lo abandona como larva de primer estadio o L1, en el suelo se transforma en L2 y finalmente en L3, el estadio infeccioso que migra hacia la vegetación. Con condiciones favorables de temperatura y humedad, y protegidas de la acción directa del sol, el desarrollo hasta L3 transcurre tan rápidamente que los hongos ovicidas no disponen de tiempo suficiente para destruir los huevos, pese a que pueden provocar daños importantes en su cubierta. Por este motivo, se aconseja el empleo de especies **larvicidas**, que tienen hifas que forman trampas con la finalidad de atrapar las larvas de parásitos (Fig. 12).

Los hongos larvicidas más conocidos pertenecen a los géneros *Arthrobotrys*, *Monacrosporium* y *Duddingtonia*. Saumell *et al.* (2008) postularon una clasificación de las especies larvicidas en función de su capacidad de crecimiento en el ambiente:

- **Hongos nematófagos no formadores espontáneos de trampas o insensitivos:** Son saprofitos y persistentes en el ambiente, capaces de desarrollarse en sustratos pobres en nutrientes, en humedad o de formas parasitarias. Forman redes en el ambiente y son capaces de producir trampas directamente de las reservas nutricionales, pero su capacidad como predadores es limitada. En este grupo se encuentran especies como *Arthrobotrys oligospora*, *A. conoides*, *Monacrosporium cystosporum* y *D. flagrans*.

- **Hongos nematófagos formadores espontáneos de trampas o sensitivos:** Dependen de la presencia de nematodos en el ambiente, una vez los detectan desarrollan rápidamente su actividad depredadora. *A. dactyloides*, *Dactylella candida*.

Dentro de los hongos larvicidas, existen algunas especies denominadas *atrapanematodos*, porque presentan estructuras adhesivas o no adhesivas a tal fin; las adhesivas tienen una capa mucilaginosa que contiene lectinas, proteínas que se unen a los carbohidratos de la cutícula del nematodo. Nordbring-Hertz y Mattiasson (1979), documentaron la existencia de una lectina que se une a los terminales N-acetil-galactosamina que se encuentran en la superficie de los nematodos.

Se describen diferentes estructuras que participan en los mecanismos de captura de larvas:

- Hifas adhesivas.
- Ramas adhesivas. Se forman ramas hifales cortas, laterales a las hifas vegetativas, recubiertas de material adhesivo.
- Redes adhesivas. Las ramas pueden curvarse hasta anastomosarse con la hifa de la que proceden o con otras adyacentes, formando redes bidimensionales o tridimensionales que pueden contener a su vez anillos.
- Botones adhesivos. En las hifas laterales crecen pequeñas células esféricas o subesféricas, morfológicamente distintas, multinucleadas, con inclusiones en la periferia celular, de las cuales solo la terminal secreta compuestos adhesivos.
- Anillos no constrictores. Se forman mediante la anastomosis de ramas cortas laterales formando un anillo de 3 células. Cuando el nematodo pasa por el anillo queda atrapado de forma pasiva (Hay *et al.*, 1997).
- Anillos constrictores. Son anillos celulares cuyas células se hinchan cuando un nematodo pasa por ellos, atrapándolo de forma activa.

En la búsqueda de hongos nematófagos para el control de nematodos gastrointestinales, la investigación se ha centrado en las especies depredadoras, ya que su carácter saprofito permite su aislamiento y mantenimiento en cultivos puros, facilitando así su multiplicación en el laboratorio. Estos hongos han sido aislados en una gran variedad de hábitats y se localizan especialmente en medios ricos en materia orgánica como estiércol, abono o pastos (Hay *et al.*, 1997; Bird y Herd, 1995).

En condiciones naturales, cuando las esporas llegan al suelo, la existencia de materia orgánica en descomposición estimula su desarrollo hacia la formación de hifas, que enseguida originan el micelio (Barron, 1977). Si en las proximidades existen larvas de nematodos parásitos, tiene lugar una **fase de reconocimiento** en la que los hongos detectan en su cutícula unos compuestos que inicialmente recibieron el nombre de *nemina*, y que posteriormente se han identificado como derivados de lectina (Jansson y Nordbring-Hertz, 1979; Jansson y Thiman, 1992; López-Llorca *et al.*, 2010). En esta fase se produce una multiplicación rápida de las hifas, y en el caso de los hongos atrapanematodos, se van formando diferentes estructuras con la finalidad de detener las larvas y finalmente nutrirse a partir de ellas.

A diferencia con los hongos ovicidas, dado que las larvas de los parásitos están dotadas de movilidad, la **fase de adherencia** entre hongos y parásitos no tiene lugar de forma activa, sino que las larvas al desplazarse se encuentran con las trampas y quedan inmovilizadas. Una vez que las larvas están completamente atrapadas y paralizadas, el hongo forma *hifas invasivas*, responsables de la **fase de penetración** de la cutícula, proceso en el que también participan enzimas o metabolitos extracelulares secretados por el hongo, y que facilitan la colonización posterior de la larva (Yang *et al.*, 2014). Finalmente, se originan *hifas asimilativas*, que se encargan de la **fase de asimilación** de los nutrientes que se encuentran en el interior de la vaina, y posteriormente tiene lugar la eliminación de la L3 (Cortiñas, 2016).

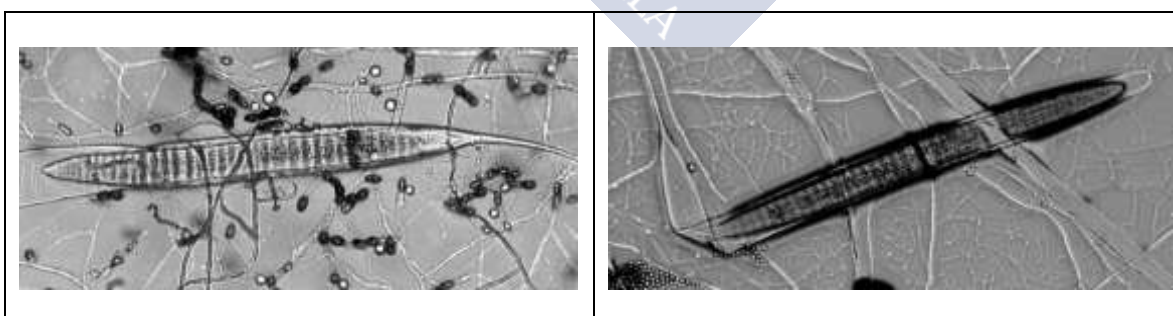


Fig. 13.- En el micelio de hongos atrapanematodos se forman trampas en las que resultan retenidas las larvas de nematodos parásitos.

Duddingtonia flagrans

Entre las especies conocidas de hongos nematófagos, *D. flagrans* cumple con todas las características descritas anteriormente, pero su mejor cualidad es la de atravesar el tracto gastrointestinal de bovinos (Larsen *et al.*, 1996), ovinos (Githigia *et al.*, 1997; Arroyo *et al.*, 2017; Casillas-Aguilar *et al.*, 2008; Ojeda-Robertos *et al.*, 2008), caprinos (Wright *et al.*, 2003), équidos (Larsen *et al.*, 1995; Madeira de Carvalho *et al.*, 2012; Arias *et al.*, 2013b), suidos (Nansen *et al.*, 1999; Fernández *et al.*, 1999b) y cánidos (Carvalho *et al.*, 2010), manteniendo intacta su capacidad para germinar en las heces y más tarde reducir el número de larvas infectivas.

Esta resistencia al paso por el tracto gastrointestinal se debe a que sus clamidosporas (esporas de resistencia) presentan una gruesa pared que les permite tolerar condiciones extremas (Larsen y Roepstorff, 1999). Pertenece al grupo de los Deuteromicetes, un grupo heterogéneo compuesto por especies con reproducción asexual, mediante la formación de esporas de origen mitótico (Barron, 1977). En *D. flagrans* se describen dos tipos de esporas (Grønvold *et al.*, 1996):

- Conidios de pared delgada situadas al borde de estructuras denominadas conidióforos, que se levantan a partir de la hifa. Los conidios tienen dos células la distal tienen doble tamaño que la proximal (Fig. 14).
- Clamidosporas, esporas de pared gruesa y resistente. Se forman intercaladas entre hifas maduras a partir de células que aumentan de tamaño, rompen la membrana que las recubre, continúan creciendo hasta madurar, momento en el que les crecen unas protuberancias en su superficie (Fig. 15).

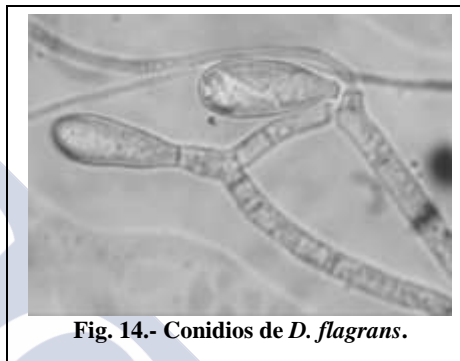


Fig. 14.- Conidios de *D. flagrans*.

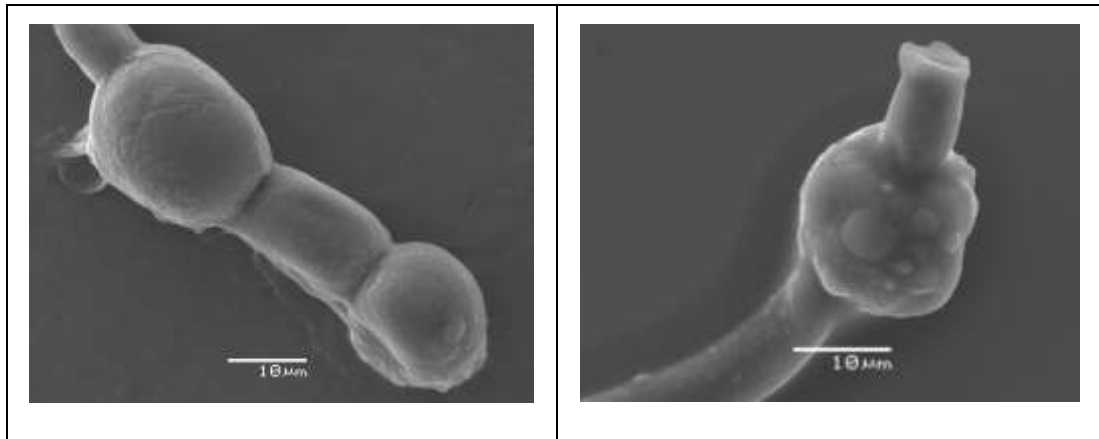


Fig. 15.- Las esporas de *D. flagrans* se pueden formar asexualmente, intercalándose en las hifas.

A partir de las esporas comienza el proceso de formación del micelio de *D. flagrans*, apareciendo primero hifas germinativas con ramas laterales que crecen y se curvan hasta anastomosarse con la hifa de la que procede o con otra próxima, la repetición del proceso da lugar a la formación de anillos y redes tridimensionales adhesivas para atrapar larvas de nematodos (Fig. 16). Cuando las larvas de nematodos parásitos entran en contacto con las trampas del hongo, este reconoce los residuos de carbohidratos en su superficie, y a continuación las captura, penetra su cutícula gracias a la producción de diversas enzimas y las paraliza o elimina gracias a la secreción de enzimas extracelulares (Bogús *et al.*, 2005).



Fig. 16.- En el micelio de *D. flagrans* se intercalan anillos o trampas en las que quedan retenidas las larvas de nematodos parásitos.

D. flagrans produce otras enzimas como, serin-proteasas, fosfolipasa C, lipasas, que degradan pectina (Meyer y Wiebe, 2003) y fosfatasa ácida, especialmente al interactuar con larvas de nematodos (Cruz *et al.*, 2009).

En condiciones de laboratorio, su carácter saprofita permite el aislamiento y mantenimiento en cultivos puros. La temperatura óptima para su crecimiento y función depredadora se encuentra entre 10 y 30°C, con una actividad máxima de formación de trampas entre 25 y 28°C (Grønvold *et al.*, 1996; Santos *et al.*, 2001; Paz-Silva *et al.*, 2011). Otros factores como luz, humedad, pH, presencia de oxígeno, contacto con larvas de nematodos parásitos o sus antígenos, cantidad de nitrógeno y carbono en el medio, pueden también influir en su desarrollo y en la formación de elementos de captura (Bogús *et al.*, 2005).



1.3.3. Ensayos con hongos parasitocidas

a) Determinación de la actividad parasitocida

Para establecer la intensidad de la actividad larvicida, se suele recurrir al cálculo del porcentaje de reducción larvaria, mediante una fórmula basada en el recuento de larvas antes y después de la administración de los hongos (Paz-Silva *et al.*, 2011):

$$\text{Porcentaje de reducción} = [1 - (\text{N}^{\circ} \text{Larvas}_{\text{post-tratamiento}} / \text{N}^{\circ} \text{Larvas}_{\text{pre-tratamiento}})] \times 100$$

Valorar el efecto ovicida de un hongo resulta más complicado, porque el resultado de la interacción no se puede cuantificar con presencia/ausencia de huevos, ni siquiera basándose únicamente en las alteraciones que producen en los huevos porque pueden existir diferentes grados de daño. Lýsek *et al.* (1982) valoraron el efecto ovicida de un hongo en función de su capacidad para adherirse, penetrar y destruir los huevos de los parásitos (Tabla 7):

Tabla 7.- Actividad antagonista de hongos sobre huevos de parásitos.	
Actividad	Efecto
Ninguna	0
Adherencia de hifas a la superficie	I
Adherencia y penetración	II
Adherencia, penetración y destrucción del embrión	III

Estos autores también postularon otra clasificación de la actividad ovicida basada en el porcentaje de huevos que permanecían viables o resultaban alterados tras la exposición a los hongos (Tabla 8). Dicho porcentaje se calcula de acuerdo a la fórmula siguiente (Lýsek *et al.*, 1982):

$$\text{Porcentaje de huevos alterados} = [1 - (\text{Huevos viables}_{\text{post-tratamiento}} / \text{Huevos viables}_{\text{pre-tratamiento}})] \times 100$$

Tabla 8.- Actividad antagonista de hongos sobre huevos de parásitos.

Actividad	% Huevos alterados	Actividad	% Huevos alterados
0	≤ 15%	3	50-79%
1	15-20%	4	> 80%
2	21-49%		

b) Pruebas de actividad parasiticida con hongos

Como se resume en las Tablas 9 y 10, existen pocos ensayos con hongos ovidas, y la mayoría de las pruebas con hongos parasiticidas se han llevado a cabo con especies larvicidas. A pesar de que en los últimos años esta tendencia ha cambiado ligeramente, todavía resulta insuficiente la investigación sobre el efecto de hongos ovidas, en especial frente a parásitos de animales, y gran parte de los datos disponibles han sido obtenidos en estudios *in vitro* realizados en placas Petri. Sorprendentemente, en muy pocas ocasiones se ha planteado la evaluación del posible efecto sobre huevos de helmintos en la materia fecal. Todo esto explica, en parte, que cuando se mencionan hongos parasiticidas se consideren únicamente aquellos con actividad larvicida.

Tabla 9.- Ensayos realizados con hongos ovidas.

Autores	Helminto	Animal	Hongo	% Eficacia
Braga <i>et al.</i> (2007)	<i>Ascaris lumbricoides</i>	(Placa)	<i>Pochonia chlamydosporia</i>	26 – 30
Braga <i>et al.</i> (2008)	<i>Fasciola hepatica</i>	(Placa)	<i>Pochonia chlamydosporia</i>	21
Gortari <i>et al.</i> (2008)	<i>Toxocara canis</i>	(Placa)	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	63 – 66
Araújo <i>et al.</i> (2009)	<i>Dipylidium caninum</i>	(Placa)	<i>Pochonia chlamydosporia</i>	19,6 – 49,2
Silva <i>et al.</i> (2010)	<i>Trichuris vulpis</i>	(Placa)	<i>Pochonia chlamydosporia</i>	29,5 – 94,8
Ferreira <i>et al.</i> (2011)	<i>Ascaris suum</i>	(Placa)	<i>Pochonia chlamydosporia</i>	58
Dias <i>et al.</i> (2012)	<i>Fasciola hepatica</i>	(Placa)	<i>Pochonia chlamydosporia</i>	28-43
Dias <i>et al.</i> (2013)	<i>Fasciola hepatica</i>	Ternereras	<i>Pochonia chlamydosporia</i>	67
Arias <i>et al.</i> (2013a)	<i>Toxocara canis</i>	Heces de perro	<i>Mucor circinelloides</i>	66
Cazapal-Monteiro <i>et al.</i> (2015)	<i>Baylisascaris procyonis</i>	Heces de mapache y coati	<i>Mucor circinelloides</i> <i>Paecilomyces</i> sp. <i>Verticillium</i> sp.	53 – 69 45 – 62 52 - 67
Cortiñas <i>et al.</i> (2015)	<i>Ascaris suum</i> <i>Fasciola hepatica</i>	Heces de cerdo y ternereras	<i>Mucor circinelloides</i>	67 - 74

Entre los hongos ovidas, la especie más empleada es *Pochonia chlamydosporia*, y en menor grado *Paecilomyces lilacinus* y *Mucor circinelloides* (Tabla 9).

En la Tabla 10 se resumen las pruebas con hongos larvicidas, y la mayoría se han llevado a cabo con *Duddingtonia flagrans*.

Tabla 10.- Ensayos realizados con hongos larvicidas.				
Parásito	Animal	Hongo	% Eficacia	Autores
Ciatostominos	Caballo	<i>Duddingtonia flagrans</i>	66 – 99	Baudena et al. (2000)
Ciatostominos	Caballo	<i>Arthrobotrys oligospora</i> <i>Duddingtonia flagrans</i>	90	Santos et al. (2001)
Ciatostominos	Heces de caballo	<i>Duddingtonia flagrans</i>	>80*	Braga et al. (2009)
Ciatostominos	Placa	<i>Duddingtonia flagrans</i>	93,64	Braga et al. (2010)
Ciatostominos	Heces de caballo	<i>Duddingtonia flagrans</i>	90	Paz-Silva et al. (2011)
Ciatostominos	Caballo	<i>Duddingtonia flagrans</i>	>80	Tavela et al. (2013)
Ciatostominos	Caballo	<i>Duddingtonia flagrans</i>	90	Hernández et al. (2016)
<i>Strongyloides westeri</i>	Heces de caballo	<i>Duddingtonia flagrans</i> <i>Monacrosporium thaumasium</i>	76,4 – 89,9 76,7 – 87,7	Araujo et al. (2010)
Cooperia spp.	Oveja	<i>Arthrobotrys</i> sp.	80 – 90	Faedo et al. (1997)
Haemonchus contortus	Cabra Oveja	<i>Duddingtonia flagrans</i>	50 – 77	Sanyal (2001)
Haemonchus contortus	Oveja	<i>Duddingtonia flagrans</i>	97 – 100	Chandrawathani et al. (2002)
Haemonchus contortus	Oveja	<i>Duddingtonia flagrans</i>	77 – 100	Peña et al. (2002)
Haemonchus contortus	Oveja	<i>Duddingtonia flagrans</i>	>90	Sanyal & Mukhopadhyaya (2002)
Haemonchus contortus	Cabra Oveja	<i>Duddingtonia flagrans</i>	81 – 90	Chandrawathani et al. (2003)
Haemonchus contortus	Oveja	<i>Duddingtonia flagrans</i>	96	Khan et al. (2007)
Haemonchus contortus	Oveja	<i>Duddingtonia flagrans</i>	82	Casillas-Aguilar et al. (2008)
Haemonchus contortus	Oveja	<i>Duddingtonia flagrans</i>	32 - 84	Ojeda-Robertos et al. (2008)
Haemonchus contortus	Tierra	<i>Arthrobotrys musiformis</i> <i>Clonostachys rosea</i> <i>Duddingtonia flagrans</i> <i>Trichoderma esau</i>	90,4 61,9 85,7 66,7	Silva et al. (2017)
Haemonchus contortus	Oveja	<i>Duddingtonia flagrans</i>	70	Aguilar-Marcelino et al. (2016)
Haemonchus contortus Strongyloides papillosus	Cabra	<i>Duddingtonia flagrans</i>	81 – 99	Campos et al. (2009)

<i>Ostertagia ostertagi</i> <i>Cooperia oncophora</i>	Tenera	<i>Duddingtonia flagrans</i>	85	Dimander <i>et al.</i> (2003)
<i>Teladorsagia circumcincta</i> <i>Trichostrongylus colubriformis</i>	Cabra	<i>Duddingtonia flagrans</i>	50 – 90	Chartier & Pors (2003)
<i>Trichostrongylus colubriformis</i>	Oveja	<i>Duddingtonia flagrans</i>	20 – 60	Gómez-Rincón <i>et al.</i> (2006)
<i>Trichostrongylus colubriformis</i>	Oveja	<i>Duddingtonia flagrans</i>	99	Waller <i>et al.</i> (2006)
<i>Oesophagostomum sp.</i>	Cerdo	<i>Duddingtonia flagrans</i>	59,6 – 82,7	Ferreira <i>et al.</i> (2011)
Nematodos gastrointestinales	Oveja	<i>Duddingtonia flagrans</i>	72 – 99	Githigia <i>et al.</i> (1997)
Nematodos gastrointestinales	Oveja	<i>Duddingtonia flagrans</i>	90	Faedo <i>et al.</i> (2000)
Nematodos gastrointestinales	Oveja Cabra	<i>Duddingtonia flagrans</i>	78	Waghorn <i>et al.</i> (2003)
Nematodos gastrointestinales	Oveja	<i>Duddingtonia flagrans</i>	23 – 74	Knox & Faedo (2001)
Nematodos gastrointestinales	Oveja	<i>Duddingtonia flagrans</i>	79 – 99	Fontenot <i>et al.</i> (2003)
Nematodos gastrointestinales	Ciervo	<i>Duddingtonia flagrans</i>	61 84 80 94	Terrill <i>et al.</i> (2004)
Nematodos gastrointestinales	Cabra	<i>Duddingtonia flagrans</i>	5 – 53	Ojeda-Robertos <i>et al.</i> (2005)
Nematodos gastrointestinales	Oveja	<i>Duddingtonia flagrans</i>	51 – 100	Mendoza de Gives <i>et al.</i> (2006)
Nematodos gastrointestinales	Oveja	<i>Duddingtonia flagrans</i>	36 – 93	Eysker <i>et al.</i> (2006)
Nematodos gastrointestinales	Tenera	<i>Duddingtonia flagrans</i>	53,8	Ortiz-Pérez <i>et al.</i> (2017)
Nematodos gastrointestinales	Oveja	<i>Duddingtonia flagrans</i> <i>Monacrosporium thaumasium</i>	76 – 83	Vilela <i>et al.</i> (2016)
<i>Muellerius capillaris</i>	Cabra	<i>Duddingtonia flagrans</i>	0	Paraud <i>et al.</i> (2005)

De la lectura de las Tablas 9 y 10 resulta difícil comprender porque se tiene más información sobre hongos larvicidas que ovicidas, cuando el número de parásitos que se transmiten a través de larvas es inferior al que lo hace mediante huevos. Otra cuestión que llama la atención, se basa en que a pesar de que en condiciones naturales es difícil encontrar animales con infecciones parasitarias monoespecíficas, prácticamente no se han desarrollado investigaciones que utilicen mezclas de hongos con efecto larvicida y ovicida.

c) Control biológico con hongos y administración de antiparasitarios

La actividad de los hongos parasiticidas debe definirse como una medida profiláctica enfocada al control de los estadios que se encuentran en el medio, y por ello debe combinarse con otras estrategias que actúen sobre las fases que se encuentran en los animales. En este sentido, es importante tener en cuenta que existen muy pocos estudios acerca de la posible influencia de algunos tratamientos antiparasitarios sobre la morfogénesis de los hongos con actividad parasitica. Vieira *et al.* (2015) indicaron que la presencia de albendazol, thiabendazol, ivermectina, levamisol o closantel en el medio de cultivo inhibía el desarrollo de *Arthrobotrys oligospora*, *Duddingtonia flagrans* y *Purpureocillium (= Paecilomyces) lilacinus*. En una investigación posterior se corroboró el efecto inhibitor de ivermectina y albendazol sobre diferentes especies de *Paecilomyces* spp. (Ferreira *et al.*, 2016). Por el contrario, Hernández *et al.* (2016) no observaron efecto alguno de la ivermectina sobre el crecimiento de *D. flagrans* en placas con medio de cultivo agar-trigo.

Estas consideraciones resultan muy importantes para el diseño de programas de control integrado, basados en la actuación sobre los hospedadores (tratamientos antiparasitarios) y sobre los parásitos en el medio (hongos parasiticidas). Hasta el momento hay muy pocos estudios de control integrado; Braga *et al.* (2009) desarrollaron un ensayo con caballos que consistió en la desparasitación con ivermectina y la administración de micelio de *D. flagrans* dos veces a la semana, obteniendo a los tres meses una reducción del 73% en la eliminación de huevos de nematodos gastrointestinales.

1.3.4. Formulaciones comerciales de hongos con actividad parasiticida

La mayor parte de los estudios de hongos parasiticidas se han realizado frente a nematodos de plantas, y es en este campo en el que se han comercializado algunas cepas como agentes de control biológico para cultivos agrícolas.

Existe una preparación comercial a base de *P. lilacinus* (Bio-Nematon[®], T. Stanes & Company Ltd., India) disponible para el control biológico de nematodos de plantas.

La empresa Biológicos y Ecológicos de Colombia, vende un producto denominado Tricodermus[®] que contiene esporas de *Trichoderma harzianum* mezcladas con un polvo que al humedecerlo favorece la germinación de las semillas. Se presenta en bolsas metalizadas de 100, 200, 500 y 1000 gramos. A pesar de las propiedades ovicidas de *T. harzianum*, el producto se comercializa como antagonista de otros hongos patógenos vegetales como *Rhizoctonia*, *Fusarium* y *Pythium*.

Arthrobotrys robusta ha sido comercializado como Royal 300[®], y *A. superba* como Royal 350[®], (Yang *et al.*, 2011), aunque en la actualidad es posible que ya no se encuentren disponibles bajo estas denominaciones.

No existen disponibles en el mercado preparados a base de hongos con actividad frente a nematodos parásitos de animales y personas, aunque resultarían de gran utilidad para prevenir las infecciones parasitarias que se transmiten por contacto con suelos contaminados con huevos o larvas (geohelmintosis).

1.3.5. Efectos adversos de hongos con actividad parasiticida

En muchas ocasiones se asocian patogenicidad y hongos, por eso, al proponer la utilidad de algunas especies fúngicas para el control de las infecciones parasitarias, se plantean recelos e interrogantes acerca del peligro que podrían entrañar para los operarios que los manipularan, los animales que los ingirieran, e incluso, en que forma podrían alterar la presencia de otros seres que viven en el biotopo en el que se introducen.

Aunque no resulta frecuente, la infección cutánea de personas por *Paecilomyces lilacinus* se ha diagnosticado en todo el mundo, en la mayoría de los casos en pacientes inmunodeprimidos (Hall *et al.*, 2004).

De igual modo, también se ha indicado que algunas cepas de *Trichoderma* y de *Mucor* son patógenos oportunistas de personas y animales inmunodeprimidos (Kubicek *et al.*, 2008; Gutiérrez-Delgado *et al.*, 2016). Todos estos casos guardan en común que los pacientes adquirieron las micosis durante su estancia en hospitales, y que las personas afectadas recibían tratamientos a base de corticosteroides y antibióticos, o bien padecían enfermedades crónicas como cáncer o SIDA (Méndez-Tovar *et al.*, 2016).

Las especies de hongos indicadas para el control de parásitos son saprofitas y se encuentran en el suelo, de modo que los animales las ingieren con frecuencia de forma natural. De hecho, algunas especies se han aislado precisamente a partir de heces de ovinos (Flores *et al.*, 1999) o muflones (Hernández *et al.*, 2017). En investigaciones previamente realizadas con ganado vacuno, porcino y equino, se ha demostrado la ausencia de alteraciones provocadas por la ingesta de esporas de *D. flagrans* o *M. circinelloides* (Cortiñas *et al.*, 2015; Suárez, 2017; Cazapal *et al.*, 2017).

Otra de las cuestiones que resulta determinante para poder utilizar los hongos parasiticidas está relacionada con su efecto sobre otros organismos que se encuentran en el medio. En especial, resulta *inquietante* dirimir si los hongos atrapanematodos podrían afectar también a larvas de nematodos de vida libre. Este extremo ha sido descartado en varios estudios, el último desarrollado en Argentina por Saumell *et al.* (2016), quienes demostraron que la adición de esporas de *D. flagrans* a heces depositadas en el suelo no dañaba las poblaciones de nematodos no parásitos. Otro resultado muy interesante fue la observación de que el hongo no persistía más de 2 meses en el ambiente.

A pesar de que existe una idea muy extendida acerca de los efectos perjudiciales de los hongos, se desconocen las aplicaciones de estos organismos en el desarrollo de ecosistemas forestales (Baar, 2012; Diagne *et al.*, 2012) o en procesos biotecnológicos como el blanqueado de la pasta de papel (Levin y Forchiassin, 2012).



1.4. PRODUCCIÓN DE HONGOS CON ACTIVIDAD PARASITICIDA

Existe un elevado número de aplicaciones industriales de hongos filamentosos, que desde los años 40 han sido utilizados para la producción de antibióticos, ácido cítrico, y más recientemente, de enzimas y detergentes. Los hongos también se utilizan como pesticidas biológicos para el control de malas hierbas, enfermedades de plantas y plagas de insectos. Muchas especies producen compuestos bioactivos denominados micotoxinas, como alcaloides y poliquétidos, que son tóxicos para animales y personas (Kossen, 2000).

Los hongos filamentosos son microorganismos con morfología compleja, que exhiben diferentes formas estructurales durante sus ciclos de vida. A partir de una espora se origina la estructura básica vegetativa de crecimiento, un filamento tubular o *hifa*. Conforme la hifa continúa progresando, aparecen numerosas ramificaciones, y finalmente se produce una masa de filamentos denominada *micelio* (Papagianni, 2004). Bajo condiciones apropiadas, el micelio vegetativo da lugar a un micelio reproductivo que sostiene la producción de esporas reproductivas. El tipo de esporulación y la morfología de las esporas y estructuras que las soportan son características esenciales en la identificación de hongos. Las esporas se pueden considerar como el inicio y final del proceso de diferenciación.

Para poder utilizar hongos parasiticidas como medida de control biológico se deben desarrollar protocolos de producción a gran escala de esporas o micelio, y para ello es fundamental conocer los parámetros de crecimiento de los hongos, tanto en el laboratorio como en condiciones de campo. En el laboratorio, para optimizar su multiplicación y alcanzar una producción masiva que permita la elaboración de un producto comercial, y en el campo (o ambiente), para conocer los factores bióticos y abióticos que puedan favorecer su actividad predadora con las larvas de parásitos (Federica *et al.*, 2013).

Clásicamente se han aislado e incubado en múltiples medios de cultivo sólidos, tanto enriquecidos (favorecen la producción de micelio e hifas) como empobrecidos (favorecen la producción de formas de resistencia), en busca de formulaciones que consigan mayor prolificidad. Según el estado del medio en el que se cultivan los hongos filamentosos, se distinguen medios sólidos, líquidos o mixtos.

1.4.1. Medios de cultivo sólidos

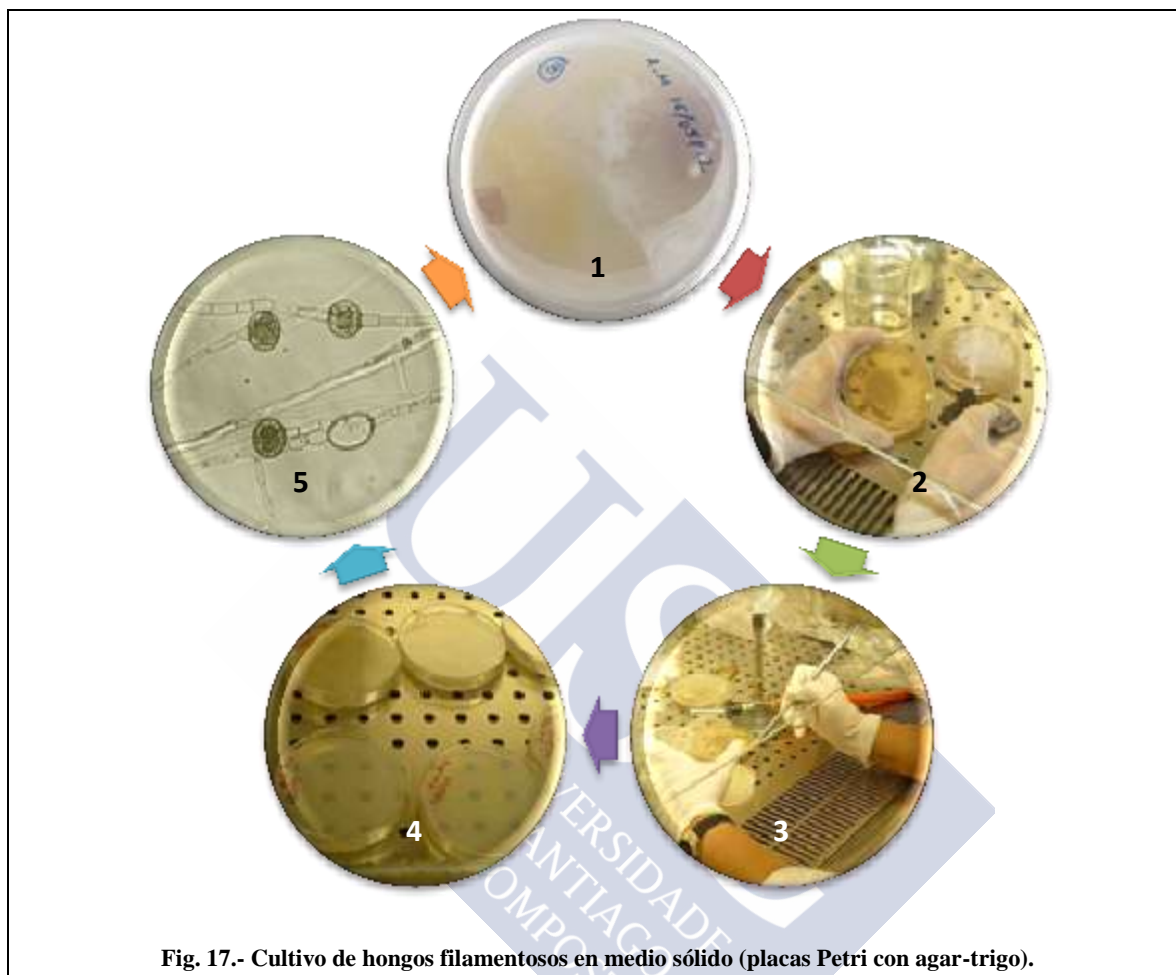
Inicialmente, los medios de cultivo más empleados para promover el crecimiento de hongos nematófagos fueron agar glucosa Saboraud (Saboraud agar glucose, SGA) y agar agua, a los que se han incorporado medios que combinan agar, agua y harinas o granos de cereales como arroz, maíz o trigo (Chandrawathani *et al.*, 2002) (Tabla 11). El medio compuesto por agar bacteriológico y harina de trigo también se emplea con mucha frecuencia.

Prácticamente no existen pruebas en las que se haya cuantificado el rendimiento de medios sólidos en términos de producción de esporas.

Tabla 11.- Medios de cultivo más empleados para la producción de esporas de hongos filamentosos.	
Medio	Componentes
Sabaraud Agar Glucosa	Peptona Agar Glucosa
Potato Agar Dextrosa	Patata deshidratada Agar bacteriológico Dextrosa
Yeast Phosphate Sulphate Sacarose-Agar	Extracto de levadura Fosfato potásico Agar bacteriológico
Agar trigo	Harina de trigo Agar bacteriológico

Una vez preparados los medios, se esterilizan en autoclave a 121°C durante 20 min, y cuando la temperatura desciende hasta 40-50°C, se vierten en placas Petri en cámara de flujo laminar (1) (Fig. 17). Cuando el medio ya está gelificado, se coloca un inserto de tamaño variable (4x4cm, 7x7 cm) procedente de una placa madre (2, 3, 4). A los pocos días (2-3) ya se observa un crecimiento importante de micelio, mientras que las esporas tardan un poco más en aparecer (5). Arias *et al.*

(2013c) señalaron que era necesario un periodo medio de 17 días para que se observasen clamidosporas de *D. flagrans* en medio agar-trigo.



Ensayos realizados por Grønvold *et al.* (1999), en los que evaluó la influencia de distintas condiciones bióticas y abióticas sobre el crecimiento y la capacidad predadora de *D. flagrans*, mostraron que el hongo respondió rápidamente formando redes tridimensionales tras la estimulación con larvas infectivas de *Cooperia oncophora* a una temperatura constante de 20 y 30°C, obteniéndose la máxima cantidad de redes un día después de la inducción. A 10°C, las redes se formaron lentamente, comenzando al cuarto día de la inducción. *D. flagrans* no logró crecer en condiciones de anaerobiosis (0% O₂ y 18% CO₂); en cambio, en una atmosfera microaerófila (6% O₂ y 9% CO₂), el hongo tuvo una tasa de crecimiento comparable con una atmósfera normal (21% O₂ y 0,03% CO₂); al emplear luz artificial (3000-3400 Lux), la tasa de crecimiento y producción de redes disminuyó significativamente.

Maciel *et al.* (2006) cultivaron hongos nematófagos *Arthrobotrys robusta*, *Duddingtonia flagrans* y *Monacrosporium thaumasium* en medios con agar-agua (water-agar, WA) agar-patata-dextrosa (potato-dextrose agar, PDA), agar-harina de maíz (corn meal agar, CMA) y agar-fosfato-sacarosa-sulfato-levadura (yeast-phosphate-sulphate-sucrose-agar, YPSSA). Las mayores producciones de conidios de *D. flagrans* se obtuvieron con PDA ($11 \cdot 10^6$ conidios / placa), y con YPSSA para *A. robusta* y *M. thaumasium* (3,8 y $1,8 \cdot 10^6$ conidios / placa, respectivamente).

En los últimos años, en la búsqueda del aumento del crecimiento de este tipo de hongos, se ha propuesto la adición de inductores del crecimiento, como el *meso*-inositol, promotor del crecimiento imprescindible para algunos microorganismos, que actúa como regulador de la citogénesis y morfogénesis, o el Tween 80, surfacante no iónico que contiene un ácido graso insaturado (ácido oleico), y que interfiere en la permeabilidad de la membrana celular y facilita la entrada de nutrientes del entorno celular. En un ensayo desarrollado a 24 y 27°C, se comprobó que la producción de esporas de *D. flagrans* resultaba de 51₁715.000 esporas / placa en presencia de *meso*-inositol, por 208₁760.000 si además se añadían harina de trigo, carbohidratos, leche entera en polvo y vitaminas (Federica *et al.*, 2013).

Se ha analizado la influencia de la adición de formas adultas de helmintos o de sus productos antigénicos (metabólicos) sobre la morfogénesis de algunos hongos. Con el empleo de medios de cultivo con agar-trigo, Arias *et al.* (2013c) señalaron la producción de más de 2000 esporas / cm² en presencia tanto de paramphistómidos adultos como de sus antígenos de excreción/secreción, mientras que en su ausencia no se llegó a 100 esporas / cm². Es interesante destacar que se consiguió una mayor estimulación de esporogénesis con trematodos que con nematodos. En otros estudios se logró la estimulación del crecimiento de *D. flagrans*, así como la formación de trampas y esporas con algunas sustancias, como cianuro de sodio, ácido sódico, colchicina, citocalasina B, ácido absícico, óxido nítrico, extracto de levaduras y valina (Li *et al.*, 2014).

1.4.2. Medios de cultivo líquidos

Aunque en un principio se creyó que los hongos sólo podrían crecer como cultivos de superficie, desde los años 1940 se consideró la posibilidad de utilizar cultivos líquidos, que presentan un enorme potencial de producción (Kossen, 2000). Cuando se emplean para la propagación de hongos filamentosos, también suelen clasificarse como medios sumergidos, en alusión a la imagen que se puede visualizar en algunos casos.

El cultivo sumergido es el sistema empleado industrialmente para la producción de una variedad de metabolitos de gran importancia económica y social a partir de hongos filamentosos (Gibbs *et al.*, 2000). Por ejemplo, antibióticos como penicilinas y cefalosporinas se emplean frente a infecciones microbianas, mientras que el ácido cítrico tiene una gran demanda como producto químico al por mayor para alimentación y otras industrias (Wucherpfenning *et al.*, 2010).

En el medio natural (en el suelo), los hongos filamentosos crecen longitudinalmente y van originándose las hifas. Esta morfología, ideal para su supervivencia en la naturaleza, no supone un problema en los cultivos en superficie, pero sí puede constituirlo en cultivos líquidos, debido a que puede llegar a establecerse una interacción muy fuerte entre las hifas sumergidas, que resulta en viscosidades aparentemente elevadas (comportamiento “compota de manzana”), y en consecuencia, en importantes problemas en el transporte de O₂, CO₂ y nutrientes, que se traducen en productividades bajas (Kossen, 2000; Krull *et al.*, 2013).

Se ha demostrado que en mucha especies se suprime completamente la reproducción asexual (conidiación), aunque se ha demostrado un ciclo asexual abreviado, un microciclo de conidiación (Anderson *et al.*, 1978). Más comúnmente, el micelio se dispersa libremente en el medio, o forma aglomerados macroscópicos. Los grumos son los agregados de hifas sueltas, y los pellets son los agregados más densos, frecuentemente esféricos (Paul y Thomas, 1998). La morfología de las hifas puede variar desde filamentos lineales a estructuras complejas muy ramificadas (Trinci *et al.*, 1990), en tanto que los agregados y pellets pueden variar en tamaño, densidad y estructura superficial, en función de las condiciones de cultivo. El control de la morfología miceliar en procesos industriales constituye un prerrequisito, puesto que en algunos se requieren micelios libres como ocurre en la producción de penicilina a partir de *P. chrysogenum*, mientras que en otros se prefieren pellets para

incrementar la producción, como sucede con la producción de ácido cítrico a partir de *Aspergillus niger*.

En la Fig. 18 se resume la producción de esporas en un medio líquido. De la superficie de una placa con *D. flagrans* en agar-trigo (1), se hace un *barrido* para recoger las clamidosporas (2) que se disuelven en agua estéril que se añade al erlemneyer con medio de cultivo líquido (3). También se pueden emplear recipientes de mayor tamaño (4, 5).



Fig. 18.- Cultivo de hongos filamentosos en medio líquido.

Apenas existe información acerca del empleo de medios de cultivo líquidos para la propagación de hongos útiles en el control biológico de parásitos. En base a ensayos previos en los que se demostró que la presencia de antígenos de trematodos suponían un estímulo para la propagación de *D. flagrans* (Arias *et al.*, 2013c), se desarrolló el medio de cultivo líquido COPFr (patente PCT/ES2014/070110), que cuenta con una proteína recombinante del tegumento de *Fasciola hepatica* (Arias *et al.*, 2013c).

Este medio hace posible la obtención simultánea de esporas de *M. circinelloides* y *D. flagrans*, aportando una solución muy útil a la producción de grandes cantidades de esporas. Se comprobó que el rendimiento en cultivos axénicos (monoespecíficos) era de $2 \cdot 10^5$ esporas de *M. circinelloides* / mL a temperatura ambiente, y $7,5 \cdot 10^4$ esporas de *D. flagrans* / mL. Además, se demostró que no existía antagonismo entre las dos especies fúngicas, lográndose un rendimiento de $1,7 \cdot 10^5$ esporas de *M. circinelloides* + $7,2 \cdot 10^4$ esporas de *D. flagrans* / mL en presencia simultánea de ambos hongos (Arias *et al.*, 2013a).

En comparación con los medios sólidos, una de las características a destacar de los medios de cultivo líquidos reside en que la fragmentación de elementos de las hifas y pellets a menudo resulta en la renovación de crecimiento, dado que los fragmentos pueden actuar como centros para nuevo desarrollo, provocando la resiembra de la población de pellets. Blanco (2015) estudió la producción de clamidosporas de *D. flagrans* en un medio líquido, y comprobó que el momento óptimo para realizar el escalado es a las 3-4 semanas del cultivo inicial y que no existe relación entre el incremento de volumen de cultivo y la producción de esporas.

1.4.3. Medios de cultivo mixtos

También se han estudiado medios en dos fases para obtener clamidosporas de *D. flagrans*, como el medio agua-arroz en grano (Santurio *et al.*, 2009), y otros medios líquidos con distintas fuentes de energía y concentraciones de agar en los que se observó una mayor producción ante fuentes complejas de nitrógeno (Gardner *et al.*, 2000). Se ha establecido que cuando el hongo crece en exceso de nitrógeno, y su desarrollo está limitado por la fuente de carbono, el componente proteico de la célula se degrada más rápidamente (Papagianni, 2004). Al contrario, en presencia de carbono

en exceso la autólisis aumenta la cantidad de sustancias reductoras. Más aún, mientras que los polisacáridos son lisados lentamente, se degradan preferentemente los lípidos.

López-Pérez *et al.* (2014) indicaron la posibilidad de emplear un sistema bifásico, en el cual el hongo primero crece en condiciones sumergidas y a continuación en medio sólido.



1.5. FORMAS DE ADMINISTRACIÓN DE ESPORAS DE HONGOS PARASITICIDAS

1.5.1. Por vía oral

Al considerar que las heces de los animales vehiculan buena parte de las formas parasitarias, que precisan salir al medio en el que se convierten en infectivas para el nuevo hospedador, parece muy acertada la idea de poner en contacto en la materia fecal a parásitos y a sus antagonistas, de modo que se limite la evolución de las formas parasitarias y de este modo el riesgo de infección. Sin embargo, hasta la fecha se han desarrollado gran número de ensayos *in vitro* (en placas) pero muy pocos *in vivo*, de ahí que exista poco conocimiento acerca de las posibles vía de administración de los hongos parasiticidas.

a) Embebidos en granos de cereales

Los granos de cereales proveen un sustrato ideal para el crecimiento y producción de gran cantidad de esporas de hongos nematófagos. Waller *et al.* (2001a), durante 5 días suplementaron el alimento de ovejas parasitadas por *Trichostrongylus colubriformis*, con 5 g de cebada con 3×10^6 clamidosporas de *D. flagrans* y, mediante coprocultivos, comprobaron que disminuía el número de larvas en la materia fecal. Estos autores señalaron que la administración continuada de este preparado podría controlar la contaminación larvaria y resultaría muy adecuado en sistemas intensivos y en aquellos en los animales se estabulan diariamente como parte del manejo. Otra opción sería para suplementar la alimentación en períodos nutricionalmente críticos de los animales, tales como el destete y el parto, en los que aumenta la intensidad de eliminación de huevos en las heces.

b) En premezcla alimentaria

Lo más frecuente consiste en mezclar una solución acuosa de esporas con el concentrado alimentario que se proporciona a los animales, aunque también se podría realizar con esporas obtenidas del raspado de la superficie de placas de agar. En un estudio realizado con equinos silvestres (Arias *et al.*, 2013b), en concreto cebra (*Equus quagga*), burro africano (*Equus africanus asinus*) y burro doméstico (*Equus asinus*) mantenidos en cautividad en el Parque Zoológico "Marcelle Natureza" (Outeiro de Rei, Lugo), se demostró que mediante la administración de una premezcla alimentaria compuesta por 2,5 Kg concentrado / animal y una dosis de $2 \cdot 10^6$ clamidosporas de *D. flagrans* / Kg p.v., se conseguía

retrasar en más de 9 semanas el periodo de reaparición de huevos de estrogilidos en heces. Además, se logró reducir los recuentos fecales por debajo de 300 huevos por gramo de heces, de modo que de acuerdo con la *Terapia selectiva* (Larsen *et al.*, 2011) estos animales no volvieron a recibir tratamiento durante un periodo de tiempo superior a un año después de la desparasitación con Ivermectina + Praziquantel (Equimax®, Virbac, España, a una dosis de 1,07 g gel/100 Kg p.v.). Cazapal-Monteiro *et al.* (2014) obtuvieron unos resultados similares en el control de nematodos gastrointestinales en muflones (*Ovis musimon*) mantenidos en cautividad en el citado parque zoológico.

c) En bloques minerales o energéticos

b *et al.* (2001) incorporaron clamidosporas de *D. flagrans* a bloques minerales y realizaron un estudio con ovinos acostumbrados a su consumo. Las ventajas que presenta esta formulación son el bajo coste y el doble propósito de su fabricación, suplemento nutricional y vehículo para los hongos nematófagos. Para determinar el consumo diario de *D. flagrans* pesaron los bloques durante el transcurso del ensayo, y comprobaron que una de las desventajas de esta forma de administración es la variación que existe de consumo entre los animales. Un importante punto a considerar es el tiempo de vida de las esporas en los bloques que suelen guardarse en almacenes húmedos durante periodos relativamente largos, estos mismos autores comprobaron que sobrevivían en el bloque mineral un mínimo de 18 semanas cuando se almacenaban a 4°C, y concluyeron que resultarían muy adecuados para regímenes en extensivo, y deberían administrarse en los períodos de máxima contaminación de los pastos con objeto de evitar los picos de infectividad larvaria.

Sagüés *et al.* (2011) fabricaron en el laboratorio bloques energéticos con clamidosporas de *D. flagrans*, y evaluaron su eficacia en dos grupos de ovinos que introdujeron en parcelas contaminadas con nematodos gastrointestinales. En una de las parcelas las ovejas recibieron bloques con el hongo y en la otra, los ovinos tuvieron bloques sin *D. flagrans*. Posteriormente, se retiraron los animales y se colocaron dos grupos de animales libres de parásitos, que permanecieron un mes pastoreando. Finalizado este período, se sacrificaron los animales para determinar el número y especies de nematodos presentes en el tracto gastrointestinal. El porcentaje de eficacia del hongo sobre el total de la población parasitaria susceptible fue del 92% pero no mostró actividad frente a *Nematodirus* ni *Trichuris* spp. Estos autores concluyeron que los bloques minerales podrían utilizarse en producciones extensivas, y su administración podría realizarse en los momentos de mayor contaminación.

d) En bolos de liberación controlada

Otra forma de administración de hongos nematófagos puede ser a través de bolos de liberación controlada (BLC), en forma de dispositivos intrarruminales. Estudios realizados por Waller *et al.* (2001a), demostraron que las clamidosporas de *D. flagrans* sobreviven a la presión de fabricación de prototipos intrarruminales de BLC al ser incorporadas dentro de matrices. Los estudios *in vitro* señalaron que las clamidosporas permanecieron viables durante 9 meses dentro de los BLC almacenados a 4°C. En estudios *in vivo* se observó que los bolos liberaron clamidosporas viables de forma constante hasta 23 días, tras su colocación en el rumen; después de ese período el dispositivo se humedeció en el centro y dejó de funcionar correctamente.

Sería deseable lograr que los BLC liberasen $5 \cdot 10^6$ clamidosporas por día durante 90 días. En el futuro, se podrían usar los BLC cuando la contaminación de los pastos alcanzase niveles de riesgo por el desarrollo de altas cantidades de larvas infectivas. La liberación de las clamidosporas en las heces sería efectiva para disminuir la migración de larvas hasta la vegetación.

e) En pellets de alginato

Otra forma de administración, estudiada con éxito en varias especies de animales domésticos, es la incorporación de hongos nematófagos en pellets de alginato de sodio. Estudios realizados por Araújo *et al.* (2000a) demostraron que la incorporación de estos hongos en los pellets no afectaba a su capacidad predatora. Las especies de hongos nematófagos incorporadas con éxito en los pellets fueron *M. thaumasium* y *Arthrobotrys robusta* (Araújo *et al.*, 2000a, b). Después de administrar por vía oral a bovinos pellets con *A. robusta*, Araújo *et al.* (2000b) lograron identificar las esporas en materia fecal, demostrando así que el paso a través del tracto gastrointestinal no limitaba su supervivencia. En un estudio reciente, Vilela *et al.* (2016) comprobaron que con la coadministración a ovejas de *D. flagrans* y *M. thaumasium* en una matriz de alginato de sodio, se podía controlar la contaminación larvaria del pasto; asimismo, demostraron que los animales mejoraban su condición corporal, siendo necesario un menor número de desparasitaciones.

Braga *et al.* (2009) y Tavela *et al.* (2011) incorporaron *D. flagrans* y *M. thaumasium*, respectivamente, en pellets de alginato, que se administraron a equinos para el control de ciatostominos. Las yeguas utilizadas recibieron una dosis oral de 1 g pellets / 10 kg p.v. / semana durante 6 meses,

demostrando reducciones significativas en el número de huevos de nematodos en materia fecal y de larvas en los coprocultivos.

1.5.2. Directamente sobre el suelo

En ocasiones puede no resultar fácil la administración de esporas de hongos parasitoides por vía oral, por lo que se ha considerado la posibilidad de su distribución, en solución líquida, directamente sobre el suelo, mediante pulverizadores o sulfadoras.

Con objeto de reducir la presencia de larvas de nematodos estrogilidos en una parcela de 5 hectáreas en la que se mantenían seis yeguas adultas Pura Raza Galega (PRG), se vertió medio de cultivo líquido con $2 \cdot 10^6$ esporas *D. flagrans* / 100 m² / semana, comprobándose que en los tres meses siguientes los recuentos fecales de huevos de estrogilidos oscilaban entre 50 y 100 HPG, mientras que en otra parcela en la que no se añadieron esporas, se obtuvieron tasas de eliminación de 250-300 HPG (Arias *et al.*, 2012).

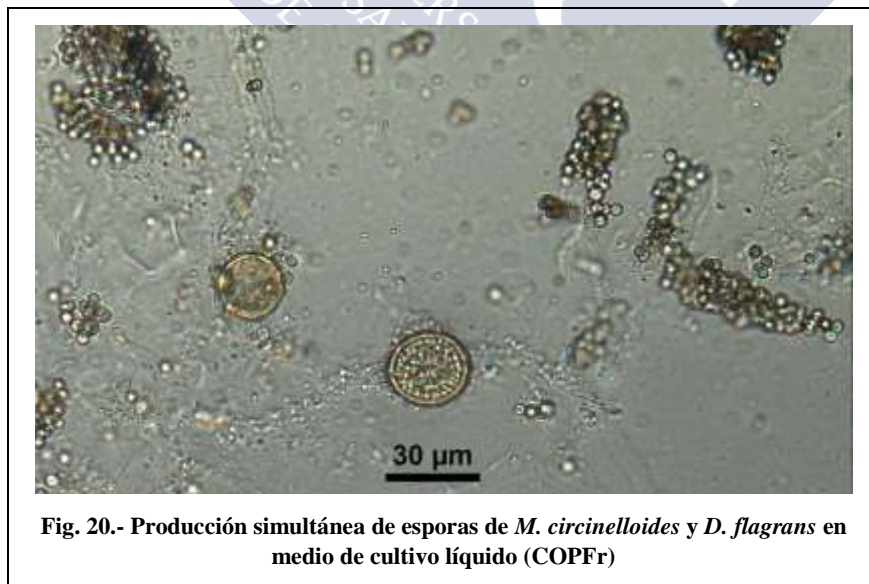
En una parcela de "Marcelle Natureza" de aproximadamente 3 hectáreas, ocupada por cinco antílopes (*Cervicapra cervicapra*), Miguélez *et al.* (2014) esparcieron medio de cultivo líquido que contenía una mezcla de $2 \cdot 10^6$ esporas de *M. circinelloides* + $2 \cdot 10^6$ esporas *D. flagrans* / 100 m², en el momento en que se realizó la resiembra, y observaron que a los 11 meses, los recuentos fecales de huevos de nematodos gastrointestinales oscilaban entre 50 y 200 HPG.

Este procedimiento constituye una aplicación directa de los medios de cultivo líquidos, para distribuir las esporas en el suelo de pastos de los que se nutren animales, evitando de esta manera el desarrollo de los parásitos hasta sus estadios infectivos. Resulta muy útil para controlar la contaminación de parques en los que viven animales silvestres que se estresan con el contacto de las personas, y también para "limpiar de parásitos" parcelas que son utilizadas por animales de difícil manejo, en el caso de que los prados fuesen muy extensos, sería necesario disponer de procedimientos mecanizados para la distribución de las esporas.

1.6. RETOS A RESOLVER EN EL EMPLEO DE HONGOS PARASITICIDAS

A pesar del creciente nivel de información sobre la eficacia parasitocida de algunos hongos filamentosos sobre diversas especies parasitarias, su aplicación práctica permanece estancada, y todavía no existen formulaciones disponibles comercialmente. Entre los escollos a solventar se han citado la producción de esporas a gran escala y la determinación de formulaciones para administrarlas a animales (Cazapal-Monteiro, 2016; Cortiñas, 2016). En apartados anteriores se han revisado investigaciones que parecen indicar que estos aspectos ya han sido solucionados, al menos en parte.

Otro aspecto a tener en cuenta es que los animales en pastoreo suelen tener coinfecciones por diferentes helmintos que se propagan de distinta forma (ooquistes/huevos, larvas...). Resultaría por tanto muy conveniente considerar la producción simultánea de esporas de hongos con actividad complementaria, por ejemplo de una especie ovicida y otra larvicida (Fig. 20). De este modo, se conseguiría un producto con un amplio espectro de actuación, en el que las especies ovicidas ejercerían un efecto muy positivo puesto que dañarían todos los huevos de parásitos, incluyendo los de estróngilos, lo que probablemente se traduciría en la debilitación de la pared, destrucción del embrión o emergencia precoz de la larva, abocándola a su eliminación en el suelo.



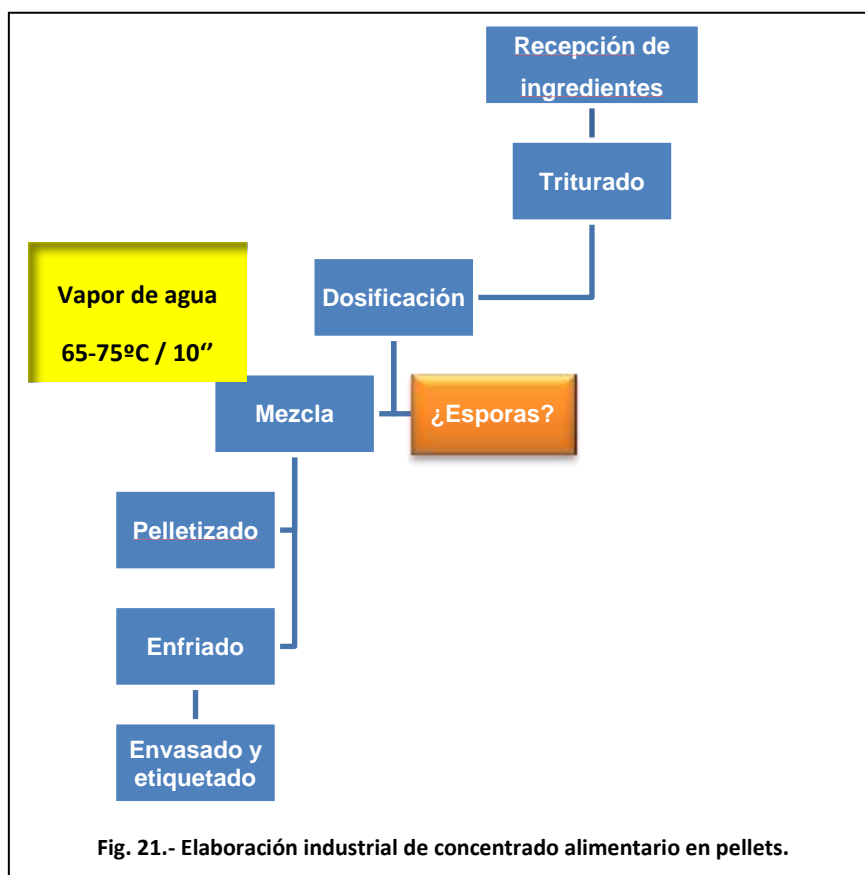
En este punto, conviene resaltar la ausencia de ensayos en especial sobre huevos de trematodos que afectan a diferentes especies animales. Las pruebas realizadas hasta el momento se han desarrollado en placas Petri (Dias *et al.*, 2012), heces (Cortiñas *et al.*, 2015) y ganado vacuno (Dias *et al.*, 2013), orientadas a comprobar la acción sobre huevos de *Fasciola hepatica*. Sin embargo, en base a que en el ciclo externo de este trematodo hepático sucede una fase en la que se requiere la presencia de agua para que se origine un miracidio en el interior de los huevos, es necesario disponer de información también acerca de la posible actividad de los hongos en medio acuoso. La acción de diversos factores meteorológicos (lluvia) y mecánicos (pisado) facilita la disgregación de las heces de los animales, favoreciendo la dispersión de los huevos en el suelo, que pueden llegar a alcanzar medios acuáticos favorables para su ulterior evolución.

Una formulación interesante para la distribución de las esporas podría ser la elaboración industrial de pellets nutricionales, que se les proporciona a los animales de manera rutinaria para asegurarles una dieta equilibrada.

La elaboración industrial de pellets se resume en la figura 21. Los ingredientes se trituran y a continuación se procede a la dosificación de cada uno, que se mezclarán. Para facilitar el proceso de mezcla y peletización posterior, se inyecta vapor de agua a 65-75°C durante un intervalo de 10-15 segundos. Tras el paso de la mezcla por un tambor de acero, los pellets se dejan enfriar, y secar, y finalmente se envasan y etiquetan.

La etapa más adecuada para la incorporación de las esporas parece ser la de mezclado de todos los ingredientes, porque aseguraría una distribución homogénea (Fig. 21).

Del análisis de posibles puntos críticos en la elaboración industrial de pellets con esporas de hongos parasitoides, destaca la fase de inyección del vapor de agua, debido a que las temperaturas que se alcanzan pueden superar los 90°C, aunque sea durante un periodo de tiempo breve (20-30 segundos). Las esporas, bajo estas circunstancias, podrían perder la capacidad de germinar, o experimentar alteraciones que limitasen su supervivencia durante el tránsito gastrointestinal, con lo que desaparecería su actividad parasitoides.



Finalmente, los aspectos regulatorios constituyen hoy en día una traba de complicada resolución. Las posibles formulaciones de hongos ovidas se orientan mayoritariamente a su utilización como **aditivo alimentario**, que precisa del registro preceptivo. En el año 2004 se presentó una solicitud a la *European Food Safe Authority* (EFSA) para que el Panel de Aditivos y Productos o Substancias empleadas en Nutrición Animal (The Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed, FEEDAP Panel) emitiera su opinión acerca de la seguridad de una preparación con *D. flagrans* como un aditivo alimentario, en base a la Directiva 70/524/EEC del Consejo Europeo (FEEDAP, 2006). En la respuesta se destaca el potencial de este producto, se corrobora la ausencia de toxicidad sobre el medio puesto que se trata de un organismo que se encuentra de forma natural en el suelo, pero se expone que no pueden concluir finalmente sobre la seguridad de este producto debido a la ausencia de datos presentados sobre toxicidad sistémica, para lo que sería necesario un estudio de toxicidad a 90 días (FEEDAP, 2006). Desde este momento y hasta la actualidad, no se ha avanzado en la resolución de estas cuestiones.

Para registrar los hongos nematófagos como **producto biocida** de aplicación directa sobre el suelo, como producto biocida, el organismo responsable es la *European Chemical Agency* (ECHA). Hasta la fecha, se han registrado 22 grupos de productos biocidas, pero en ninguno de ellos existen hongos filamentosos.

2.- OBJETIVOS



Teniendo en cuenta los antecedentes planteados, se ha diseñado un estudio con los **OBJETIVOS** siguientes:

- 1.- Determinar el tipo de actividad que ejerce el hongo filamentoso *Mucor circinelloides* sobre los huevos de trematodos *Calicophoron daubneyi*.
- 2.- Establecer si las esporas de *M. circinelloides* pueden desarrollarse y actuar sobre los huevos de *C. daubneyi* en medios acuosos para evitar la formación de miracidios.
- 3.- Comprobar si las esporas de los hongos filamentosos *M. circinelloides* y *Duddingtonia flagrans* resisten el proceso de fabricación industrial de concentrado alimentario en pellets.
- 4.- Demostrar que la inclusión de esporas de *M. circinelloides* y *D. flagrans* en pellets comerciales no afecta a sus propiedades biológicas.
- 5.- Evaluar la actividad parasiticida de los hongos *M. circinelloides* y *D. flagrans* vehiculados en pellets nutricionales.
- 6.- Analizar si la adición de esporas de *M. circinelloides* y *D. flagrans* provoca alteraciones en los gránulos de concentrado durante su almacenamiento.

3.- UNIDAD TEMÁTICA



La utilización de hongos parasiticidas supone una solución sostenible para el control de algunos parásitos patógenos de vegetales y animales. Existen diferentes aislados fúngicos comerciales de aplicación en actividades hortofrutícolas, que se añaden en el pie de las plantas y evitan daños al sistema radicular.

Para avanzar en el control biológico de estas infecciones en herbívoros hay que tener en cuenta dos aspectos. El primero, es que normalmente sufren poliparasitismos, que se transmiten mediante diferentes estadios, unos dotados de movilidad (larvas) y en otros casos, estadios inmóviles (quistes, huevos). Por ello, es necesario disponer de hongos que tengan actividad diferente y complementaria. En la última década se ha realizado un número importante de estudios que han demostrado la actividad larvicida de *Duddigtonia flagrans* o *Monacrosporium thaumasium*, frente a las fases libres móviles de nematodos gastrointestinales de herbívoros (Casillas-Aguilar *et al.*, 2008; Braga *et al.*, 2009; Paz Silva *et al.*, 2011). Sin embargo, existe menos información acerca de hongos con efecto antagonista frente a huevos de trematodos (*Fasciola hepatica*, *Calicophoron daubneyi*), ascáridos (*Toxocara canis*, *Toxocara vitulorum*, *Ascaris suum*, *Baylisascaris procyonis*) o tricúridos (Silva *et al.*, 2010; Carvalho *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2011; Arias *et al.*, 2013a; Cazapal-Monteiro *et al.*, 2015; Paz-Silva *et al.*, 2016).

Las infecciones por trematodos *Fasciolidae* o *Paramphistomidae*, junto con las causadas por nematodos gastrointestinales, son muy frecuentes en animales en pastoreo sobre todo en zonas en las que la humedad no supone un factor limitante para que se desarrollen las fases del ciclo externo. Para que los huevos de los trematodos prosperen cuando salen con las heces y caen al suelo, es necesario que dispongan de un medio adecuado, con vegetación y presencia de agua, entonces en su interior se formará una larva ciliada, el miracidio, que infectará a moluscos anfibios del género *Lymnaea*. Considerando que una medida preventiva eficaz podría residir en evitar la formación del miracidio, y que no se disponía de información acerca de la actividad antagonista de algunas especies fúngicas sobre la evolución de los huevos de trematodos, se diseñó el **primer ensayo** de esta Tesis Doctoral (**Effect of the filamentous fungus *Mucor circinelloides* on the development of eggs of the rumen fluke *Calicophoron daubneyi* (Paramphistomidae); *Journal of Parasitology* –Thomson Reuters Impact Factor: 1,394-. 2017 Feb 6. doi: 10.1645/16-76**). El planteamiento consistió en obtener esporas del hongo ovicida *Mucor circinelloides* (cepa CECT 20824) en el medio líquido COPFr (patente PCT / ES2014 / 070110), y añadirlas a huevos del trematodo gástrico *C. daubneyi* en l) placas

Petri con agar-trigo, II) heces de bovinos infectados de forma natural, y III) en tubos con solución acuosa. La posible interferencia de *M. circinelloides* en la evolución de los huevos de *C. daubneyi* se midió estableciendo las proporciones de huevos no desarrollados, embrionados y no viables.

Como ya se ha mencionado en los **Antecedentes**, la mayoría de las experiencias con hongos parasiticidas se han realizado *in vitro* sobre placas Petri, y algunas sobre heces de animales infectados. Aunque la distribución de esporas directamente en el prado (suelo y heces) resulta muy eficaz para la prevención de infecciones parasitarias de animales en pastoreo (Paz-Silva *et al.*, 2011), no es factible en el caso de grandes extensiones de terreno, ni cuando la densidad ganadera es alta.

Partiendo de la idea de que los hongos antagonistas desarrollan su actividad en el suelo, y que las formas parasitarias se eliminan a través de las heces, con la administración oral de elementos fúngicos (micelio, conidios, esporas) los animales se convertirían en vehículos diseminadores de los mismos, que no actuarían en el hospedador sino que entrarían en contacto con los parásitos en la materia fecal. Es importante destacar que son escasas las pruebas con animales, entre otros motivos por la dificultad que entraña la administración frecuente de cantidades suficientes de esporas de hongos.

En diversos estudios se comprobó que las esporas de hongos ovicidas (*Pochonia*, *Paecilomyces*, *M. circinelloides*) y larvicidas (*Duddingtonia*, *Arthrobotrys*, *Monacrosporium*) resistían el tránsito a través del aparato digestivo de los animales, y que eran expulsadas al exterior con las heces sin experimentar alteraciones en su actividad (Fernández *et al.*, 1999a; Chandrawathani *et al.*, 2003; Mendoza de Gives *et al.*, 2006; Araújo *et al.*, 2009; Cortiñas *et al.*, 2015). La vía oral parece, por tanto, la manera idónea para poner en contacto las formas de propagación de los parásitos (huevos, larvas, etc.) y los hongos.

Hasta el momento, los experimentos han consistido en administrar soluciones acuosas de esporas por vía oral, en especial de *D. flagrans*, demostrándose que entre el 5 y el 20% de las esporas salen con las heces (Chandrawathani *et al.*, 2003; Ojeda-Robertos *et al.*, 2008). Aunque los resultados obtenidos son buenos, la administración acuosa de las esporas requiere personal para inmovilizar los

animales, de modo que en las ganaderías en extensivo sería necesario introducir los animales en la manga, lo que conllevaría la interrupción de las tareas diarias del ganadero.

También se han ensayado distintas formulaciones introduciendo los hongos en suplementos alimenticios (Ojeda-Robertos *et al.*, 2008; Sagüés *et al.*, 2011b). Añadiendo esporas de *D. flagrans* en solución acuosa a concentrado comercial, que se proporcionaba a équidos salvajes del parque zoológico "Marcelle Natureza" (Outeiro de Rei, Lugo, España), la eliminación fecal de huevos de strongílidos disminuyó de forma significativa en pocas semanas (Arias *et al.*, 2013b). En esta línea, se ha propuesto que la manera ideal para poner en contacto *D. flagrans* y larvas de nematodos gastrointestinales sería incluir las esporas en el concentrado (Casillas-Aguilar *et al.*, 2008). También se ha añadido micelio de *D. flagrans* o *M. thaumassium* a pellets de alginato (Braga *et al.*, 2009; Tavela *et al.*, 2013), y se han fabricado en el laboratorio pellets a los que se adiciona el micelio del hongo (Dias *et al.*, 2012). Fitz-Aranda *et al.* (2015) comprobaron una reducción de 67-82% de larvas de *Haemonchus contortus* al incluir clamidosporas de *D. flagrans* en pellets frescos fabricados manualmente.

En la alimentación de ganado vacuno y equino se utiliza con frecuencia concentrado en pellets, que aseguran una dieta equilibrada y evitan la ingesta selectiva de nutrientes. Para mejorar la salud, la productividad, y prevenir infecciones bacterianas, se utilizan ciertos aditivos, sobre todo hormonas sintéticas, ionóforos o probióticos (Gaggía *et al.*, 2010). En los últimos años, se comercializan concentrados que incluyen antihelmínticos como ivermectina, piperacina, praziquantel o febendazol (*Eraquell® Pellets*, Virbac, Australia; *Safe-Guard®0.5% Alfalfa-based pellets*, Merck, USA; *Equi Aid Strongyle pellet Horse Wormer*, Farnam, USA), que proporcionan un amplio espectro de eficacia frente a parásitos internos y externos.

En el proceso industrial de fabricación de concentrado alimentario existe una fase de mezcla, después de triturar y dosificar las materias primas, en la que tiene lugar la inyección de vapor de agua a 70-80°C durante un periodo de tiempo no superior a 30 segundos; este procedimiento facilita la obtención de un producto final homogéneo, y su paso a través de tambores de acero con los que se consigue el formato de pellet. Se trata de un paso crítico para la integridad de las estructuras en la mezcla, puesto que entre el vapor de agua y la fricción con los componentes de la unidad de

peletización provocan un incremento de la temperatura durante un periodo máximo de 90 segundos, en el que se puede incluso superar la temperatura de 80°C. El producto obtenido se enfría con aire hasta que alcanza la temperatura ambiente, y posteriormente se envasa en sacos.

Con el propósito de facilitar la administración de esporas de hongos a los animales y reducir la carga de trabajo a los propietarios (y asegurar así su ingesta), se consideró una solución eficaz la fabricación industrial de pellets con esporas. Se ha mencionado con anterioridad que en muchos casos se presentan infecciones por diferentes formas parasitarias, que se propagan mediante huevos/ooquistes/quistes o larvas. Esto implica que los procedimientos orientados a la prevención han de considerar mecanismos de acción frente a estos diferentes estadios (inmóviles y móviles). También se ha señalado la escasa información acerca de hongos ovicidas, centrada básicamente en la especie *Pochonia chlamydosporia*. Ensayos previos demostraron que es posible obtener de forma simultánea esporas de *M. circinelloides* y *D. flagrans* en medio líquido COPFr (Arias *et al.*, 2013a), hallazgo que facilita la acción conjunta frente a huevos y larvas de formas parasitarias. Teniendo en cuenta que no hay estudios previos acerca de la resistencia de las esporas de *M. circinelloides* al proceso industrial de fabricación de pellets, se planteó un **segundo ensayo** (**The capability of the fungus *Mucor circinelloides* to maintain parasitocidal activity after the industrial feed pelleting enhances the possibilities of biological control of livestock parasites. Biological Control –Thomson Reuters Impact Factor: 2,012- Volume 92, 2016, Pages 38–44**) en el que esporas del hongo ovicida *M. circinelloides* obtenidas en medio COPFr se expusieron a 72°C durante diferentes periodos de tiempo (10 s, 30 s, 1 min, 2 min, 5 min y 10 min) y después se evaluó si crecían en placas Petri, y si reducían la viabilidad de huevos de *Fasciola hepatica* y *Parascaris equorum*. Posteriormente, durante la fase de mezcla de la fabricación de pellets para la alimentación de terneras y caballos (factoría de Nanta en Begonte, Lugo, España), se añadieron esporas del hongo. En último lugar, se confirmó que las esporas incluidas en los pellets conservaban su capacidad para desarrollarse y provocar alteraciones permanentes en los huevos de los trematodos y ascáridos.

Para determinar si las esporas de *D. flagrans* resistían el proceso y era posible incluirlas en pellets nutricionales, se planteó un **tercer ensayo** (**Formulating *Duddingtonia flagrans* in nutritional pellets for the sustainable control of equine strongyles. Journal of Science, Technology and Environment; ISSN: 2227-9296. Volume 5, Issue 1, Article ID 3000249, 16 pages, 2015**), que consistió en obtener esporas de *D. flagrans* en el medio de cultivo líquido COPFr, y exponerlas a 72°C durante 10 s, 30 s, 1

min, 2 min, 5 min y 10 min. A continuación se comprobó que las clamidosporas se desarrollaban y mantenían su actividad larvicida tras el tratamiento térmico. El paso siguiente consistió en elaborar pellets para la alimentación de equinos con esporas, en la fábrica de Nanta situada en Begonte (Lugo, España). Finalmente, se analizó si a partir de los pellets, se desarrollaba micelio, y si se había conservado el efecto larvicida.



4.- PUBLICACIONES



4.1. PUBLICACIÓN Nº 1.

Effect of the filamentous fungus *Mucor circinelloides* on the development of eggs of the rumen fluke *Calicophoron daubneyi* (Paramphistomidae). *Journal of Parasitology*. 2017 Feb 6. doi: 10.1645/16-76

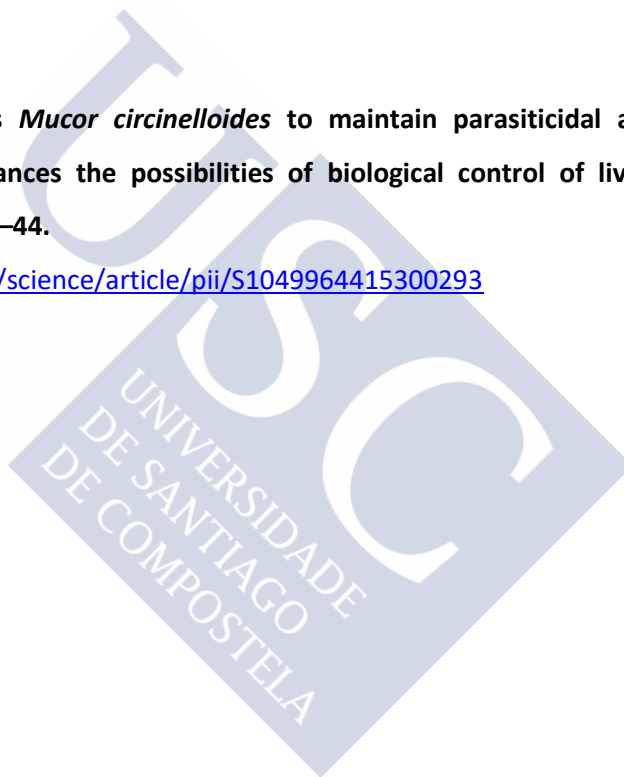
www.journalofparasitology.org/doi/pdf/10.1645/16-76



4.2. PUBLICACIÓN Nº 2.

The capability of the fungus *Mucor circinelloides* to maintain parasiticial activity after the industrial feed pelleting enhances the possibilities of biological control of livestock parasites. *Biological Control* 2016. 92: 38–44.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1049964415300293>



4.3. PUBLICACIÓN Nº 3.

Formulating *Duddingtonia flagrans* in nutritional pellets for the sustainable control of equine strongyles. Journal of Science, Technology and Environment. 2015. ISSN: 2227-9296. Volume 5, Issue 1, Article ID 3000249, 16 pages.

<http://www.ScienceSights.com/j/sp/3000249-1000278-pub.pdf>

http://sciencesights.com/j/ap_volume_list.php?x=0&j=JSTE





5.- DISCUSIÓN GENERAL



El control de las infecciones parasitarias en animales en pastoreo se basa principalmente en la aplicación de tratamientos antihelmínticos, y en raras ocasiones se aplican medidas complementarias sobre las fases infectivas libres, los hospedadores intermediarios, o los prados (Bloemhoff *et al.*, 2014). Frente a la paramphistomosis, se recomiendan las salicilanilidas, de ellas la oxiclozanida es la más eficaz, mientras que se han obtenido resultados desiguales con closantel administrado por diferentes vías (Arias *et al.*, 2013d; Malrait *et al.*, 2015). A pesar que desde hace años se sabe que en Europa (Portugal, España, Francia, Italia, Irlanda y Reino Unido) la prevalencia de vacas infectadas por *Calicophoron daubneyi* es alta (Sargison *et al.*, 2016), la oxiclozanida no ha estado disponible en todos estos países hasta fechas muy recientes en las que se ha presentado en el mercado el producto Rumenil® (oxiclozanida 34 mg; Chanelle Pharmaceuticals Manufacturing Ltd., Loughrea, Co. Galway, Irlanda), con un periodo de supresión de 28 días para ganado vacuno de carne, y tan solo de 72 horas en el de leche. Aunque la terapia antihelmíntica resulte eficaz, el riesgo de infección persiste si no se aplican medidas para luchar contra las etapas de los trematodos en el suelo o en los caracoles acuáticos.

Para evitar la infección por trematodos, desde un enfoque clásico, se recomiendan medidas encaminadas a reducir la presencia de metacercarias en la hierba o evitar el acceso del ganado a las zonas encharcadas. La cantidad de metacercarias depende a su vez de la presencia de los caracoles (*Lymnaea* spp.) que actúan como hospedadores intermediarios, en definitiva, la medida propuesta es eliminar los caracoles que puedan encontrarse en hábitats húmedos. A pesar de la eficacia de algunos molusquicidas químicos como la cianamida cálcica o la niclosamida (una salicilanilida), estos productos no son específicos contra los hospedadores intermediarios de trematodos, y aún menos, diferencian entre caracoles infectados y no infectados (Henderson y Triebkorn, 2002; Cringoli y Rinaldi, 2013). Buscando un enfoque más ecologista se ha probado con éxito la actividad molusquicida de más de 70 extractos vegetales, pero la falta de especificidad y su ecotoxicidad siguen constituyendo un serio problema (Marston y Hostettman, 1985), y tampoco existe acuerdo en la forma apropiada para su distribución (Hanif y Singh, 2013). El vallado de las zonas encharcadas no es fácil de fácil aplicación en muchas ocasiones.

Diferentes ensayos realizados sobre placas de Petri y muestras fecales demostraron que ciertos hongos filamentosos del suelo tenían una actividad ovicida muy valiosa frente a helmintos como *Fasciola hepatica*, *Moniezia* sp., *Toxocara canis* y *Trichuris vulpis*, siendo *Paecilomyces lilacinus* y

Pochonia chlamydosporia las especies más empleadas (Braga *et al.*, 2008a,b; Silva *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2011; Dias *et al.*, 2013). No obstante, no se dispone de datos sobre su posible actividad frente a huevos de trematodos en ambientes acuáticos, aunque únicamente los que prosperan en estas condiciones son los responsables del mantenimiento del ciclo.

En la presente investigación se ha probado la capacidad del hongo filamentoso saprofítico *Mucor circinelloides* para disminuir el desarrollo de los miracidios en el interior de los huevos de *C. daubneyi*. En contacto con los huevos del trematodo gástrico, las hifas desarrolladas a partir de las esporas se adhirieron a las cubiertas, penetraron y destruyeron los embriones del interior, por lo que la actividad ovicida se definió como tipo 3 (Lýsek *et al.*, 1982). Investigaciones previas señalaron el mismo efecto de *M. circinelloides* sobre los huevos del trematodo *Fasciola hepatica* (Cortiñas *et al.*, 2015). Apenas existe información sobre la actividad de los hongos frente a los huevos de trematodos, y la mayor parte se obtuvo con el hongo *Pochonia chlamydosporia* (anteriormente *Verticillium chlamydosporium*) (Dias *et al.*, 2012, 2013). Se ha demostrado la destrucción completa de huevos del anfistómido *Gigantocotyle explanatum* siete días después de su exposición al hongo *Verticillium chlamydosporium* (De *et al.*, 2012).

Los huevos eliminados por Paramphistomidae adultos llegan al suelo a través de las heces. Después de un período de 17 a 35 días, dependiendo de las condiciones ambientales (especialmente humedad y temperatura), en el interior se desarrollan los miracidios que posteriormente salen levantando el opérculo (Abrous *et al.*, 1999). En la presente investigación, se vertieron cuatro dosis diferentes de esporas de *M. circinelloides* sobre muestras fecales de vacas que excretaban huevos del trematodo ruminal y se mantuvo una muestra de heces sin hongos como testigo. Los primeros huevos embrionados se detectaron al día 16, transcurridos 50 días a 15-18°C y luz natural, el número de huevos con miracidio, no embrionados e inviábiles fue significativamente menor en las heces que habían estado en contacto con el hongo que en las del grupo testigo (30-40%). En esta experiencia no se encontraron diferencias en el deterioro de los huevos al utilizar distintas cantidades de esporas. Sanabria y Romero (2008) observaron miracidios en el 45% de los huevos de anfistomas después de un periodo superior a 28 días.

La presencia de agua es indispensable durante la fase externa del ciclo de vida de Paramphistomidae, ya que sus hospedadores intermediarios son caracoles anfibios (Augot *et al.*, 1996). El agua es también indispensable para que los miracidios nadan en busca de los caracoles y los infecten para completar las etapas de esporocisto, redia y cercaria (Malrait *et al.*, 2015). En base a investigaciones anteriores que demostraron que *M. circumloides* crece en un cultivo sumergido (Arias *et al.*, 2013a; Cortiñas *et al.*, 2015), se analizó el efecto antagonista de este hongo frente a huevos de *C. daubneyi* en soluciones acuosas. Para tratar de simular el ambiente donde se pueden encontrar en condiciones de campo, en la investigación actual los huevos de *C. daubneyi* se mantuvieron en agua a temperatura ambiente (16-19°C) y luz natural, y la embrionación comenzó transcurridos 17 días. Se han detectado miracidios de *C. daubneyi* después de incubar los huevos a 20°C durante 20 días en la oscuridad (Augot *et al.*, 1996), mientras que el mayor nivel de desarrollo se alcanzó manteniéndolos 28 días a 27°C y fotoperiodo normal (Chryssafidis *et al.*, 2015). Burgu (1981) observó que hacían falta un mínimo de 27 días para que se formaran miracidios cuando los huevos de *Paramphistomum cervi* se mantenían a 17°C, y eran suficientes 13 días al aumentar la temperatura hasta 26-27°C. En la investigación actual, la adición de esporas de *M. circumloides* a los huevos de *C. daubneyi* en soluciones acuosas redujo los porcentajes de huevos embrionados en más de la mitad con respecto a los testigos, al igual que sucedió cuando se añadieron esporas directamente sobre las muestras de heces. Se observó que el número de huevos no desarrollados y embrionados disminuyó significativamente, y aumentaron los no viables, concluyéndose que *M. circumloides* tiene una influencia negativa en el desarrollo del ciclo del trematodo ruminal en medio acuoso.

Además de la desparasitación estratégica de los rumiantes, se requieren medidas adicionales para limitar la reinfección de los animales. La capacidad del hongo *M. circumloides* para evitar la formación de miracidios dentro de los huevos, tanto si estos se encuentran en las heces o en agua, resulta muy útil para prevenir la infección de los caracoles y por lo tanto para evitar la liberación de las cercarias, como consecuencia se encontraría un menor número de metacercarias en el prado, lo que reduciría el riesgo de infección de los animales.

Una cuestión de suma importancia para poder llevar a la práctica el control de trematodos utilizando hongos ovicidas, es encontrar una manera eficiente y sostenible para poner en contacto las esporas y los huevos. Aunque las esporas se pueden verter directamente en el suelo (Arias *et al.*, 2013b), la tarea resulta muy engorrosa cuando se trata de grandes extensiones con alta densidad ganadera.

Los trematodos utilizan ciclos indirectos hasta llegar a la fase infectiva para el hospedador definitivo. Otros helmintos como los ascáridos, eliminan huevos con las heces del hospedador que evolucionan en el suelo y son capaces de permanecer viables e infectivos durante meses e incluso años bajo condiciones adecuadas. Las acciones más comunes para evitar esta infección del ganado se orientan hacia una higiene adecuada y la desparasitación frecuente para reducir la contaminación parasitaria en el suelo. Como se mencionó previamente para los trematodos, un enfoque interesante y poco estudiado para prevenir la ascariosis podría consistir en reducir la viabilidad de los huevos, inhibiendo así la aparición de las larvas en su interior y de esta manera el riesgo de infección de esta geohelmintosis.

Teniendo en cuenta que los huevos de los parásitos del aparato digestivo caen al suelo con las heces, parece lógico que incorporar las esporas a la alimentación podría resultar una estrategia muy útil para asegurar el contacto entre agonistas y antagonistas. Dias *et al.*, (2012) elaboraron manualmente pellets que contenían esporas de *Pochonia chlamydosporia* y comprobaron que su administración a ganado vacuno en pastoreo redujo el riesgo de reinfección por *F. hepatica*.

Es escasa la información disponible sobre la fabricación industrial de pellets con esporas de hongos parasiticidas, en tanto que se han llevado a cabo investigaciones previas que implican la fabricación artesanal de pellets con esporas de hongos o micelio frente a plagas de vegetales y parásitos de animales. Mediante gránulos preparados con aislados de *Trichoderma* spp. y *Gliocladium virens*, Lewis y Papavizas (1985) señalaron que se reducía la supervivencia de *Rhizoctonia solani* en semillas de remolacha. No hay estudios previos sobre *M. circinelloides*, pero Fitz-Aranda *et al.* (2015) mostraron una reducción de 67-82% de larvas de *Haemonchus contortus* al añadir las clamidosporas de *D. flagrans* en pellets hechos a mano.

Al pensar en la posibilidad de fabricar industrialmente gránulos alimentarios con esporas de hongos parasiticidas, primero hay que comprobar *in vitro* si las esporas son capaces de sobrevivir a las condiciones de temperatura que deberán soportar durante el proceso. Durante la fase de peletización, se añade vapor de agua a la mezcla alimentaria para proporcionar lubricación durante los procesos de compresión y extrusión, y conseguir la gelatinización del almidón crudo de la superficie de los ingredientes vegetales. Debido a que durante los 90 segundos que transcurren

después de la entrada de los ingredientes en el molino de pellets se alcanzan temperaturas de 70-75°C, se sometieron soluciones acuosas de *M. circinelloides* a 72°C durante periodos de 10 segundos a 10 minutos. Posteriormente las esporas se sembraron en placas con medio agar-agua y los resultados mostraron que, a pesar del estrés térmico, no sólo conservaban sus características biológicas, sino que también mantenían la actividad ovicida reduciendo la viabilidad de los huevos de *F. hepatica* en un 54-58% y de los huevos de *P. equorum* en un 61-67%.

Después de comprobar la supervivencia de *Mucor* se procedió a la inclusión de una solución de una solución acuosa de esporas en pienso fabricado industrialmente y se comprobó al sembrar los pellets que las hifas crecían a partir del cuarto día.

Dependiendo de las condiciones climáticas, los huevos de *P. equorum* excretados en las heces de los caballos se desarrollan hasta la fase infectiva después de un período de 3 a 6 semanas. En la presente investigación, los huevos de *P. equorum* expuestos durante 4 semanas (28 días) a esporas de *M. circinelloides* incluidas en pellets industriales disminuyeron su viabilidad en un 61-67%.

Los huevos de *F. hepatica* excretados en las heces no están desarrollados y el proceso de formación del miracidio dura 2-4 semanas a 23-26°C, o más si las temperaturas son inferiores (Andrews, 1999). En la investigación actual, la viabilidad de los huevos de *F. hepatica* disminuyó en un 60% después de su exposición durante 4 semanas a las esporas de *M. circinelloides* contenidas en pellets manufacturados industrialmente. Estos resultados concuerdan con los datos obtenidos con gránulos hechos a mano que contenían micelio de *P. chlamydosporia* (Dias *et al.*, 2013).

Los nematodos gastrointestinales afectan a la mayoría de los animales cuya base alimentaria es el pasto aunque vivan en zonas con condiciones climáticas que no favorezcan el desarrollo de la fase exógena de los parásitos en determinadas épocas del año. Al igual que sucede con todas las especies de hongos filamentosos, bajo condiciones naturales las clamidosporas de *Duddingtonia flagrans* germinan en el suelo y originan una red de hifas adhesivas donde las larvas de nematodos parásitos son atrapadas y finalmente digeridas (Mendoza de Gives *et al.*, 2006). Considerando que la presencia de estas clamidosporas en las heces de animales que excretaban huevos de nematodos estrongilados podría reducir sus posibilidades de desarrollarse hasta larvas L3 (infectivas) y de desplazarse por el suelo, se han conducido diferentes estudios en los que se ha demostrado la utilidad de la

administración oral de clamidiosporas de *D. flagrans* para controlar el riesgo de infección por nematodos parásitos gastrointestinales en ovinos, bovinos o equinos (Fernández *et al.*, 1999a; Waller *et al.*, 2001b; Dimander *et al.*, 2003; Mendoza de Gives *et al.*, 2006). La adición de clamidiosporas al concentrado (como premezcla) proporcionó resultados altamente satisfactorios para reducir el riesgo de infección por estróngilos en équidos cautivos, aunque requería la preparación de la mezcla justo antes de alimentar a los animales (Arias *et al.*, 2013b).

Con el fin de mejorar su administración, se ha probado con éxito la inmovilización de esporas dentro de polímeros como alginato y carragenano (Lewis y Papavizas, 1985; Casillas-Aguilar *et al.*, 2008; Fitz-Aranda *et al.*, 2015), y en otras investigaciones se empleó micelio (Assis *et al.*, 2013). Otra opción ha consistido en incorporar esporas de *D. flagrans* a bloques energéticos para el control de nematodos gastrointestinales en ovejas (Sagüés *et al.*, 2011a), y más recientemente a polímeros a base de proteína de soja, en forma de dispositivo de liberación controlada (Sagüés *et al.*, 2014).

Todos los estudios mencionados se basan en productos elaborados manualmente. Sin embargo, la posibilidad de la fabricación industrial de piensos con esporas mejoraría su distribución y facilitaría su aplicación, minimizando el trabajo adicional para los cuidadores y asegurando que las esporas se encuentren en abundancia en las heces de los animales, donde las larvas eclosionan a partir de los huevos de estróngilos (Corning, 2009). Por ello, se planteó la adición de esporas de *D. flagrans* durante la fabricación industrial de pellets nutricionales. Previamente, en los ensayos *in vitro* se corroboró que no existían diferencias entre las esporas testigo (sin calentamiento) y las calentadas a 72°C durante ≤ 5 min, ni en el crecimiento micelial ni en la producción de esporas (esporogénesis). El efecto parasitocida (atrapamiento de larvas) fue también similar (94% de reducción de larvas de estróngilos) al sembrar placas con clamidiosporas testigo o con aquellas calentadas 5 min como máximo.

A continuación se procedió a formular las clamidiosporas en pellets nutritivos, añadiendo $2 \cdot 10^6$ clamidiosporas / Kg en la fase de mezcla de la fabricación de los gránulos. El análisis de las tasas de crecimiento micelial y la producción de clamidiosporas (esporogénesis) mostraron valores similares a los obtenidos en el ensayo *in vitro*, mientras que las larvas infectivas disminuyeron entre el 87% y el 92%. En un estudio con pellets elaborados a mano con clamidiosporas de *D. flagrans* se comprobó que los recuentos de L3 de *Haemonchus contortus* disminuyeron entre 67% y 82% (Fitz-Aranda *et al.*, 2015).

El control de las enfermedades parasitarias en animales en pastoreo se basa principalmente en la administración de tratamientos farmacológicos, que actúan sobre los animales pero no sobre las fases de vida libre en el suelo, por lo que los caballos se infectan de nuevo, y resulta necesario volver a desparasitar a intervalos de 6 semanas (Nielsen *et al.*, 2014). También es importante resaltar que ciertos parasiticidas tienen un efecto nocivo sobre organismos beneficiosos del suelo, como los escarabajos (Hempel *et al.*, 2006), y el uso excesivo de antihelmínticos puede conducir a la aparición de parásitos resistentes (Traversa *et al.*, 2009). Para tratar de limitar este problema, se ha recomendado la terapia selectiva de aquellos caballos que superen un valor de corte predeterminado de huevos por gramo de heces (Francisco *et al.*, 2012; Nielsen *et al.*, 2014).

En base a que en las heces se produce la eliminación de huevos, la acción preventiva debería dirigirse a reducir su viabilidad y capacidad de desarrollo, disminuyendo de este modo su presencia en el suelo (y el forraje), lo que se traduciría en un menor riesgo de infección para los animales en pastoreo. Se han recomendado varias estrategias para prevenir la infección en caballos de pastoreo, que consisten principalmente en la eliminación periódica de heces del suelo, recorte o rotación de pastos, pero su eficacia depende de que su aplicación resulte fácil, puesto que si las prácticas recomendadas se convierten en una tarea adicional para cuidadores, propietarios o ganaderos, rara vez se llevará a cabo (Corbett *et al.*, 2014).

Todos los estudios mencionados se basan en productos elaborados manualmente, y a pesar de su innegable utilidad, pueden identificarse ciertos inconvenientes. En primer lugar, parece problemático asegurar la homogeneidad del producto final, lo cual podría conducir a resultados inesperados que probablemente se interpretarían de forma errónea. En segundo lugar, la elaboración manual de pellets aumenta las tareas rutinarias de los cuidadores de animales, limitando su utilización práctica. Otro punto (tercero) a tener en cuenta consiste en la conservación del pienso. Investigaciones previas realizadas con *D. flagrans* no proporcionaron diferencias cuando las clamidosporas se conservaron dos meses en condiciones de laboratorio, al aire libre o en refrigeración (Fitz-Aranda *et al.*, 2015). Sin embargo, la germinación de esporas y el crecimiento de hongos pueden ocurrir en pellets hechos a mano, debido a que un importante nivel de humedad residual permanece después de ser secados al sol. La presencia de hifas alrededor de los gránulos podría llevar a los agricultores a

pensar en una contaminación posiblemente peligrosa, limitando su administración (Chandrawathani *et al.*, 2003).

Por todo ello, la posibilidad de la fabricación industrial de piensos con esporas mejoraría su distribución y facilitaría su aplicación, minimizando el trabajo adicional para los cuidadores y asegurando que las esporas se encuentren con frecuencia en las heces de los animales, donde las larvas eclosionan a partir de los huevos de estrongilos (Corning, 2009). Esto se convierte en un estímulo para que las esporas de *D. flagrans* formen hifas y atrapen las larvas de los fuertes, reduciendo el riesgo de infección en los caballos en pastoreo (Braga *et al.*, 2009). Es importante tener en cuenta que en la fabricación industrial de gránulos alimentarios, la posterior compresión y extrusión a través de orificios en un troquel de anillo, junto con la fricción, aumentan aún más la temperatura del alimento hasta casi 92°C.

El examen visual de los gránulos no mostró ningún signo de degradación, alteración, olor anormal o crecimiento fúngico. Además, en la investigación actual tampoco se registraron diferencias en cuanto al intervalo de almacenamiento de los pellets que contienen esporas de *M. circinelloides* o *D. flagrans* durante 6 meses. Resulta muy notorio señalar que la mayoría de los fabricantes garantiza la calidad del producto final durante 3 meses.

En vista de los resultados obtenidos, se concluye que la fabricación industrial de alimento peletizado con esporas de *M. circinelloides* o *D. flagrans* proporciona una solución muy provechosa debido a que I) las esporas se mezclan mecánicamente con la mezcla de nutrientes y por lo tanto se obtiene un producto homogéneo; II) no supone ningún trabajo adicional para los cuidadores de animales, lo que garantiza su utilización, y III) los gránulos fabricados industrialmente contienen una humedad residual inferior al 12%, que asegura la conservación correcta de las características del producto alimentario durante periodos de tiempo prolongados.

6.- CONCLUSIONES



Los resultados obtenidos en el presente estudio han permitido **CONCLUIR** que:

- 1.- El hongo filamentoso saprofito *Mucor circinelloides* desarrolla un efecto ovicida de tipo 3 sobre los huevos del trematodo ruminal *Calicophoron daubneyi*, porque las hifas son capaces de penetrar la cubierta y destruir el embrión.
- 2.- La capacidad de las esporas de *M. circinelloides* para desarrollarse y dañar los huevos de *C. daubneyi* en medios acuosos previene la aparición de miracidios, lo que resulta muy útil para disminuir el riesgo de infección por este trematodo.
- 3.- Es posible fabricar de forma comercial concentrado en forma de pellets o gránulos con esporas de *Duddingtonia flagrans* y *M. circinelloides*, debido a su resistencia a las condiciones de elaboración industrial.
- 4.- La fabricación industrial de pellets con esporas de *M. circinelloides* y *D. flagrans* no afecta a la morfogénesis ni a la esporogénesis de estos hongos filamentosos.
- 5.- La actividad parasiticida de *M. circinelloides* (ovicida) y *D. flagrans* (larvicida) no resulta alterada cuando se incorporan esporas de estos hongos en la fase de mezcla de la elaboración de gránulos de concentrado alimentario.
- 6.- La adición de esporas de *M. circinelloides* y *D. flagrans* en el proceso de fabricación industrial de concentrado en pellets no induce alteraciones durante el periodo de caducidad de estos gránulos.

7.- conclusions

UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

The results obtained in the present study have allowed **CONCLUDE** that:

- 1.- The saprophytic filamentous fungus *Mucor circinelloides* is able to develop a type 3 ovicidal effect on the eggs of the ruminal trematode *Calicophoron daubneyi*, because the hyphae can penetrate the cover and destroy the inner embryo.
- 2.- The ability of the spores of *M. circinelloides* to develop and damage the eggs of *C. daubneyi* in aqueous media prevents the occurrence of miracidia, which is very useful to decrease the risk of infection by this trematode.
- 3.- It is possible to manufacture commercial feedstuff in pellets or granules with spores of *M. circinelloides* and *Duddingtonia flagrans*, due to their resistance to the conditions of industrial elaboration.
- 4.- Industrial manufacturing of pellets with spores of *M. circinelloides* and *D. flagrans* does not affect the morphogenesis or sporogenesis of these filamentous fungi.
- 5.- Addition of spores of *M. circinelloides* and *D. flagrans* to pelleted feed does not reduce their parasitocidal activity (ovicidal and larvicidal, respectively).
- 6.- The presence of spores of *M. circinelloides* and *D. flagrans* in pellets industrially manufactured does not provoke any kind of alteration during the period of expiration of these granules.

8.- RESUMEN



El control de parásitos que afectan a animales requiere de mayor investigación sobre procedimientos para prevenir su infección y reducir la administración de antiparasitarios a aquellas situaciones estrictamente necesarias. Con este enfoque se conseguirá mantener la eficacia de los productos antiparasitarios (disminuir el riesgo de eficacia inferior a la esperada, aparición de resistencia...) y evitar posibles alteraciones del ambiente, provocadas por la liberación de metabolitos que resultan ecotóxicos.

Entre los aspectos a resolver en el control biológico de parásitos, destaca la ausencia de información sobre algunos estadios que se desarrollan en el medio. Se conoce con detalle la acción de algunos hongos sobre las larvas de ciertos nematodos (estrongilados en especial), que abandonan los huevos y alcanzan la fase infectiva (L3) en el suelo. En los últimos años se ha obtenido información acerca de la actividad de diferentes especies fúngicas sobre los huevos de nematodos, centrándose en aquellos en los que la larva que se forma en su interior no abandona el huevo (en condiciones normales), como sucede en nematodos ascáridos o tricúridos. Sin embargo, apenas existe conocimiento del efecto de hongos parasitocidas sobre la fase exógena del ciclo de los trematodos, que a diferencia de los de nematodos que se transmiten por la ingestión de larvas o de huevos con larva en el interior, la fase infectiva –metacercaria- se origina después de que el embrión ciliado que abandona el huevo es capaz de infectar al hospedador intermediario (caracol acuático), en el que se suceden una serie de fases que finalizan en la formación de cercarias (precursores de las metacercarias).

Con el propósito de determinar la posible actividad del hongo ovidica *Mucor circinelloides* en el desarrollo de trematodos cuyo ciclo transcurre en ambientes húmedos (*Fasciolidae*, *Paramphistomidae*), se llevó a cabo un **primer ensayo** que consistió en añadir esporas del hongo sobre huevos de *Calicophoron daubneyi* en placas Petri, heces de ganado vacuno, y en solución acuosa. En primer lugar, se aislaron huevos del trematodo gástrico de heces de vacas con infección natural, colocándose 250 en cada una; posteriormente, un lote recibió $5 \cdot 10^5$ esporas, y el otro agua destilada. A partir del día 6 se detectó crecimiento de micelio, y que las hifas se adherían a la cubierta, penetraban y destruían el interior, concluyéndose que se trataba de un efecto ovidica de tipo 3.

Sobre heces de bovinos que eliminaban huevos de *C. daubneyi*, se añadieron diferentes soluciones de esporas (10^6 , $2 \cdot 10^6$, $3 \cdot 10^6$ y $4 \cdot 10^6$), que se mantuvieron durante 50 días en cajas colocadas en un prado arbolado. Las muestras se analizaron mediante sedimentación, y los huevos se clasificaron en *viabiles no embrionados*, *viabiles embrionados* (con miracidio) y *no viabiles* (con vacuolas, destrucción de estructuras internas o ruptura de la cubierta). Mediante sedimentación se comprobó que los

huevos no embrionados disminuían de forma significativa a partir del día 16, y que aparecían los embrionados entre los días 16-20. También se demostró un incremento en los recuentos de huevos no viables hasta el final del ensayo. El porcentaje de huevos expuesto a *M. circinelloides* que contenían un miracidio resultó la mitad que en los testigos. No se encontraron diferencias entre las diferentes concentraciones de esporas empleadas.

Se colocaron huevos de *C. daubneyi* en tubos eppendorf (250/tubo), y posteriormente se añadieron a un lote $2 \cdot 10^6$ esporas de *M. circinelloides*, mientras que en otro lote se añadió agua destilada (testigos). Todos los tubos se mantuvieron a temperatura ambiente y luz natural. La adición de esporas a las soluciones líquidas provocó que solo el 17% de los huevos de *C. daubneyi* desarrollase un miracidio en el interior, en contraposición al 45% detectado en los testigos. Se concluyó que *M. circinelloides* constituye una herramienta muy útil para disminuir el riesgo de infección por trematodos *Fasciolidae* o *Paramphistomidae*, puesto que puede desarrollar una actividad ovicida de tipo 3 tanto en medio sólido como líquido.

Otro aspecto importante en el empleo de hongos como agentes de control biológico consiste en asegurar una correcta distribución, que no suponga una tarea *extra* imposible de asumir para ganaderos o propietarios de animales, y para ello es necesario disponer de formulaciones adecuadas. Para asegurar la alimentación equilibrada de animales de renta, reciben con frecuencia (diariamente) concentrado (pienso), formulación que podría resultar muy adecuada para poner en contacto en las heces las formas parasitarias con sus antagonistas, hongos parasiticidas. Con esta estrategia se persigue limitar la viabilidad y el desarrollo de los parásitos en la materia fecal, disminuyendo sus posibilidades de alcanzar el estadio infectivo y de este modo el riesgo de infección. Entre las diferentes opciones, la más interesante sería la fabricación industrial de pellets con esporas, porque cumpliría los requisitos indicados previamente.

Para comprobar si las propiedades biológicas (morfogénesis, esporogénesis, actividad antagonista) de las esporas de hongos parasiticidas se podrían ver afectadas durante el proceso de fabricación de concentrado alimentario en pellets, se realizaron dos pruebas. En el **segundo ensayo** se incubaron soluciones acuosas con $2 \cdot 10^3$ esporas de *M. circinelloides* a una temperatura de 72°C durante 10 segundos, 30 segundos y 1, 2, 5 y 10 minutos. A continuación se sembraron en placas Petri con agar-trigo, que se mantuvieron en estufa a 25°C y oscuridad durante 20 días.

En el fondo de las placas se dibujaron ocho círculos concéntricos de 2 cm² para facilitar la medición del desarrollo del micelio, y el recuento del número de esporas al microscopio óptico. El análisis de

posibles alteraciones sobre las esporas se llevó a cabo colocando entre porta y cubre 50 μ L de cada una de las soluciones con esporas, que se examinaron bajo microscopio óptico.

Para evaluar la actividad parasiticida de las esporas, se añadieron 200 huevos del trematodo *Fasciola hepatica* o del nematodo *Parascaris equorum* sobre placas de agar-trigo en las que previamente se dispusieron las esporas sometidas a tratamiento térmico.

Al emplear las esporas expuestas a 72°C durante un periodo inferior a 10 min, el desarrollo de micelio se hizo evidente a partir del cuarto día, y la producción de esporas del octavo en adelante. El porcentaje de viabilidad de los huevos de *F. hepatica* se redujo en un 21-63%, y la *P. equorum* en un 11-66%. Estos porcentajes resultaron significativamente superiores a las de los testigos (no exposición) y a las incubadas durante 10 min.

En la fábrica de NANTA en Begonte (Lugo, España) se elaboraron pellets con esporas de *M. circinelloides* para la alimentación de caballos (Forequus®) y de ganado vacuno de recría (Recría 18®). En estos concentrados se observó crecimiento de las hifas a partir del cuarto día.

Al estudiar la actividad ovicida del hongo incluido en los pellets, se detectó que la viabilidad de los huevos de *F. hepatica* se reducía en un 54-58%, y la de los huevos de *P. equorum* en un 61-67%.

Después de examinar la apariencia de los pellets (con y sin esporas de *M. circinelloides*), almacenados durante seis meses en sacos de pienso, no hubo evidencia aparente de daños o anomalías.

En el **tercer ensayo** se llevó a cabo una prueba similar a la anterior, pero empleando el hongo atrapanematodos *D. flagrans*. El crecimiento del micelio se midió cada cinco días en cuatro placas de cada grupo de temperatura, incluido el grupo control.

El análisis morfológico mostró que no existían alteraciones en las clamidosporas hasta que el periodo de incubación alcanzaba los 10 minutos. En las placas testigo (sembradas con esporas no expuestas a calor) y en las que se colocaron esporas incubadas hasta 5 minutos, a los cuatro días se observaron hifas, y a los ocho clamidosporas. El calentamiento hasta los 10 minutos provocó un crecimiento escaso, lento e irregular del micelio, y prácticamente no se originaron nuevas esporas, diferencias que resultaron estadísticamente significativas ($\chi^2= 28,765$, $P= 0,001$).

Para evaluar la actividad parasiticida de las esporas sometidas a estrés térmico, se obtuvieron larvas L3 de estróngilos a partir de huevos excretados en las heces de caballos con infección natural. En el

centro de las placas Petri sembradas con esporas sometidas a 72°C durante diferentes intervalos de tiempo, se añadieron 500 L3. Transcurridos 15 días a 25°C y oscuridad, las placas se observaron al microscopio para cuantificar la formación de trampas. Finalmente, el agar se colocó en un dispositivo Baermann para recuperar las larvas por la técnica de migración. De este modo, se comprobó que en las placas que tenían esporas expuestas a 72°C menos de 10 minutos, el número de L3 recuperadas disminuyó de forma significativa (94-97%) ($\chi^2= 26,187$, $P= 0,001$). La cantidad de L3 en las placas con esporas calentadas durante 10 minutos fue similar a la de las placas control ($\chi^2= 0,795$, $P= 0,373$).

Se demostró una correlación positiva entre el crecimiento del micelio y la cantidad de esporas (coeficiente de correlación= 0,795, $P= 0,001$), y entre el porcentaje de reducción de L3 y el crecimiento del micelio (CC= 0,492, $P= 0,001$), y los recuentos de clamidosporas (CC= 0,325, $P= 0,017$).

De estos resultados se concluyó que el tratamiento térmico a 72°C durante cinco minutos no afecta las propiedades biológicas de las clamidosporas de *D. flagrans*, y por lo tanto serían capaces de sobrevivir al proceso de peletización sin experimentar alteraciones morfológicas, ni en la esporogénesis ni en su actividad parasitica. Por ello, el paso siguiente consistió en añadir clamidosporas durante la fabricación de pellets para la alimentación de caballos (ProHorse Club®) en las instalaciones industriales de NANTA en Begonte (Lugo, España). Esta actividad se pudo realizar gracias al permiso otorgado por la *Consellería do Medio Rural e do Mar* (Xunta de Galicia). En concreto, se vertieron 15-20 litros de medio de cultivo COPFr (patente PCT / ES2014 / 070110) por cada tonelada de producto alimentario, obteniéndose una concentración final de $2 \cdot 10^6$ esporas/Kg de pienso.

Para comprobar la actividad biológica de los pellets con esporas de *Duddingtonia*, se disolvieron 20 gramos de ProHorse Club® en 200 mL de agua, y se sembraron en placas con agar-agua. A partir del quinto día se observó desarrollo de hifas, y esporas desde el 17º en adelante. Finalmente, se añadieron larvas L3 de estróngilos, comprobándose una reducción significativa en comparación con los pellets sin esporas (87-92%) ($\chi^2= 9,396$, $P= 0,002$). No se demostraron diferencias entre los pellets analizados el mismo día de su fabricación, a los 3 y a los 6 meses. Estos datos confirman los resultados obtenidos *in vitro*, y corroboran la posibilidad de fabricar pellets comerciales con clamidosporas de *D. flagrans*.

De los resultados obtenidos en el presente trabajo se concluyó que *Mucor circinelloides* desarrolla un efecto ovicida de tipo 3 sobre los huevos del trematodo ruminal *Calicophoron daubneyi*, incluso en medios acuosos, previniendo así la aparición de miracidios y disminuyendo el riesgo de infección por este trematodo. La resistencia de las esporas de *M. circinelloides* y *D. flagrans* a las condiciones de elaboración industrial de concentrado comercial hace posible su inclusión durante la fase de mezcla. De este modo, se obtiene un producto en el que no resultan afectadas las propiedades biológicas de los hongos (morfogénesis, esporogénesis) ni su actividad parasitica. Finalmente, destacar la ausencia de efectos indeseables (olores o consistencia extraña, crecimiento de hifas) en el almacenamiento de los pellets durante el periodo de caducidad de este producto comercial.



9.- SUMMARY



Control of livestock parasites requires more research on procedures to prevent their infection and reduce the administration of parasiticide drugs to those situations that are strictly necessary. With this approach, their efficacy will be maintained, lowering the risk of efficacy less than expected or occurrence of resistance, and avoiding possible alterations of the environment caused by the release of ecotoxic metabolites.

Among the aspects to be solved in the biological control of parasites, the lack of information on some stages that are developed in the environment stands out. The action of some fungi on the larvae of certain nematodes (especially strongyles), which hatch the eggs and reach the infective phase (L3) in the soil, it is well known. In recent years information has been obtained on the activity of different fungal species on nematode eggs, focusing on those in which the larva that forms inside does not leave the egg (under normal conditions), as occurs in ascarids or trichurids. However, there is scarce knowledge about the effect of parasitic fungi on the exogenous phase of the life-cycle of trematodes, which unlike nematodes that are transmitted by the ingestion of larvae or eggs containing a larva inside, the infective phase –metacercaria- originates after the ciliated embryo exiting off the egg is capable of infecting the intermediate host (aquatic snail), in which different phases that conduct to the formation of cercariae (precursors of the metacercariae) succeed.

In order to determine the possible activity of the ovicidal fungus *Mucor circinelloides* on trematodes developing their cycle on humid environments (*Fasciolidae*, *Paramphistomidae*), a **first experiment** was carried out which consisted of adding fungal spores on eggs of *Calicophoron daubneyi* in Petri dishes, cattle feces, and in aqueous solutions. First, eggs of the gastric fluke were isolated from the feces of naturally infected cows, and a number of 250 placed in each plate; subsequently, one batch received $5 \cdot 10^5$ spores, and the other distilled water. Mycelial growth was detected from day 6, and the hyphae adhered to the eggshell, penetrated and destroyed the interior, thus a type 3 ovicidal effect was concluded.

Different spore solutions (10^6 , $2 \cdot 10^6$, $3 \cdot 10^6$ and $4 \cdot 10^6$) were added on feces collected from bovine that eliminated *C. daubneyi* eggs, and maintained for 50 days in boxes maintained in a wooded meadow. Samples were analyzed by sedimentation, and the eggs classified as *non-embryonated viable*, *embryonated viable* (with miracidium) and *non-viable* (with vacuoles, destruction of internal structures or rupture of the eggshell). It was recorded that the non-embryonated eggs decreased significantly from day 16, and that miracidia appeared between days 16-20. An increment in non-viable egg counts was also demonstrated until the end of the trial. The percentage of eggs exposed

to *M. circinelloides* containing a miracidium was half that in the controls. No differences were found between the different concentrations of spores used.

Eggs of *C. daubneyi* were placed in eppendorf tubes (250 / tube), and then $2 \cdot 10^6$ spores of *M. circinelloides* added to a batch, while in another batch distilled water (controls) was added. All tubes were maintained at room temperature and natural light cycles. By adding the spores to these liquid solutions, 17% of the eggs of *C. daubneyi* developed a miracidium in the interior only, as opposed to the 45% detected in the controls. It was concluded that *M. circinelloides* is a very useful tool to reduce the risk of infection by *Fasciolidae* or *Paramphistomidae* trematodes, since it can develop a type 3 ovicidal activity in both solid and liquid medium.

Another important feature in the use of fungi as biological control agents is to ensure a correct distribution, without increasing the tasks that livestock owners or farmers have to assume, thus it is necessary to provide adequate formulations. Animals receive frequently (daily) concentrate (feedstuff) to ensure the balanced feeding. This seems a very suitable formulation to put parasitic forms in contact with their antagonists, parasiticide fungi. This strategy aims to limit the viability and development of parasites in feces, reducing their chance of reaching the infective stage and thus the risk of infection. Among the different options, the most interesting would be the industrial manufacturing of pellets with spores, because it would meet the requirements indicated previously.

In order to check whether the biological properties (morphogenesis, sporogenesis, antagonistic activity) of parasitic fungal spores could be affected during the manufacturing process of pelleted feed, two tests were performed in the **second assay**. Aqueous solutions containing $2 \cdot 10^3$ spores of *M. circinelloides* were incubated at 72°C for 10 seconds, 30 seconds and 1, 2, 5 and 10 minutes. Then the spores were seeded in Petri dishes with agar-wheat and kept at 25°C and darkness for 20 days.

Eight concentric circles of 2 cm² were drawn at the bottom of the plates to facilitate the measurement of mycelial development and the count of spore numbers under optical microscope. The analysis of possible alterations on the spores was carried out by placing 50 µL of each of the solutions with spores between a glass slide and coverslip under optical microscope.

To evaluate the parasiticide activity of the spores, 200 eggs of the trematode *Fasciola hepatica* or the nematode *Parascaris equorum* were added on agar-wheat plates in which the spores previously exposed to heat treatment had been previously placed. In this way, when using spores heated at 72°C for a period lower than 10 min, mycelial development became apparent from day four, and spore

production from the eighth onwards. Viability of eggs of *F. hepatica* reduced by 21-63% and that of *P. equorum* by 11-66%. These percentages were significantly higher than the controls (non-exposed) and incubated for 10 min.

Pellets containing *M. circinelloides* spores were industrially prepared at the NANTA factory in Begonte (Lugo, Spain) for feeding horses (Forequus®) and cattle (Recria 18®). Hyphal growth was observed from the fourth day. When studying the ovicidal activity of the fungi included in the pellets, viability of *F. hepatica* eggs reduced by 54-58% and that of *P. equorum* eggs by 61-67%. After examining pellets with and without spores of *M. circinelloides* stored for six months in feed sacks, no evidence of damage or abnormalities as awful/strange odor or growth of hyphae was recorded.

In the **third trial** a similar test to the previous one was carried out, but using the nematode trapping fungus *Duddingtonia flagrans*. Mycelial growth was measured every five days on four plates of each temperature group, including the control group.

The morphological analysis showed the nonexistence of alterations in the chlamyospores until the incubation period reached 10 minutes. In the control plates (added spores not exposed to heat) and in which incubated spores were placed up to 5 minutes, hyphae were observed after four days, and chlamyospores from the 8th day. After heating up to 10 minutes, scarce, slow and irregular growth of the mycelium was observed, and practically no new spores were originated ($\chi^2 = 28.765$, $P = 0.001$).

To evaluate the parasitocidal activity of the spores exposed to thermal stress, L3 larvae of strongyles were obtained from eggs excreted in feces of horses with natural infection. These larvae were then placed in the center of Petri dishes previously added spores heated to 72°C for different time intervals. After 15 days at 25°C and darkness, plates were observed under a microscope to quantify trap formation (morphogenesis). Finally, the agar was placed in a Baermann device to larvae recovering. The numbers of L3 recovered from plates containing spores heated 72°C for less than 10 minutes decreased significantly (94-97%) ($\chi^2 = 26.187$, $P = 0.001$). The counts of L3 in the plates with spores heated for 10 minutes was similar to that of the control plates ($\chi^2 = 0.795$, $P = 0.373$).

A positive correlation was found between mycelial growth and spore quantity (correlation coefficient, $CC = 0.795$, $P = 0.001$), and between the percentage of L3 reduction and mycelial growth ($CC = 0.492$, $P = 0.001$), and the counts of chlamyospores ($CC = 0.325$, $P = 0.017$).

These results indicate that heat treatment at 72°C for five minutes did not affect the biological properties of the chlamyospores of *D. flagrans*, and would therefore be able to survive the

pelletisation process without undergoing morphological alterations, either in sporogenesis or in their parasiticidal activity. Therefore, the next step was to add chlamyospores during the manufacturing of pellets for horse feeding (ProHorse Club®) at the NANTA industrial facilities in Begonte (Lugo, Spain). This activity was possible thanks to the permission granted by the Consellería do Medio Rural e do Mar (Xunta de Galicia). In particular, 15-20 liters of culture medium COPFr (PCT / ES2014 / 070110 patent) were poured for each ton of feed ingredients, resulting in a final concentration of $2 \cdot 10^6$ spores / Kg of feed.

To check the biological activity of the pellets with spores of *D. flagrans*, 20 grams of ProHorse Club® granules were dissolved in 200 mL of water and plated on agar-water dishes. From the fifth day on, development of hyphae was observed, while chlamyospores appeared from the 17th onwards. Finally, a significant reduction in the numbers of L3 larvae of strongyles, in comparison with pellets without spores, was verified (87-92%) ($\chi^2 = 9,396$, $P = 0.002$). There were no differences between pellets analyzed on the same day of manufacture, at 3 and 6 months. These data confirm the in vitro results and corroborate the possibility of making commercial pellets with chlamyospores of *D. flagrans*.

From the results obtained in the present work it was concluded that *Mucor circinelloides* develops an ovicidal effect of type 3 on the eggs of the ruminal trematode *Calicophoron daubneyi*, even in aqueous media, preventing thus the appearance of miracidia and reducing the risk of infection by this trematode. The resistance of the spores of *M. circinelloides* and *D. flagrans* to the industrial processing conditions of commercial feedstuff makes possible their inclusion during the mixing phase. In this way, the obtained product retains the biological properties of the fungi (morphogenesis, sporogenesis) and their parasiticidal activity remains intact. Finally, note the absence of undesirable effects (odors or strange consistency, growth of hyphae) in the pellets stored during the shelf-life of this commercial product.

10.- BIBLIOGRAFÍA



- Anan'ko GG, Teplyakova TV (2011) Factors responsible for transition of the *Duddingtonia flagrans* carnivorous fungus from the saprotrophic to the zootrophic nutrition type. *Microbiology* 80: 188-193.
- Andersen UV, Howe DK, Olsen SN, Nielsen MK (2013) Recent advances in diagnosing pathogenic equine gastrointestinal helminths: the challenge of prepatent detection. *Vet Parasitol* 192: 1-9.
- Araújo JV (1998) Predacious activity of *Arthrobotrys* spp. isolates on infective *Cooperia punctata* larvae. *Braz J Vet Res Anim Sci* 1: 9-11.
- Araújo JV, Guimarães MP, Campos AK, Sá NC, Sarti P, Assis RCL (2004) Control of bovine gastrointestinal nematode parasites using pellets of the nematode-trapping fungus *Monacrosporium thaumasium*. *Ciência Rural, Santa Maria-RS*. 34: 457-463.
- Araujo JM, de Araújo JV, Braga FR, Carvalho RO, Ferreira SR (2009) Activity of the nematophagous fungi *Pochonia chlamydosporia*, *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* on egg capsules of *Dipylidium caninum*. *Vet Parasitol* 166: 86-89.
- Araujo JM, Araújo JV, Braga FR, Carvalho RO (2010) In vitro predatory activity of nematophagous fungi and after passing through gastrointestinal tract of equine on infective larvae of *Strongyloides westeri*. *Parasitol Res* 107: 103-108.
- Araujo JM, Araújo JV, Braga FR, Tavela Ade O, Ferreira SR, Soares FE, Carvalho GR (2012) Control of *Strongyloides westeri* by nematophagous fungi after passage through the gastrointestinal tract of donkeys. *Braz J Vet Parasitol* 21: 157-160.
- Arias M, Lomba C, Dacal V, Vázquez L, Pedreira J, Francisco I, Piñeiro P, Cazapal-Monteiro C, Suárez JL, Díez-Baños P, Morrondo P, Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A (2011) Prevalence of mixed trematode infections in an abattoir receiving cattle from northern Portugal and north-west Spain. *Vet Rec* 168: 408.
- Arias MS, Piñeiro P, Hillyer GV, Francisco I, Cazapal-Monteiro CF, Suárez JL, Morrondo P, Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A (2012a) Enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of equine antibodies specific to a recombinant *Fasciola hepatica* surface antigen in an endemic area. *Parasitol Res* 110: 1001-1007.
- Arias M, Suárez J, Cortiñas FJ, Francisco I, Suárez JL, Romasanta A, Cazapal-Monteiro C, Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A (2012b) Restoration of fungal biota in the soil is

- essential to prevent infection by endoparasites in grazing animals. En: Paz-Silva A, Arias MS (eds.). *Fungi: Types, Environmental Impact and Role in Disease*. Nova Science Publishers, Hauppauge (NY), USA, pp. 341-358.
- Arias MS, Cazapal-Monteiro C, Valderrábano E, Miguélez S, Rois JL, López-Arellano ME, Madeira de Carvalho L, Mendoza de Gives P, Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A (2012) A Preliminary Study of the Biological Control of Strongyles Affecting Equids in a Zoological Park. *J Eq Vet Sci* 33: 1115-1120.
- Arias MS, Cazapal-Monteiro CF, Suárez J, Miguélez S, Francisco I, Arroyo FL, Suárez JL, Paz-Silva A, Sánchez-Andrade R, Mendoza de Gives P (2013) Mixed production of filamentous fungal spores for preventing soil-transmitted helminth zoonoses: a preliminary analysis. *Biomed Res Int* 567876. doi: 10.1155/2013/567876.
- Arias MS, Sanchís J, Cazapal-Monteiro CF, Hernández JA, Miguélez S, Ortega E, Bonilla R, Miquel Femenias S, Suárez JL, Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A (2014) Exposición a parásitos hepáticos en caballos en pastoreo. XV Congreso Internacional de Medicina y Cirugía Equina, Sevilla, 5-6 diciembre.
- Arias MS, Arroyo FL, Cazapal-Monteiro C, Hernández JA, Suárez J, Francisco I, López-Arellano ME, Sánchez-Andrade R, Mendoza de Gives P, Paz-Silva A (2015) Formulating *Duddingtonia flagrans* in nutritional pellets for the sustainable control of equine strongyles. *J Sci Technol Environ* 5: 1-16.
- Arroyo FL, Arias MS, Cazapal-Monteiro CF, Hernández JA, Suárez J, Miguélez S, Romasanta A, Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A (2016) The capability of the fungus *Mucor circinelloides* to maintain parasitocidal activity after the industrial feed pelleting enhances the possibilities of biological control of livestock parasites. *Biol Control* 92: 38-44.
- Arroyo FL, Hernández JÁ, Cazapal-Monteiro CF, Pedreira J, Sanchís J, Romasanta Á, Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A, Arias MA (2017) Effect of the filamentous fungus *Mucor circinelloides* on the development of eggs of the rumen fluke *Calicophoron daubneyi* (Paramphistomidae). *J Parasitol*. doi: 10.1645/16-76.
- Badii MH, Abreu JL (2006) Control biológico una forma sustentable de control de plagas. (Biological control a sustainable way of pest control). *Daena: International Journal of Good Conscience* 1: 82-89.

- Bairden K, Davies HS, Gibson NR, Hood AJ, Parker LD (2006) Efficacy of moxidectin 2 per cent oral gel against cyathostomins, particularly third-stage inhibited larvae, in horses. *Vet Rec* 158: 766-767.
- Balan J, Lechevalier HA (1972) The predaceous fungus *Arthrobotrys dactyloides*: induction of trap formation. *Mycologia* 64: 919-922.
- Barron GL (1977) *The Nematode-destroying Fungi*. Canadian Biological Publications Ltd, Guelph, Ontario, Canada 140 pp.
- Baudena MA, Chapman MR, Larsen M, Klei TR (2000) Efficacy of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in reducing equine cyathostome larvae on pasture in south Louisiana. *Vet Parasitol* 89: 219-230.
- Bird J, Herd RP (1995) In vitro assessment of two species of nematophagous fungi (*Arthrobotrys oligospora* and *Arthrobotrys flagrans*) to control the development of infective cyathostome larvae from naturally infected horses. *Vet Parasitol* 56: 181-187.
- Blaszowska J, Kurnatowski P, Wojcik A, Goralska K, Szwabe K (2014) In vitro evaluation of the ovistatic and ovicidal effect of the cosmopolitan filamentous fungi isolated from soil on *Ascaris suum* eggs. *Vet Parasitol* 199: 165-171.
- Boguś MI, Czygier M, Kddra E, Samborski J (2005) In vitro assessment of the influence of nutrition and temperature on growing rates of five *Duddingtonia flagrans* isolates, their insecticidal properties and ability to impair *Heligmosomoides polygyrus* motility. *Exp Parasitol* 109: 115-123.
- Bohórquez A, Meana A, Pato NF, Luzón M (2014) Coprologically diagnosing *Anoplocephala perfoliata* in the presence of *A. magna*. *Vet Parasitol* 204: 396-401.
- Braga FR, Araújo JV, Campos AK, Carvalho RO, Silva AR, Tavela AO, Maciel AS (2007) In vitro observation of the action of isolates of the fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* and *Verticillium chlamydosporium* on the eggs of *Ascaris lumbricoides* (Linnaeus, 1758). *Rev Soc Bras Med Trop* 40: 356-358.
- Braga FR, Araújo JV, Araujo JM, Silva AR, Carvalho RO, Campos AK (2009a) In vitro evaluation of nematode predacious fungus *Duddingtonia fagrans* on cyathostomes infective larvae of equines (Nematoda: Cyathostominae). *Rev Bras Parasitol Vet Suppl* 1: 83-85.
- Braga FR, Araújo JV, Silva AR, Araujo JM, Carvalho RO, Tavela AO, Campos AK, Carvalho GR (2009b) Biological control of horse cyathostomin (Nematoda: Cyathostominae) using

- the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in tropical southeastern Brazil. *Vet Parasitol* 163: 335-340.
- Braga FR, Araújo JV, Silva AR, Araujo JM, Carvalho RO, Campos AK, Tavela AO, Ferreira SR, Frassy LN, Alves CD (2010) *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* and *Pochonia chlamydosporia* as possible biological control agents of *Oxyuris equi* and *Austroxyuris finlaysoni*. *J Helminthol* 84: 21-25.
- Braga FR, Silva AR, Carvalho RO, Araújo JV, Pinto OS (2011) Ovicidal activity of different concentrations of *Pochonia chlamydosporia* chlamydospores on *Taenia taeniaeformis* eggs. *J Helminthol* 85: 7-11.
- Braga FR, Araújo JV, Soares FEF, Tavela AO, Araújo JM, Carvalho RO, Fernandes FM, Queiroz JH (2012) Enzymatic analysis and in vitro ovicidal effect of *Pochonia chlamydosporia* and *Paecilomyces lilacinus* on *Oxyuris equi* eggs of horses. *Biocontrol Sci Technol*. 22: 685-696.
- Brunori A, Buischio A, Cassinis A (1985) *Introduzione allo studio dei funghi*. Casa Editrice "Il Libro" – Italia, 222 pp.
- Burk SV (2013) Detection of antibodies against *Parascaris equorum* excretory-secretory antigens. *Theses and Dissertations – Animal and Food Sciences*. Paper 21. http://uknowledge.uky.edu/animalsci_stdts/21
- Buzatti A, De Paula Santos C, Fernandes MA, Yoshitani UY, Sprenger LK, Dos Santos CD, Molento MB (2015) *Duddingtonia flagrans* in the control of gastrointestinal nematodes of horses. *Exp Parasitol* 159: 1-4.
- Canever RJ, Braga PR, Boeckh A, Grycajuck M, Bier D, Molento MB (2013) Lack of *Cyathostomum* sp. reduction after anthelmintic treatment in horses in Brazil. *Vet Parasitol* 194, 35-39.
- Carvalho RO, Araújo JV, Braga FR, Araújo JM, Alves CD (2010) Ovicidal activity of *Pochonia chlamydosporia* and *Paecilomyces lilacinus* on *Toxocara canis* eggs. *Vet Parasitol* 169: 123-127.
- Casillas-Aguilar JA, Mendoza de Gives P, López-Arellano ME, Hernández L, 2008. Evaluation of multinutritional pellets containing *Duddingtonia flagrans* chlamydospore for the control of ovine haemonchosis. *Animal biodiversity and emerging diseases*. *Ann NY Acad Sci* 1149: 161-163.

- Cate JR (1994) Integrated Pest Management: The Past of a Paradigm. National Audubon Society: 40 págs.
- Cazapal-Monteiro C, Hernández JA, Arias MS, Suárez JL, Miguélez S, Francisco I, Lago P, Rodríguez MI, Cortiñas FJ, Romasanta A (2014) Horse Rearing Conditions, Health Status and Risk of Sensitization to Gastrointestinal Parasites. En: Paz-Silva A, Arias MS, Sánchez-Andrade Fernández R (eds.) Horses: Breeding, Health disorders and effects on performance & Behaviour. Nova Science Publishers, Hauppauge (NY), USA, pp. 73-92.
- Cazapal-Monteiro CF, Hernández JA, Arroyo FL, Miguélez S, Romasanta Á, Paz-Silva A, Sánchez-Andrade R, Arias MS (2015) Analysis of the effect of soil saprophytic fungi on the eggs of *Baylisascaris procyonis*. Parasitol Res 114: 2443-2450.
- Cazapal-Monteiro CF (2016) Posibilidades de control de helmintozoonosis parasitarias en Galicia. Tesis Doctoral. Facultade de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela.
- Chandler KJ, Love S (2002) Patterns of equine faecal egg counts following spring dosing with either fenbendazole or moxidectin. Vet Rec 151: 269-270.
- Chandrawathani P, Jamnah O, Waller PJ, Hoglund J, Larsen M, Zahari WM (2002) Nematophagous fungi as a biological control agent for nematode parasites of small ruminants in Malaysia: a special emphasis on *Duddingtonia flagrans*. Vet Res 33: 685-696.
- Ciarmela ML, Minvielle MC, Lori G, Basualdo JA (2002) Biological interaction between soil fungi and *Toxocara canis* eggs. Vet Parasitol 103: 251-257.
- Ciarmela ML, Arambarri AM, Minvielle MC (2012) Efecto ovicida de hongos del suelo sobre huevos de *Toxocara canis*. Editorial: EAE Editorial Academia Espanola, United States.
- Cleale RM, Edmonds JD, Paul AJ, Reinemeyer CR, Chapman MR, Clem R, Meccoli RA, Tolliver SC, Amodie DM (2006) A multicenter evaluation of the effectiveness of Equest Gel (2% moxidectin) against parasites infecting equids. Vet Parasitol 137: 119-129.
- Coles GC (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.

- Colvin AF, Walkden-Brown SW, Knox MR, Scott JM (2008) Intensive rotational grazing assists control of gastrointestinal nematodosis of sheep in a cool temperate environment with summer-dominant rainfall. *Vet Parasitol* 153: 108-120.
- Comer KC, Hillyer MH, Coles GC (2006) Anthelmintic use and resistance on thoroughbred training yards in the UK. *Vet Rec* 158: 596-598.
- Corning S (2009) Equine cyathostomins: a review of biology, clinical significance and therapy. *Parasit Vectors* 2 Suppl 2: S1.
- Cortiñas FJ, Cazapal-Monteiro CF, Hernández JA, Arroyo FL, Miguélez S, Suárez J, López de Arellano ME, Sánchez-Andrade R, Mendoza de Gives P, Paz-Silva A, Arias MS (2015) Potential use of *Mucor circinelloides* for the biological control of certain helminths affecting livestock reared in a care farm. *Biocontrol Sci Techn* 25: 1443-1452.
- Cortiñas FJ (2016) Desarrollo de ganadería ecológica e inclusión social. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela.
- Cutolo AA, Santos AT, Allegretti SM (2011) Field study on the efficacy of an oral 2% ivermectin formulation in horses. *Rev Bras Parasitol Vet* 20: 171-175.
- Da Silva ME, de Araújo JV, Braga FR, Borges LA, Soares FE, Lima Wdos S, Guimarães MP (2013) Mycelial mass production of fungi *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* under different culture conditions. *BMC Res Notes* 6: 340.
- De Almeida GL, Santurio JM, Filho JO, Zanette RA, Camillo G, Flores AG, Da Silva JH, De La Rue ML (2012) Predatory activity of the fungus *Duddingtonia flagrans* in equine strongyle infective larvae on natural pasture in the Southern Region of Brazil. *Parasitol Res* 110: 657-662
- De Carvalho LM, Braga FR, Domingues RR, Araujo JM, Lelis RT, de Paula AT, da Silveira WF, de Araújo JV (2014) Interaction of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* and *Parascaris equorum* eggs in different culture media. *J Basic Microbiol* 54 Suppl 1: S109-S114.
- De Mello IN, Braga FR, Monteiro TS, Freitas LG, Araujo JM, Soares FE, Araújo JV (2014) Biological control of infective larvae of *Ancylostoma* spp. in beach sand. *Rev Iberoam Micol* 31: 114-118.

- Dias AS, Araújo JV, Braga FR, Puppim AC, Perboni WR (2013) *Pochonia chlamydosporia* in the biological control of *Fasciola hepatica* in cattle in Southeastern Brazil. *Parasitol Res* 112: 2131-2136.
- Dobson RJ, Besier RB, Barnes EH, Love SCJ, Visard A, Bell LF, Le Jambre LF (2001) Principles for the use of macrocyclic lactones to minimise selection for resistance. *Austr Vet J* 79: 756-761.
- Duddington CL (1951) Further records of predacious fungi. I. *Transactions of the British Mycological Society* 33: 209-214.
- Duque De Araújo Munhoz AM (2014) Principales parasitosis gástricas en équidos de Portugal. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela.
- Ehizibolo DO, Kamani J, Ehizibolo PO, Egwu KO, Dogo GI, Salami-Shinaba JO (2012). Prevalence and significance of parasites of horses in some States of northern Nigeria. *J Equine Sci* 23: 1-4.
- 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.
- 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.
- Epe C, Holst C, Koopmann R, Schieder T, Larsen M, von Samson-Himmelstjerna G (2008) Investigation on the influence of nematophagous fungi as feed additive on nematode infection risk of sheep and goats on pasture. *Agric Forest Res* 3: 191-152.
- Esteves I, Peteira B, Atkins SD, Magan N, Kerry B (2009) Production of extracellular enzymes by different isolates of *Pochonia chlamydosporia*. *Mycol Res* 113: 867-876.
- Fan CK, Su KE (2004). Cross-reactions with *Ascaris suum* antigens of sera from mice infected with *A. suum*, *Toxocara canis*, and *Angiostrongylus cantonensis*. *Parasitol Int* 53: 263-271.
- Feder WA (1960) Osmotic destruction of plant parasitic and saprophytic nematodes by the addition of sugars to the soil. *PI Dis Repr* 44: 883-885.

- Feder WA, Everard C, Wootton L (1963) Sensitivity of several species of the nematophagous fungus *Dactylella* to a morphogenic substance derived from free-living nematodes. *Nematologica* 9: 49-54.
- Federica SM, Alberto FL, Emilia IL, Carina MF, Alfredo SC (2013) Optimization of production of chlamydospores of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* in solid culture media. *Parasitol Res* 112: 1047-1051.
- FEEDAP. Opinion of the Scientific Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed on the safety of the micro-organism preparation of *Duddingtonia flagrans*, for use as a feed additive for calves in accordance with Council Directive 70/524/EEC (Question No EFSA-Q-2004-115). Adopted on 7 of March 2006. The EFSA Journal (2006) 334: 1-8.
- Fernández AS, Henningsen E, Larsen M, Nansen P, Grønvold J, Søndergaard J (1999) A new isolate of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* a biological control agent against free-living larvae of horse strongyles. *Equine Vet J* 31: 488-491.
- Fernández AS, Larsen M, Wolstrup J, Grønvold J, Nansen P, Bjørn H (1999) Growth rate and trapping efficacy of nematode trapping fungi under constant and fluctuating temperatures. *Parasitol Res* 85: 661-668.
- Ferreira SR, Araújo JV, Braga FR, Araujo JM, Carvalho RO, Silva AR, Frassy LN, Freitas LG (2010) Ovicidal activity of seven *Pochonia chlamydosporia* fungal isolates on *Ascaris suum* eggs. *Trop Anim Health Prod* 43: 639-642.
- 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.
- Flament Simon S (2015) Prevención de zoonosis parasitarias mediante hongos telúricos. Trabajo de Fin de Grado. Facultade de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela.
- Francisco Vázquez I (2010) Epidemiología de los principales parasitismos del caballo en Galicia. Tesis Doctoral. Facultade de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela.
- Francisco Vázquez R (2013) Utilidad de la detección de anticuerpos para el diagnóstico de infecciones parasitarias en équidos. Tesis Doctoral, Facultade de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela.

- Francisco I, Arias M, Cortiñas FJ, Francisco R, Mochales E, Sánchez JA, Uriarte J, Suárez JL, Morrondo P, 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, Sánchez JA, Cortiñas FJ, Francisco R, Mochales E, Arias M, Mula P, Suárez JL, 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 JA, Cortiñas FJ, Francisco R, Suárez J, Cazapal C, Suárez JL, Arias MS, Morrondo P, Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A (2011) 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 FJ, Miguélez S, Suárez J, Sánchez-Andrade R (2012) Preliminary analysis of the results of selective therapy against strongyles in pasturing horses. *J Eq Vet Sci* 32: 274-280.
- Fritzen B, Rohn K, Schnieder T, Von Samson-Himmelstjerna G (2010) Endoparasite control management on horse farms--lessons from worm prevalence and questionnaire data. *Equine Vet J* 42: 79-83.
- Getachew M, Trawford A, Feseha G, Reid SWJ (2010) Gastrointestinal parasites of working donkeys of Ethiopia. *Trop Anim Health Prod* 42: 27-33.
- Geurden T, Van Doorn D, Claerebout E, Kooyman F, De Keersmaecker S, Vercruyse J, Besognet B, Vanimisetti B, Di Regalbono AF, Beraldo P, Di Cesare A, Traversa D (2014) Decreased strongyle egg re-appearance period after treatment with ivermectin and moxidectin in horses in Belgium, Italy and The Netherlands. *Vet Parasitol* 204: 291-296.
- Gortari MC, Galarza BC, Cazau MC, Hours RA (2008) Comparison of the biological properties of two strains of *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson associated to their antagonistic effect onto *Toxocara canis* eggs. *Malays J Microbiol* 4: 35-41.
- Grønvold J, Nansen P, Henriksen SA, Larsen M, Wolstrup J, Bresciani J, Rawat H, Friberg L (1996) Induction of traps by *Ostertagia ostertagi* larvae, chlamydospore production and growth rate in the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans*. *J Helminthol* 70: 291-297.

- Gürler AT, Bölükbaş CS, Açıci M, Umut S (2010) Check list of the helminths of equines in Turkey. *Turkiye Parazitoloj Derg* 34: 40-44.
- Gutiérrez-Delgado EM, Treviño-González JL, Montemayor-Alatorre A, Ceceñas-Falcón LA, Ruiz-Holguín E, Andrade-Vázquez CJ, Lara-Medrano R, Ramos-Jiménez J (2016) Chronic rhino-orbito-cerebral mucormycosis: A case report and review of the literature. *Ann Med Surg (Lond)* 6: 87-91.
- Haran S, Schickler H, Oppenheim A, Chet I (1996) Differential expression of *Trichoderma harzianum* chitinases during mycoparasitism. *Phytopathology* 86: 980-985.
- Hernández Malagón JÁ (2014). Posibilidades de control de helmintozoonosis por ascáridos mediante el uso de hongos telúricos. Memoria de Licenciatura, Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela.
- Hernández JÁ, Arroyo FL, Suárez J, Cazapal-Monteiro CF, Romasanta Á, López-Arellano ME, Pedreira J, de Carvalho LM, Sánchez-Andrade R, Arias MS, de Gives PM, Paz-Silva A (2016) Feeding horses with industrially manufactured pellets with fungal spores to promote nematode integrated control. *Vet Parasitol* 229: 37-44.
- Hertzberg H, Schwarzwald CC, Grimm F, Frey CF, Gottstein B, Gerber V (2014) Helminth control in the adult horse: the need for a re-orientation. *Schweiz Arch Tierheilkd* 156: 61-70.
- Hinney B, Wirtherle NC, Kyule M, Miethe N, Zessin KH, Clausen PH (2011) Prevalence of helminths in horses in the state of Brandenburg, Germany. *Parasitol Res* 108: 1083-1091.
- Johns H, Johnson K, Turner L (2004) Rotational grazing. University of Kentucky Coop. Ext. Serv. ID-143, Lexington.
- Hodgkinson JE, Clark HJ, Kaplan RM, Lake SL, Matthews JB (2008) The role of polymorphisms at beta tubulin isotype 1 codons 167 and 200 in benzimidazole resistance in cyathostomins. *Int J Parasitol* 38: 1149-1160.
- Irving F, Kerry BR (1986) Variation between strains of the nematophagous fungus, *Verticillium chlamydosporium* Goddard. II. Factors affecting parasitism of cyst nematode eggs. *Nematologica* 32: 474-485.
- Jackson F, Coop RL (2000) The development of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Parasitology* 120: S95-S107.

- Jatala P (1986) Biological control of plant-parasitic nematodes. *Ann. Rev. Phytopathol.* 24: 453-489.
- Kaplan RM (2004) Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends Parasitol* 20: 477-481.
- Kenyon F, Greer AW, Coles GC, Cringoli G, Papadopoulos E, Cabaret J, Berrag B, Varady M, Van Wyk JA, Thomas E, Vercruysse J, Jackson F (2009) The role of targeted selective treatments in the development of refugia-based approaches to the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants. *Vet Parasitol* 164: 3-11.
- Kenyon F, Jackson F (2012) Targeted flock/herd and individual ruminant treatment approaches. *Vet Parasitol* 186: 10-17.
- Kerry BR (1987). Biological control. En: Principles and practice of nematode control in crops. Academia Press Australia, Chapter 7, pp. 233-263.
- Khan MR, Zaidi B, Haque Z (2012) Nematicides control rice root-knot, caused by *Meloidogyne graminicola*. *Phytopathol Mediterr* 51: 298-306.
- Kubicek CP, Komon-Zelazowska M, Druzhinina IS (2008) Fungal genus *Hypocrea/Trichoderma*: from barcodes to biodiversity. *J Zhejiang Univ Sci B* 9: 753-763.
- Kumar N, Rao TKS, Varghese A, Rathor VS (2013) Internal parasite management in grazing livestock. *J Parasit Dis* 37: 151-157.
- Kuzmina TA, Kuzmin YI, Kharchenko VA (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 TA, Kharchenko VO (2008) Anthelmintic resistance in cyathostomins of brood horses in Ukraine and influence of anthelmintic treatments on strongylid community structure. *Vet Parasitol* 154: 277-288.
- Kwa MS, Veenstra JG, Van Dijk M, Roos MH (1995) Beta-tubulin genes from the parasitic nematode *Haemonchus contortus* modulate drug resistance in *Caenorhabditis elegans*. *J Mol Biol* 246: 500-510.
- Larriba E, Martín-Nieto J, López-Llorca LV (2012) Gene cloning, molecular modeling, and phylogenetics of serine protease P32 and serine carboxypeptidase SCP1 from

- nematophagous fungi *Pochonia rubescens* and *Pochonia chlamydosporia*. Can J Microbiol 58: 815-827.
- Larsen M, Nansen P, Henriksen SA, Wolstrup J, Grønvold J, Zorn A, Wedø E (1995) Predacious activity of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* against cyathostome larvae in faeces after passage through the gastrointestinal tract of horses. Vet Parasitol 60: 315-320.
- Larsen M, Nansen P, Grøndahl C, Thamsborg SM, Grønvold J, Wolstrup J, Henriksen SA, Monrad J (1996) The capacity of the fungus *Duddingtonia flagrans* to prevent strongyle infections in foals on pasture. Parasitology 113: 1-6.
- Larsen ML, Ritz C, Petersen SL, Nielsen MK (2011) Determination of ivermectin efficacy against cyathostomins and *Parascaris equorum* on horse farms using selective therapy. Vet J 188: 44-47.
- Lelis RT, Braga FR, de Carvalho LM, de Paula AT, Araujo JM, Fausto MC, Junior AM, Rodrigues JV, de Freitas Soares FE, Garcia JS, de Araújo JV (2014) Effect of the fungus *Pochonia chlamydosporia* on *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae). Acta Trop 139: 88-92.
- Lind EO, Kuzmina T, Ugglå A, Waller PJ, Höglund J (2007) A field study on the effect of some anthelmintics on cyathostomins of horses in Sweden. Vet Res Commun 31: 53-65.
- Lindgren K, Ljungvall O, Nilsson O, Ljungström BL, 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.
- Liu K, Tian J, Xiang M, Liu X (2012) How carnivorous fungi use three-celled constricting rings to trap nematodes. Protein Cell 3: 325-328.
- Llerandi-Juárez RD, Mendoza de Gives P (1998) Resistance of chlamydozoospores of nematophagous fungi to the digestive processes of sheep. J Helminthol 72: 209-213.
- Lloyd S (2009) Effects of previous control programmes on the proportion of horses shedding small numbers of strongyle-type eggs. Vet Rec 164: 108-11.
- López-Llorca LV, Gómez-Vidal S, Monfort E, Larriba E, Casado-Vela J, Elortza F, Jansson HB, Salinas J, Martín-Nieto J (2010) Expression of serine proteases in egg-parasitic nematophagous fungi during barley root colonization. Fungal Genet Biol 47: 342-351.

- Lyons ET, Tolliver SC, Collins SS (2006a) Field studies on endoparasites of Thoroughbred foals on seven farms in central Kentucky in 2004. *Parasitol Res* 98: 496-500.
- Lyons ET, Tolliver SC, Collins SS. (2006b). 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 ET, Tolliver SC, Rathgeber RA, Collins SS (2007) 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 ET, Tolliver SC, Ionita M, Lewellen A, Collins SS (2008) Field studies indicating reduced activity of ivermectin on small strongyles in horses on a farm in Central Kentucky. *Parasitol Res* 103: 209-215.
- Lyons ET, Tolliver SC, Collins SS (2009) Probable reason why small strongyle EPG counts are returning "early" after ivermectin treatment of horses on a farm in Central Kentucky. *Parasitol Res* 104: 569-574.
- Lýsek H, Fassatiová O, Cuervo Pineda N, Lorenzo Hernández N (1982) Ovicidad fungi in soils of Cuba. *Folia Parasitol* 29: 265-270.
- Lýsek H, Krajčí D (1987) Penetration of ovicidal fungus *Verticillium chlamydosporium* through the *Ascaris lumbricoides* egg-shells. *Folia Parasitol* 34: 57-60.
- Lýsek H, Štěřba J (1991) Colonization of *Ascaris lumbricoides* eggs by the fungus *Verticillium chlamydosporium* Goddard. *Folia Parasitol* 38: 255-259.
- Maciel AS, Freitas LG, Figueiredo LD, Campos AK, Mello IN (2012) Antagonistic activity of the fungus *Pochonia chlamydosporia* on mature and immature *Toxocara canis* eggs. *Parasitology* 139: 1074-1085.
- Madeira de Carvalho LM (2006) Os equídeos em Portugal: de animais de produção a animais de companhia. Impacte nas Doenças Parasitárias. *Med Vet (revista da AEFMV)* 62: 13-24.
- Madeira de Carvalho LM, Gomes L, Cernea M, Cernea C, Santos CA, Bernardes N, Rosário MA, Soares MJ, Fazendeiro I (2007) Parasitismo gastrointestinal e seu controlo em asininos e híbridos estabulados. *Rev. Port. Ciencias Vet* 102: 225-231.

- Madeira de Carvalho LM, Cernea MS, Martins S, Sousa S, Gersão S, Cernea LC (2008) Comparative study of cyathostomin horse infection in Portugal and Romania based in L3 subpopulations of *Cyathostomum sensu latum*. *Sci Parasitol* 2: 48-56.
- Madeira de Carvalho LM, Bernardo FA, Paz-Silva A (2012) The role of fungi in the control of animal parasites – classification, mode of action and practical applications. En: Paz-Silva A, Arias MS (eds.). *Fungi: Types, Environmental Impact and Role in Disease*. Nova Science Publishers, Hauppauge (NY), USA, pp. 271-308.
- Managadze D, Würtz C, Sichtung M, Niehaus G, Veenhuis M, Rottensteiner H (2007) The peroxin PEX14 of *Neurospora crassa* is essential for the biogenesis of both glyoxysomes and Woronin bodies. *Traffic (Copenhagen, Dinamarca)* 8: 687–701.
- 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.
- Meana A, Pato NF, 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.
- Méndez-Tovar LJ, Mejía-Mercado JA, Manzano-Gayosso P, Hernández-Hernández F, López-Martínez R, Silva-González I (2016) Frequency of invasive fungal infections in a Mexican High-Specialty Hospital. Experience of 21 years. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 54: 581-587.
- Mendoza de Gives P, Zapata Nieto C, Hernández EL, Arellano ME, Rodríguez DH, Garduño RG (2006) Biological control of gastrointestinal parasitic nematodes using *Duddingtonia flagrans* in sheep under natural conditions in Mexico. *Ann NY Acad Sci* 1081: 355-359.
- Mendoza de Gives P, Torres-Acosta JFJ (2012) Biotechnological use of fungi in the control of ruminant parasitic nematodes. En: Paz-Silva A, Arias MS (eds.). *Fungi: Types, Environmental Impact and Role in Disease*. Nova Science Publishers, Hauppauge (NY), USA, pp. 389-408.
- Mercier P, Chick B, Alves-Branco F, White CR (2001) Comparative efficacy, persistent effect, and treatment intervals of anthelmintic pastes in naturally infected horses. *Vet Parasitol* 99: 29-39.

- Mfitlodze MW, Hutchinson GW (1987) Development and survival of free-living stages of equine strongyles under laboratory conditions. *Vet Parasitol* 23: 121-133.
- Molento MB, Antunes J, Bentes RN, Coles GC (2008) Anthelmintic resistant nematodes in Brazilian horses. *Vet Rec* 162: 384-385.
- Monoson HL, Galsky AG, Stephano RS (1974) Studies on the ability of various nematodes to induce trap formation in a nematode-trapping fungus *Monacrosporium doedycoides*. *Nematologica* 20: 96-102.
- Morgan ER, Hetzel N, Povah C, Coles GC (2005) Prevalence and diagnosis of parasites of the stomach and small intestine in horses in south-west England. *Vet Rec* 156: 597-600.
- 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* 182: 372-377.
- Nielsen MK, Kaplan RM, Thamsborg SM, Monrad J, Olsen SN (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 MK, Fritzen B, Duncan JL, Guillot J, Eysker M, Dorchies P, Laugier C, Beugnet F, Meana A, Lussot-Kervern I, von Samson-Himmelstjerna G (2010) Practical aspects of equine parasite control: a review based upon a workshop discussion consensus. *Equine Vet J* 42: 460-468.
- Nielsen MK, Mittel L, Grice A, Erskine M, Graves E, Vaala W, Tully RC, French DD, Bowman R, Kaplan RM (2013) AAEP Parasite Control Guidelines. <http://www.aaep.org/custdocs/ParasiteControlGuidelinesFinal.pdf>
- Nielsen MK, Reinemeyer CR, Donecker JM, Leathwick DM, Marchiondo AA, Kaplan RM (2014a) Anthelmintic resistance in equine parasites--current evidence and knowledge gaps. *Vet Parasitol* 204: 55-63.
- Nielsen MK, Wang J, Davis R, Bellaw JL, Lyons ET, Lear TL, Goday C (2014b) *Parascaris univalens*--a victim of large-scale misidentification? *Parasitol Res* 113: 4485-4490.
- Nordbring-Hertz B (1977) Nematode-induced morphogenesis in the predacious fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Nematologica* 23: 443-451.

- Ojeda-Robertos NF, Torres-Acosta JFJ, Aguilar-Caballero AJ, Ayala-Burgos A, Cob-Galera LA, Sandoval-Castro CA, Barrientos-Medina RC, Mendoza de Gives P (2008) Assessing the efficacy of *Duddingtonia flagrans* chlamyospores per gram of faeces to control *Haemonchus contortus* larvae. *Vet Parasitol* 158: 329-335.
- Ojeda-Robertos NF, Torres-Acosta JF, Ayala-Burgos AJ, Sandoval-Castro CA, Valero-Coss RO, Mendoza-de-Gives P (2009) Digestibility of *Duddingtonia flagrans* chlamyospores in ruminants: in vitro and in vivo studies. *BMC Vet Res* 5: 46.
- Osterman Lind EO, Rautalinko E, Uggla A, Walle, PJ, Morrison DA, Höglund J (2007) Parasite control practices on Swedish horse farms. *J Acta Vet Scand* 49: 25.
- Palomero Salinero AM (2015) Análisis de la eficacia de hongos frente a parásitos que afectan a la gallina ponedora. Trabajo de Fin de Grado. Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela.
- Paz-Silva A, Hillyer GV, Sánchez-Andrade R, Rodríguez-Medina JR, Arias M, Morrondo P, Díez-Baños P (2005) Isolation, identification and expression of a *Fasciola hepatica* cDNA encoding a 2.9-kDa recombinant protein for the diagnosis of ovine fasciolosis. *Parasitol Res* 95: 129-135.
- Paz-Silva A, Francisco I, Valero-Coss RO, Cortiñas FJ, Sánchez JA, Francisco R, Arias M, Suárez JL, López-Arellano ME, Sánchez-Andrade R, Mendoza de Gives P (2011) Ability of the fungus *Duddingtonia flagrans* to adapt to the cyathostomin egg-output by spreading chlamyospores. *Vet Parasitol* 179: 277-282.
- Paz-Silva A, Arroyo FL, Cazapal-Monteiro C, Hernández JA, Oliver A, Suárez J, Francisco I, Sánchez-Andrade R, Arias MS (2015) Alimentación con concentrado fabricado con esporas de hongos para prevenir nematodosis intestinales. XVI Congreso Internacional de Medicina y Cirugía Equina, Sevilla, 20-21 noviembre.
- Paz-Silva A, Bonilla R, Hernández JA, Arroyo F, Cazapal-Monteiro C, Romasanta Á, Francisco I, Arias MS, Sánchez-Andrade R (2016) Spreading of *Mucor circinelloides* spores can aid to prevent *Trichuris* sp. infection in captive dromedaries (*Camelus dromedarius*). 12th European Multicolloquium of Parasitology, Turku (Finland), 20-24 July.
- Peregrine A, McEwen B, Bienzle D, Kock T, Weese J (2006) Larval cyathostominosis in horses in Ontario: An emerging disease. *Can Vet J* 47: 80-82.

- Pereira JR, Vianna SS (2006) Gastrointestinal parasitic worms in equines in the Paraíba Valley, State of São Paulo, Brazil. *Vet Parasitol* 140: 289-295.
- Pramer D, Stoll NR (1959) Nemin: a morphogenic substance causing trap formation by predaceous fungi. *Science* 129: 966-967.
- Prasad P, Varshney D, Adholeya A (2015) Whole genome annotation and comparative genomic analyses of bio-control fungus *Purpureocillium lilacinum*. *BMC Genomics* 16: 1004.
- Quigley A, Sekiya M, Egan S, Wolfe A, Negredo C, Mulcahy G (2016) Prevalence of liver fluke infection in Irish horses and assessment of a serological test for diagnosis of equine fasciolosis. *Equine Vet J*. doi: 10.1111/evj.12577.
- Rahoo AM, Mukhtar T, Gowen SR, Pembroke B (2011) Virulence of entomopathogenic bacteria *Xenorhabdus bovienii* and *Photorhabdus luminescens* against *Galleria mellonella* larvae. *Pak J Zool* 43: 543-548.
- Rangaswami G, Bagyaraj DJ (2001) *Agricultural Microbiology*. 2nd Edition. Prentice Hall of India, New Delhi, 423 pp.
- Rehbein S, Visser M, Winter R (2013) Prevalence, intensity and seasonality of gastrointestinal parasites in abattoir horses in Germany. *Parasitol Res* 112: 407-413.
- Reinemeyer CR (1986) Small strongyles. Recent advances. *Vet Clin N Am-Equine* 2:281-312
- Reinemeyer CR (2009) Diagnosis and control of anthelmintic-resistant *Parascaris equorum*. *Parasit Vectors*. Suppl 2: S8.
- Relf VE, Morgan ER, Hodgkinson JE, Matthews JB (2013) Helminth egg excretion with regard to age, gender and management practices on UK Thoroughbred studs. *Parasitology* 140: 641-652.
- Rojo-Vázquez FA, Meana A (2008) Resistencia antihelmíntica. *Monografía Equinus* 23: 88-101.
- Romasanta A, Romero JL, Arias M, Sánchez-Andrade R, López C, Suárez JL, 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.
- Rossano MG, Smith AR, Lyons ET (2010) Shortened strongyle-type egg reappearance periods in naturally infected horses treated with moxidectin and failure of a larvicidal dose of fenbendazole to reduce fecal egg counts. *Vet Parasitol* 173: 349-352.

- Rubner A (1996) Revision of predacious hyphomycetes in the *Dactylella-Monacrosporium* complex. *Stud Mycol* 39: 1-134.
- Sagüés MF, Fusé LA, Fernández AS, Iglesias LE, Moreno FC, Saumell CA (2011) Efficacy of an energy block containing *Duddingtonia flagrans* in the control of gastrointestinal nematodes of sheep. *Parasitol Res* 109: 707-713.
- Sagüés MF, Purslow P, Fernández S, Fusé L, Iglesias L, Saumell C (2011) Nematophagous fungi used for the biological control of gastrointestinal nematodes in livestock and administration routes. *Rev Iber Micol* 28: 143-147.
- Sánchez Gómez JA (2012) Nuevas perspectivas para el control del parasitismo gastrointestinal de caballos en silvopastoreo. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela.
- Sánchez-Andrade R, Cortiñas FJ, Francisco I, Sánchez JA, Mula P, Cazapal C, Vázquez L, Suárez JL, Francisco R, Arias MS, 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.
- Sanchís J, Suárez J, Hillyer GV, Hernández JA, Solari MA, Cazapal-Monteiro C, Duque de Araújo AM, Madeira de Carvalho LM, Paz-Silva A, Sánchez-Andrade R, Arias MS (2015) Determination of exposure to *Fasciola hepatica* in horses from Uruguay using a recombinant-based ELISA. *Vet Med-Czech* 60: 1-6.
- Sanchís Polto J, Madeira de Carvalho LM, Bonilla R, Duque de Araújo AM, Arroyo F, Suárez J, Solari MA, Romero JA, Sánchez-Andrade R (2014) Horse handling conditions and emergence of neglected infections: fasciolosis. En: Paz-Silva A, Arias MS, Sánchez-Andrade Fernández R (eds.). *Horses: Breeding, Health disorders and effects on performance & Behaviour*. Nova Science Publishers, Hauppauge (NY), USA, pp. 127-144.
- 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.
- Santos CP, Padilha T, de Azevedo Rodrigues ML (2001) Predatory activity of *Arthrobotrys oligospora* and *Duddingtonia flagrans* on pre-parasitic larval stages of cyathostominae under different constant temperatures. *Ciência Rural*, Santa Maria 31: 839-842.

- Saumell CA, Fernández AS, Echevarria F, Gonçalves I, Iglesias L, Sagües MF, Rodríguez E (2016) Lack of negative effects of the biological control agent *Duddingtonia flagrans* on soil nematodes and other nematophagous fungi. *J Helminthol* 90: 706-711.
- Schneider S, Pfister K, Becher AM, Scheuerle MC (2014) Strongyle infections and parasitic control strategies in German horses - a risk assessment. *BMC Vet Res* 10: 262.
- Scholler M, Hagedorn G, Rubner A (1999) A reevaluation of predatory orbiliaceous fungi. II. A new generic concept. *Sydowia* 51: 89-113.
- Scholler M, Rubner A (1994) Predacious activity of the nematode destroying fungus *Arthrobotrys oligospora* in dependence of the medium composition. *Microbiol Res* 149: 145-149.
- Schougaard H, Nielsen MK (2007) Apparent ivermectin resistance of *Parascaris equorum* in foals in Denmark. *Vet Rec* 160: 439-440.
- Sengupta ME, Thapa S, Thamsborg SM, Mejer H (2016) Effect of vacuum packing and temperature on survival and hatching of strongyle eggs in faecal samples. *Vet Parasitol* 217: 21-24.
- Seyoum Z, Tesfaye M, Derso S (2015) Prevalence, intensity and risk factors of infestation with major gastrointestinal nematodes in equines in and around Shashemane, Southern Ethiopia. *Trop An Health Prod* 47: 1515-1521.
- Silva AR, Araújo JV, Braga FR, Alves CDF, Filho JDR (2010a) Destruction of *Anoplocephala perfoliata* eggs by the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*. *J Equine Vet Sci* 30: 701-704.
- Silva AR, Araújo JV, Braga FR, Alves CD, Frassy LN (2010b) In vitro ovicidal activity of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* and *Pochonia chlamydosporia* on *Trichuris vulpis* eggs. *Vet Parasitol* 172: 76-79.
- Singer JW, Bamka WJ, Kluchinski D, Govindasamy R (2002) Using the recommended stocking density to predict equine pasture management. *J Eq Vet Sci* 22:73-76.
- 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 JO (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 JO, De Gannes RV, Lake MC (2007) Macrocyclic lactone-resistant *Parascaris equorum* on stud farms in Canada and effectiveness of fenbendazole and pyrantel pamoate. *Vet Parasitol* 145: 371-376.
- Smith BP (2014) Large animal internal medicine. 5th edition. Elsevier Mosby, MI (USA).
- Sokół R, Raś-Noryńska M, Michalczyk M, Jasiocka A, Ziółkowski H, Jaroszewski J (2015) A comparison of the efficacy and pharmacokinetics of ivermectin after spring and autumn treatments against Cyathostominae in horses. *Pol J Vet Sci* 18: 371-377.
- Sokół R, Raś-Noryńska M, Michalczyk M, Raś A, Rapacz-Leonard A, Koziątek S (2015) Estimation of infection of internal parasites in horses from different type of farms. *Ann Parasitol* 61: 189-192.
- Soulsby E JL (1987) Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. Ed. Interamericana. México DC, México.
- Soykan E, Oge H (2012) The prevalence of liver trematodes in equines in different cities of Turkey. *Turkiye Parazitoloj Derg* 36: 152-155.
- Steinbach T, Bauer C, Sasse H, Baumgärtner W, Rey-Moreno C, Hermosilla C, Damriyasa IM, Zahner H (2006) Small strongyle infection: consequences of larvicidal treatment of horses with fenbendazole and moxidectin. *Vet Parasitol* 139: 115-131.
- Stirling GR (1991) Biological control of plant parasitic nematodes: Problems, progress and prospects. CAB International, Wallingford, UK, 282 pp.
- Suárez J, Hernández JA, Oliver A, Torres MI, Sanchís J, Riádigos S, Palomero A, López T, Francisco I, Paz-Silva A, Sánchez-Andrade R, Arias MS (2016) Avances en el diagnóstico de la dicroceliosis equina. XVII Congreso Internacional de Medicina y Cirugía Equina, Sevilla, 18-19 noviembre.
- Tavela Ade O, Araújo JV, Braga FR, Silva AR, Carvalho RO, Araujo JM, Ferreira SR, Carvalho GR (2011) Biological control of cyathostomin (Nematoda: Cyathostominae) with nematophagous fungus *Monacrosporium thaumasium* in tropical southeastern Brazil. *Vet Parasitol* 175: 92-96.

- Tavela Ade O, de Araújo JV, Braga FR, da Silveira WF, Dornelas e Silva VH, Carretta Júnior M, Borges LA, Araujo JM, Benjamin Ldos A, Carvalho GR, de Paula AT (2013) Coadministration of sodium alginate pellets containing the fungi *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* on cyathostomin infective larvae after passing through the gastrointestinal tract of horses. *Res Vet Sci* 94: 568-572.
- Teixeira WF, Felippelli G, Cruz BC, Maciel WG, Fávero FC, Gomes LV, Buzzulini C, Prando L, Bichuette MA, Lopes WD, Oliveira GP, Costa AJ (2014) Endoparasites of horses from the Formiga city, located in center-west region of the state of Minas Gerais, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 23: 534-538.
- Terrill TH, Larsen M, Samples O, Husted S, Miller JE, Kaplan RM, Gelaye S (2004) Capability of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* to reduce infective larvae of gastrointestinal nematodes in goat feces in the southeastern United States: dose titration and dose time interval studies. *Vet Parasitol* 120: 285-296.
- Uhlinger CA (2007) Evidence-based parasitology in horses. *Vet Clin North Am Equine Pract* 23: 509-517.
- Valdéz-Cruz MP, Hernández-Gil M, Galindo-Rodríguez L, Alonso-Díaz MA (2013) Gastrointestinal nematode burden in working equids from humid tropical areas of central Veracruz, Mexico, and its relationship with body condition and haematological values. *Trop Anim Health Prod.* 45: 603-607.
- Van Wyk JA (2001). Refugia - overlooked as perhaps the most potent factor concerning the development of anthelmintic resistance. *Onderstepoort J Vet Res* 68: 55-67.
- Veronesi F, Moretta I, Moretti A, Fioretti DP, 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 (2012) Anthelmintic resistance in equine parasites - detection, potential clinical relevance and implications for control. *Vet Parasitol* 185: 2-8.
- von Samson-Himmelstjerna G, Fritzen B, Demeler J, Schürmann 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 AF, Beraldo P, Barnes H, Cobb R, Boeckh A (2009) 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.
- Waller PJ, Larsen M, Faedo M, Hennessy DR (1994) The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: in vitro and in vivo studies. *Vet Parasitol* 51: 289-299.
- Waller PJ, Ljungström BL, Schwan O, Martin LR, Morrison DA, Rydzik A (2006) Biological control of sheep parasites using *Duddingtonia flagrans*: trials on commercial farms in Sweden. *Acta Vet Scand* 47: 23-32.
- Wolstrup J, Nansen P, Gronvold J, Henriksen SA, Larsen M (1996) Toward practical biological control of parasitic nematodes in domestic animals. *J Nematol* 28: 129-132.
- Yu Z-F, Mo M-H, Zhang Y, Zhang K-Q (2014) Taxonomy of nematode-trapping fungi from *Orbiliaceae*, *Ascomycota*. En: Zhang K-Q, Hyde KD (eds.). *Nematode-trapping fungi*. Dordrecht: Springer, pp. 41–209.
- Zareen,A, Siddiqui IA, Aleem FZ, Aki MJ, Shaukat SS (2001) Observations on the nematicidal effect of *Fusarium solani* on the root-knot nematodes *Meloidogyne javanica*. *J Plant Pathol* 83: 207-214.
- Zarrin M, Rahdar M, Gholamian A (2015) Biological control of the nematode infective larvae of Trichostrongylidae family with filamentous fungi. *Jundishapur J Microbiol* 8: e17614.