

ARTÍCULO ORIGINAL

Eliminación de huevos de los pequeños estróngilos en la materia fecal de los equinos y su importancia práctica en la posibilidad de tratamientos selectivos

Cooper LG¹, Paz Benard BJ¹, Molinelli A^{2,3}, Caffè G^{1,4}, Fernandez Llanos I¹, Fassola LA¹, Cerutti J¹, Anziani OS^{1,3*}

¹ Universidad Católica de Córdoba, Argentina.

² Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.

³ Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Estación Experimental Agropecuaria Rafaela, Argentina.

⁴ Universidad Nacional de Villa María, Argentina.

* Correspondencia: Oscar S. Anziani, INTA EEA Rafaela, Ruta 34 Km 227
(2300) Rafaela, Santa Fe, Argentina.
E-mail: anziani.oscar@inta.gob.ar

Recibido: 13 Noviembre 2019. Aceptado: 20 Febrero 2020. Disponible en línea: 10 Abril 2020
Editor: P. Beldomenico

RESUMEN. Los pequeños estróngilos son los parásitos de mayor prevalencia e importancia en los equinos de todo el mundo, y el desarrollo generalizado de la resistencia de estos nematodos a los antihelmínticos está impulsando la aplicación de tratamientos selectivos (TS) para disminuir o demorar el desarrollo de estos fenómenos. Esta estrategia se basa en conteos de huevos de nematodos en la materia fecal de todos los integrantes del grupo animal para tratar solamente aquellos que sobrepasan un determinado umbral o cut off. Este principio de TS se ve favorecido por la consistencia de los conteos de huevos por gramo de heces (hpg) en los equinos y está siendo empleada en algunos países del hemisferio norte, especialmente en los animales adultos. En la Argentina, existe una ausencia de información básica en relación a las condiciones climáticas, de pastoreo y manejo que podrían resultar en cargas parasitarias y transmisión de nematodos diferentes a las observadas en el hemisferio norte. En este contexto, el objetivo de este estudio fue caracterizar la eliminación de huevos de pequeños estróngilos en 436 equinos de diferentes edades pertenecientes a 19 establecimientos del área central de la Argentina. El 90% de los equinos mostró huevos de estróngilos en las heces y los valores de hpg fueron menores a 200 y mayores a 1.000 en el 32% y 22% de los equinos respectivamente. La distribución de los huevos de estróngilos entre individuos de todas las edades fue sobre-dispersa o agregada, con una media aritmética general de $671,59 \pm 789,76$ y un valor de k o parámetro de agregación inversa de 0,72 (distribución de la binomial negativa). La edad de los animales (potrillos vs adultos) y los biotipos (deportivo vs trabajo) en la categoría adultos influenciaron la magnitud de los valores del hpg ($p < 0,001$). En esta última categoría el 35% de los animales fue responsable de la excreción de aproximadamente el 80% de los huevos eliminados en las pasturas. Si bien existen algunas diferencias con lo observado en países del hemisferio norte con poblaciones parasitarias más agregadas o sobre-dispersas, los TS para el control de los pequeños estróngilos en equinos adultos podrían también ser una estrategia válida bajo nuestras condiciones para disminuir la presión de selección sobre el genoma parasitario y permitir el desarrollo de poblaciones en refugio.

SUMMARY. *Fecal shedding of equine small strongyle eggs and its practical importance for selective treatment.* Small strongyles are the most prevalent and important parasites in grazing horses throughout the world and the widespread development of antihelmintic resistance has prompted in some countries of the northern hemisphere the application of selective treatments (ST) to reduce or delay the development of these phenomena. This strategy is based on determining strongyle fecal egg counts of all herd members and treating only those exceeding a certain threshold or cut off. However, there is an absence of basic information on horses maintained under climatic, grazing or management conditions different from those observed in the northern hemisphere. In this context, the aim of this study was to characterize the elimination of eggs of small strongyles in horses of different ages from 19 farms in the central area of Argentina. Out of a total of 436 horses, 90% showed positive strongyles egg counts and in these animals the count of eggs per gram of feces (epg) was under 200 and over 1,000 in 32% and 22% of the horses respectively. The distribution of strongyle eggs among individuals of all categories was over-dispersed or aggregated with a general epg arithmetic mean of 671.59 ± 789.76 and a value of the inverse aggregation parameter of 0.72 (negative binomial distribution). The age of the animals (foals vs. adults) and the biotypes in the adult category (sports vs. work) influenced the magnitude of the epg values ($P < 0.001$). In the latter category, approximately 35% of the animals were responsible for the excretion of approximately 80% of the eggs in the pastures. Although some differences on magnitude and distribution of strongyle fecal egg counts were observed in countries of the northern hemisphere, ST of small strongyles in adult equines could also be a valid strategy under Argentinian conditions to reduce the selection pressure on the parasitic genome and allow the development of refugia populations.

Palabras clave: Equinos, Pequeños estróngilos, Argentina, Eliminación de huevos, Tratamiento selectivo

Keywords: Equines, Small strongyles, Argentina, Egg shedding, Selective treatment

Introducción

Los pequeños estróngilos (grupo *Ciathostoma* o *Trichonema*) son un grupo numeroso de nematodos que pertenecen a 13 géneros reconocidos en los equinos (con más de 40 especies) y que se localizan como adultos en el ciego y colon (Lichtenfels et al. 2008). Los signos clínicos incluyen disminución del crecimiento, pérdidas de peso y cólicos, pero en la mayoría de los equinos, aún con cargas parasitarias de importancia, estas manifestaciones son generalmente subclínicas y limitadas a una enteropatía ligera. Sin embargo, los estadios larvales eventualmente pueden causar un síndrome complejo conocido como ciatostomiasis larval, caracterizado por una severa tiflocolitis con alta mortalidad (Love et al. 1999). Actualmente y en todo el mundo son considerados los parásitos equinos de mayor prevalencia y prácticamente todos los caballos en pastoreo adquieren este nematodo (Brady y Nichols 2009; Nielsen et al. 2019; Scott et al. 2015). En nuestro país, por ejemplo, los análisis coproparasitológicos equinos que se realizan para determinar el número de huevos por gramo de heces (hpg) muestran que más del 97% de los huevos observados en animales mayores de dos años pertenecen a los pequeños estróngilos (Anziani y Arduso 2017). Muchas de las especies que componen el grupo no desarrollan inmunidad protectora y, por lo tanto, son comunes en todas las categorías de equinos (Von Samson-Himmelstjerna 2012). Los programas de control llevados a cabo por más de 40 años basados en tratamientos masivos y frecuentes, han impulsado en todo el mundo el desarrollo de resistencia de estos nematodos a los antihelmínticos de amplio espectro (Matthews et al. 2016; Nielsen y Reinemeyer 2018). Esta situación está generando la reformulación de los actuales programas de control y de nuevas estrategias para disminuir la presión de selección que ejercen los antihelmínticos sobre el genoma parasitario. Una de las estrategias que aparece como más promisorias es la de los tratamientos selectivos (TS), la cual se basa en seleccionar individuos que excedan un determinado nivel (o *cut off*) del hpg dentro del grupo animal y dejar el resto sin tratamiento. Estas prácticas están siendo adoptadas en países de Europa y América del Norte (Nielsen y Reinemeyer 2018; Nielsen et al. 2014) pero muy poco es conocido sobre la posibilidad de aplicación y sus limitantes en otras regiones del mundo donde las prácticas de manejo, las condiciones climáticas y la transmisión de los parásitos pueden ser sustancialmente diferentes (Salas Romero et al. 2017; Nielsen et al. 2019). A partir de este contexto se plantearon los siguientes objetivos: **a)** caracterizar los perfiles en la eliminación de huevos de equinos en pastoreo de diferentes biotipos y edades mantenidos

bajo diferentes condiciones de manejo en el área central de la Argentina; y **b)** obtener información para estimar la posibilidad de instaurar estrategias de TS en el control de pequeños estróngilos y sus consecuencias sobre la contaminación de las pasturas.

Materiales y Métodos

a) Animales y establecimientos: la experiencia se realizó en 436 equinos (187 machos y 249 hembras) de diferentes edades (6 meses a 21 años) mantenidos bajo condiciones de pastoreo y pertenecientes a biotipos deportivos (polo y pura sangre de carrera) y de trabajo (criollos de *pedigree* y mestizos). El criterio para la inclusión de los animales en el estudio fue el de no haber recibido tratamiento antihelmíntico (bencimidazoles, pirantel o avermectinas) en los previos 60 días.

b) Toma de muestras y técnicas coproparasitológicas: las muestras de materia fecal se obtuvieron por masaje rectal o recogiendo las mismas directamente del suelo en los casos en que se observó defecar en forma espontánea a los animales experimentales. Todas las muestras fueron analizadas dentro de los cuatro días de obtenidas y conservadas a 4°C hasta su análisis. El hpg se determinó utilizando la técnica de Mc Master modificada (detección mínima = 10 hpg) (Roberts y O'Sullivan 1949) y alícuotas de las mismas, de 4 a 5 animales de cada establecimiento, fueron utilizadas para cultivos coproparasitológicos mantenidos en incubadora a 22-25°C por 14 días. Las larvas obtenidas fueron recuperadas a través de un aparato de Baermann y clasificadas de acuerdo a Russell (1948).

c) Análisis de los datos: la siguiente información fue obtenida para cada animal: raza, tipo de establecimiento (ganadero, haras, centros de transplante embrionario, entidades deportivas) y categoría de edad (potrillos: 6 meses a 2 años; jóvenes: 2 a 4 años; adultos: mayores a 4 años). Los valores individuales del hpg de cada equino y dentro de cada categoría de edad fueron clasificados de acuerdo a Nielsen et al. (2019) en tres grupos según el nivel de eliminación de huevos a las pasturas: bajos contaminadores (hpg de 0 a 200), moderados contaminadores (hpg de 200 a 500) y altos contaminadores (hpg mayor a 500). En la categoría de adultos, un modelo lineal generalizado fue llevado a cabo con los valores del hpg como variable de respuesta (asumiendo la distribución de la binomial negativa) utilizando el biotipo (deportivo o trabajo) como variable independiente. Un test de Chi cuadrado fue utilizado para establecer si los datos se ajustaban adecuadamente a la distribución de la binomial negativa (Shaw et al. 1998). El valor de agregación o disper-

sión k fue estimado de acuerdo a la siguiente fórmula: $k = M^2 - (V/n) / V - M$, donde M es la media aritmética, V es la varianza y “ n ” el número de muestras. Un valor decreciente de k corresponde a un mayor nivel de agregación en los valores del hpg (Morgan et al. 2005). Para todos los análisis se utilizó el programa Infostat de la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Resultados

En la Tabla 1 se presenta la distribución de los de caballos utilizados en la presente experiencia por biotipos y categoría de edad pertenecientes a 19 establecimientos de las provincias de Córdoba (12), Santa Fe (4), La Pampa (1), Buenos Aires (1) y Tucumán (1). De las 436 muestras individuales de materia fecal analizadas, 73% fueron de animales adultos y las restantes de animales jóvenes (8,7%) y de potrillos (18,3%). El 90% del total de los equinos mostró huevos de estróngilos en la materia fecal y de estos, el porcentaje de animales con valores menores a 200 hpg fue de 32%, mientras que el 22% de los equinos presentó valores mayores a 1.000 hpg. No se consideraron en los análisis coproparasitológicos realizados los huevos de otros nematodos o cestodos de observación común. Los resultados de los coprocultivos indicaron que más del 97% de las larvas fueron clasificadas como pertenecientes al grupo de los pequeños estróngilos.

Tabla 1. Distribución de los equinos según la edad considerando el biotipo y localización del establecimiento.

Establecimiento (Biotipo predominante)	Localización	Potrillos	Jóvenes	Adultos	N
		6 meses a 2 años	2-4 años	mayores a 4 años	
1 (trabajo)	Córdoba	0	1	10	11
2 (deporte)	Santa Fe	0	0	41	41
3 (deporte)	Buenos Aires	15	0	0	15
4 (deporte)	Córdoba	6	4	7	17
5 (deporte)	Córdoba	0	0	24	24
6 (deporte)	La Pampa	1	3	24	28
7 (trabajo)	Córdoba	12	1	11	24
8 (trabajo)	Córdoba	16	8	18	42
9 (deporte)	Córdoba	0	0	34	34
10 (deporte)	Santa Fe	0	0	14	14
11 (deporte)	Córdoba	0	0	21	21
12 (trabajo)	Córdoba	3	5	5	13
13 (trabajo)	Córdoba	0	0	12	12
14 (deporte)	Córdoba	0	0	31	31
15 (deporte)	Santa Fe	0	16	1	17
16 (trabajo)	Santa Fe	0	0	17	17
17 (deporte)	Córdoba	13	0	0	13
18 (deporte)	Córdoba	0	0	21	21
19 (deporte)	Tucumán	14	0	0	14
N (%)	-	80 (18,3)	38 (8,7)	318 (73)	436

La distribución de los huevos de estróngilos entre individuos de todas las categorías fue sobre-dispersa o agregada con una media aritmética general de $671,59 \pm 789,76$ y un valor de k o parámetro de agregación inversa de 0,72. La Figura1 sintetiza las variaciones del

hpg entre las poblaciones y las categorías de edades. La media y el valor de k resultaron menores en la categoría adultos que en las categorías de potrillos y jóvenes. En relación a los biotipos, se observaron diferencias significativas en los valores del hpg con medias de $922,16 \pm 1001,97$ y $562,8 \pm 649,74$ para los biotipos caracterizados como trabajo y deportivos respectivamente ($p < 0,001$). Se observó una mayor dispersión en los valores de los biotipos deportivos vs los de trabajo, con valores de k de 0,75 y 0,84 respectivamente ($p < 0,001$). El mayor número de muestras obtenidas perteneció a la categoría adultos (318 animales) y cuando se desagregaron los animales en función de su biotipo (27% de trabajo y 73% de deporte) también se observaron diferencias significativas ($p < 0,001$) entre ambos sub grupos (Figura 2). El parámetro de dispersión k pareció seguir a la media del hpg, indicando una tendencia a una menor agregación (mayor valor de k) en individuos de las categorías con medias altas; y más agregados o agrupados, en la que presentó una media menor de hpg (menor valor de k).

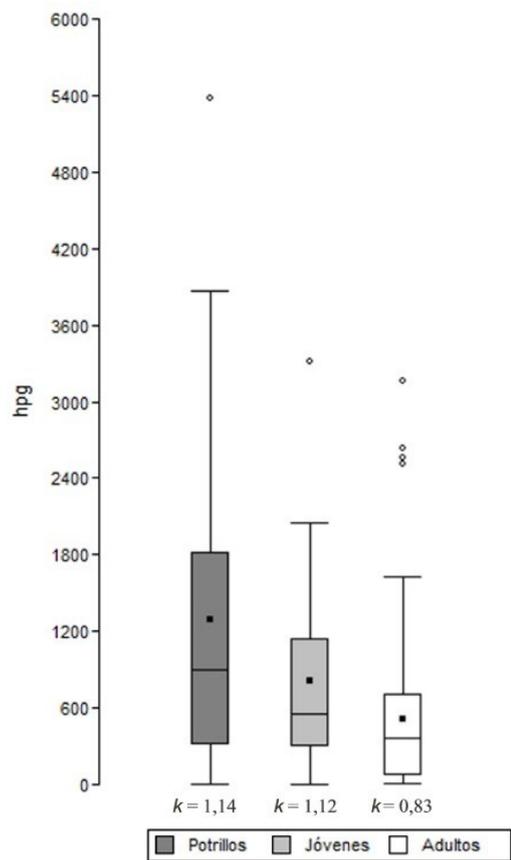


Figura 1. Distribución de los valores de hpg (huevos por gramo de materia fecal) en potrillos (n = 80) caballos jóvenes (n=38) y adultos (n=318) en 19 establecimientos. Promedios como puntos negros, medianas como líneas continuas dentro de las cajas y los valores extremos de hpg como círculos blancos. Los valores de k de cada categoría indican valor de dispersión o agregación.

La información sobre la producción total de huevos de estróngilos por categoría de animales estudiados es

presentada en la Tabla 2. Teniendo en cuenta el total de los animales, es de destacar que aproximadamente el 85% de los huevos eliminados a las pasturas fue aportado sólo por un 43% de la población (188 equinos).

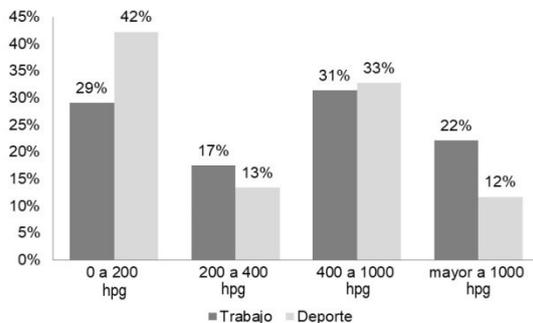


Figura 2. Distribución en rangos de los valores de hpg (huevos por gramo de materia fecal) considerando el biotipo (trabajo y deporte) en la categoría de equinos adultos.

Discusión

El desarrollo actual de la resistencia antihelmíntica en nematodos equinos exige una menor dependencia del uso masivo de antihelmínticos en los programas de control para disminuir la presión de selección que ejercen estas drogas sobre las poblaciones parasitarias. En la última década los nuevos programas de control en el hemisferio norte están promoviendo la aplicación selectiva de antihelmínticos y no la eliminación total de los nematodos. Esto permite la formación de poblaciones en *refugio* (parásitos que no son alcanzadas por los antihelmínticos) o reservorio de parásitos susceptibles que puede reproducirse con aquellos resistentes que sobreviven al tratamiento (Leathwick et al. 2019 ; Van Wyk, 2001). De esta forma, los genes resistentes pueden “diluirse” con los susceptibles y por lo tanto a mayor refugio menor desarrollo de la resistencia. Una de las maneras de seleccionar animales para estos TS es identificar por hpg a individuos con altos conteos de huevos y tratar a éstos solamente. Este método se ve favorecido porque la eliminación de huevos en individuos de la especie equina (a diferencia de lo observado en rumiantes) se caracteriza por permanecer consistente en el tiempo (Nielsen et al. 2014). El objetivo es reducir su transmisión y mantener las cargas parasitarias por debajo de niveles que puedan afectar la salud, productividad o *performance* (Nielsen et al. 2014; Relf et al. 2012; Stratford et al. 2014) y promover poblaciones en refugio. Uno de los requisitos básicos de estas nuevas estrategias es el conocimiento profundo de la distribución de los nematodos más relevantes de los equinos bajo las cambiantes situaciones climáticas, epidemiológicas y de manejo. La información generada en el presente estudio es una aproximación a este problema y provee información útil para caracterizar la eliminación de huevos por infecciones de pequeños estróngilos en equinos parasitados naturalmente por estos nematodos en la región central de la Argentina. La

prevalencia general observada en los huevos de estróngilos y la participación casi exclusiva de los pequeños estróngilos en los coprocultivos fue la esperada. Así mismo los mayores valores del hpg de los potrillos y animales jóvenes sobre los adultos confirma la información previa en estas categorías influenciadas probablemente por una menor inmunidad relativa (Boersema et al. 1996; Caffè et al. 2018; Chapman et al. 2003). Sin embargo, la magnitud de los valores del hpg resultan superiores a lo observado en estudios llevados a cabo durante la última década en el hemisferio norte (Becher et al. 2010; Relf et al., 2013). Es probable que estas diferencias resulten de una mayor tasa de infección parasitaria asociadas a las condiciones en las que se desarrolla nuestra producción equina nacional. Las condiciones climáticas en áreas como la del presente estudio favorecen la transmisión de nematodos durante todo el año. Así mismo, existe una mayor frecuencia relativa de tratamientos antihelmínticos en el hemisferio norte especialmente en equinos deportivos (Becher et al. 2018) comparada con observaciones en nuestro país (Universidad Católica de Córdoba, datos no publicados). Bajo condiciones de transmisión continua y cuando el número de tratamientos se reduce, hay un aumento proporcional en las poblaciones de pequeños estróngilos presentes en las pasturas y en los animales (Leathwick et al. 2019). Existe una pobre correlación entre los valores del hpg y la carga total parasitaria, especialmente cuando la proporción de larvas enquistadas en la mucosa del intestino grueso es alta, lo cual limita la capacidad diagnóstica o pronóstica de este método coprológico. Sin embargo y a pesar del limitado valor predictivo negativo del hpg, estudios sobre más de 600 necropsias equinas muestran que valores por debajo de los 500 hpg se corresponden significativamente a una menor carga parasitaria total, lo cual (en un rango de 0 a 500) podría ser utilizado para indicar o no la necesidad de tratamiento (Nielsen et al. 2010). Así mismo, uno de los pilares del control parasitario es disminuir la excreción de huevos en las pasturas, y para estos fines la técnica del hpg ha demostrado ser útil para la identificación de individuos que resultan ser los mayores contaminadores del medio ambiente con huevos. En este contexto, la American Association of Equine Practitioners (Nielsen et al. 2019) actualmente aconseja la clasificación de los caballos adultos en tres grupos de contaminadores en función del hpg individual: bajos (0 a 200) moderados (200 a 500) y altos (mayor a 500). En el presente estudio el 43% de los equinos resultó responsable de la eliminación de aproximadamente el 85% de los huevos en las pasturas. Existe consenso para considerar que los tratamientos selectivos deberían focalizarse en la categoría de adultos ya que la presencia de otros parásitos asociados a la edad joven, como por ejemplo *Parascaris* spp en potrillos, requiere consideraciones especiales. Así mismo, los fenómenos de inmunidad y una menor consistencia en la repetitividad del hpg en equinos jóvenes limitan la aplicación de los TS sólo a la categoría de adultos.

Tabla 2: Categorización de los equinos según la edad considerando su contribución a la eliminación general de huevos en las pasturas. (hpg =huevos por gramo de materia fecal, número de animales y porcentaje).

Animales y contaminación de pasturas	hpg	Potrillos 6 meses a 2 años		Jóvenes 2 a 4 años		Adultos mayores a 4 años	
		n (%)	Huevos eliminados (%)	n (%)	Huevos eliminados (%)	n (%)	Huevos eliminados (%)
<i>Bajos contaminadores</i>	0 a 200	10 (12,5)	0,6	7 (18,4)	2,0	127 (39,9)	4,6
<i>Medianos contaminadores</i>	200 a 500	18 (22,5)	5,6	12 (31,6)	14,3	74 (23,3)	17,1
<i>Altos contaminadores</i>	mayor a 500	52 (65)	93,8	19 (50)	83,7	117 (36,8)	78,3

En el hemisferio norte, diversos estudios indican que los valores de hpg en caballos mayores de 3 a 4 años tiende a seguir la regla 70/30, donde la mayoría de la población elimina una cantidad baja a moderada de huevos en la materia fecal, mientras que la minoría de los caballos (15 a 30%) elimina más del 80% de los mismos (Kaplan y Nielsen, 2010; Nielsen et al. 2019; Relf et al. 2013). En nuestro estudio la distribución fue diferente, con casi el 40% de los equinos adultos excretando aproximadamente el 80% del total de huevos. Si bien este porcentaje es mayor a lo observado en estudios llevados a cabo en E.E.U.U. (Kaplan y Nielsen, 2010) o Europa (Relf et al. 2013) de ninguna manera constituye una limitante para el uso de TS. Aun tratando el 50% de los animales, la otra mitad contribuye a desarrollar poblaciones en refugio de importancia y tal como lo demuestra información reciente con modelos simulados, esta estrategia permitiría reducir sustancialmente la presión de selección y demorar la aparición de resistencia (Leathwick et al. 2019). Es posible que, bajo nuestras condiciones, que favorecen la transmisión parasitaria, un umbral o *cut off* de 400-500 hpg podría ser adecuado para estos TS, pero se requiere de más investigaciones para evaluar esto. En síntesis, nuestro estudio mostró que, en 436 equinos de distintas edades, la eliminación en la mate-

ria fecal de huevos de pequeños estróngilos fue alta en frecuencia y magnitud y caracterizada por seguir la distribución de la binomial negativa. A la luz del desarrollo generalizado de la resistencia antihelmíntica, los tratamientos masivos ya no son sustentables y los datos obtenidos en el presente estudio deberían ayudar al desarrollo de nuevas recomendaciones y estrategias basadas en evidencias locales. Si bien la eliminación de huevos de nuestras poblaciones parasitarias presenta algunas diferencias con las observadas en el hemisferio norte (mayor magnitud y menor grado de agregación), los TS constituyen una interesante herramienta para controlar en forma individual el desarrollo de altas poblaciones de estos parásitos en los caballos adultos, permitiendo la formación de *refugio* de genotipos susceptibles a los antihelmínticos.

Agradecimientos

A la Secretaría de Investigación de la Universidad Católica de Córdoba por el financiamiento del presente trabajo.

Bibliografía

- Anziani O y Arduoso G. 2017. Resistencia antihelmíntica en nematodos intestinales que parasitan a los equinos en la Argentina. RIA. 43: 24-35.
- Becher A, Mahling M, Nielsen M, Pfister K. 2010. Selective anthelmintic therapy of horses in the Federal states of Bavaria (Germany) and Salzburg (Austria): An investigation into strongyle egg shedding consistency. Vet. Parasitol. 171: 116-122.
- Becher A, van Doorn D, Pfister R, Kaplan R, Reist M, Nielsen M. 2018. Veterinary parasitology equine parasite control and the role of national legislation – A multinational questionnaire survey. Vet. Parasitol. 259: 6-12.
- Boersema J, Eysker M, Maas J, van der Aar W. 1996. Comparison of the reappearance of strongyle eggs in foals, yearlings, and adult horses after treatment with ivermectin or pyrantel. Vet. Quart. 18: 7-9.
- Brady H and Nichols W. 2009. Drug resistance in equine parasites: an emerging global problem. J. Equine Vet. Sci. 29: 285-295.
- Caffe G, Paz Benard B, Cerutti J, Cooper L, Signorini M, Anziani O. 2018. Resistencia antihelmíntica en equinos. Observaciones sobre el período de reaparición de huevos luego del tratamiento con ivermectina en potrancas y yeguas madres. FAVE Cienc. Vet. 17: 40-44.
- Chapman M, French D, Klei T. 2003. Prevalence of strongyle nematodes in naturally infected ponies of different ages and during different seasons of the year in Louisiana. J. Parasitol. 89: 309-314.
- Kaplan RM, Nielsen MK. 2010. An evidence-based approach to equine parasite control: It ain't the 60s anymore. Equine Vet. Educ. 22: 306-316.

- Leathwick D, Sauermaann C, Nielsen M. 2019. Managing anthelmintic resistance in cyathostomin parasites: Investigating the benefits of refugia-based strategies. *Int. J. Parasitol. Drug.* 10: 118-124.
- Lichtenfels JR, Kharchenko VA, Dvojnos GM. 2008. Illustrated identification keys to strongylid parasites (strongylidae: Nematoda) of horses, zebras and asses (Equidae). *Vet. Parasitol.* 156:4-161.
- Love S, Murphy D, Mellor D. 1999. Pathogenicity of cyathostome infection. *Vet. Parasitol.* 85: 113-122.
- Matthews J, Archer D, Hodgkinson J. 2016. A questionnaire study of parasite control practices on Thoroughbred stud farms in the UK prevalence and epizootiology of equine. *Equine Vet. J.* 48: 5.
- Morgan E, Cavill L, Curry G, Wood R, Mitchell E. 2005. Effects of aggregation and sample size on composite faecal egg counts in sheep. *Vet. Parasitol.* 131: 79-87.
- Nielsen MK, Pfister K, Von Samson-Himmelstjerna G. 2014. Selective therapy in equine parasite control-Application and limitations. *Vet. Parasitol.* 202: 95-103.
- Nielsen, M.K., Reinemeyer, C., 2018. Anthelmintic resistance., en: Nielsen, M., Reinemeyer, C. (Eds.), *Handbook of equine parasite control*. Wiley-Blackwell, Hoboken, p. 284.
- Nielsen MK, Sauermaann C, Leathwick D. 2019. The effect of climate, season, and treatment intensity on anthelmintic resistance in cyathostomins: A modelling exercise. *Vet. Parasitol.* 269: 7-12.
- Nielsen MK, Baptiste KE, Tolliver SC, Collins SS, Lyons ET. 2010. Analysis of multiyear studies in horses in Kentucky to ascertain whether counts of eggs and larvae per gram of feces are reliable indicators of numbers of strongyles and ascarids present. *Vet. Parasitol.* 174: 77-84
- Relf V, Morgan E, Hodgkinson J, Matthews J. 2012. A questionnaire study on parasite control practices on UK breeding. *Equine Vet. J.* 44: 466-471.
- Relf V, Morgan E, Hodgkinson J, Matthews J. 2013. Helminth egg excretion with regard to age, gender and management practices on UK Thoroughbred studs. *Parasitology* 140: 641-652.
- Roberts F and O'Sullivan P. 1949. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastro-intestinal tract of cattle. *Aust. J. Agr. Res.* 1: 99-103.
- Russell AF. 1948. The development of helminthiasis in Thoroughbred foals. *J. Comp. Pathol. Ther.* 58: 107-127.
- Salas-Romero J, Gómez-Cabrera K, Aguilera-Valle L, Bertot J, Salas J, Arenal A, Nielsen M. 2017. Helminth egg excretion in horses kept under tropical conditions—Prevalence, distribution and risk factors. *Vet. Parasitol.* 243: 256-259.
- Scott I, Bishop RM, Pomroy WE. 2015. Anthelmintic resistance in equine helminth parasites – a growing issue for horse owners and veterinarians in New Zealand? *N. Z. Vet. J.* 63: 188-198.
- Shaw D, Grenfell B, Dobson A. 1998. Patterns of macroparasite aggregation in wildlife host populations. *Parasitology* 117: 597-608.
- Stratford CH, Lester HE, Morgan ER, Pickles KJ, Relf V, Mcgorum BC, Matthews JB. 2014. A questionnaire study of equine gastrointestinal parasite control in Scotland. *Equine Vet. J.* 46: 25-31.
- Van Wyk J. 2001. Refugia - Overlooked as perhaps the most potent factor concerning the development of anthelmintic resistance. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 68: 55-67.
- Von Samson-Himmelstjerna G. 2012. Anthelmintic resistance in equine parasites - detection, potential clinical relevance and implications for control. *Vet. Parasitol.* 185: 2-8.
-