ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL
DE LA USC

Rami
Salmo

Tesis doctoral

PREVENCIÓN SOSTENIBLE DE PARÁSITOS MEDIANTE HONGOS SAPRÓFITOS FORMULADOS EN ALIMENTOS

Lugo, 2025

Programa de doctorado en Medicina y Sanidad Veterinaria

ESCOLA DE DOUTORAMENTO
INTERNACIONAL DA USC

TESIS DOCTORAL

PREVENCIÓN SOSTENIBLE DE PARÁSITOS MEDIANTE HONGOS SAPRÓFITOS FORMULADOS EN ALIMENTOS

Autor

Rami Salmo

Directoras: María Sol Arias Vázquez y Cristiana Cazapal Monteiro

Tutor: Adolfo Paz Silva

PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA Y SANIDAD VETERINARIA

LUGO

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERÉS

Yo, RAMI SALMO, doctorando del Programa de Doctorado en Medicina y Sanidad Veterinaria declaro que no tengo ningún conflicto de interés con la tesis titulada "PREVENCIÓN SOSTENIBLE DE PARÁSITOS MEDIANTE HONGOS SAPRÓFITOS FORMULADOS EN ALIMENTOS". Mi participación en este trabajo es completamente imparcial y no está influenciada por intereses personales, financieros o profesionales que puedan afectar la objetividad de los resultados y conclusiones presentadas en esta investigación.

En Lugo, 16 de diciembre de 2024

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

شكر و امتنان

- ❖ إلى قديسي في السماء، الحاضر دائمًا في ذاكرتي ووجداني و صلاتي، الذي أوصلني إلى ما أنا عليه اليوم. إلى أبي الحبيب، الذي تحرسني صلواته أمام عرش الرب.
- ❖ إلى مصدر الحنان في حياتي، فراشة قلبي وسكرة أيامي. إلى أمي الحبيبة، التي يمنح وجودها حياتي معناها وقيمتها.
- ❖ إلى أختي العزيزة، رمز الدعم والتفاني الذي لا يُقدر بثمن، وإلى عائلتها التي لها مكانة خاصة في قلبي.
- ❖ إلى أخي الغالي، الداعم الأكبر ذو القلب الكبير، وإلى عائلته الحبيبة.
- ❖ إلى أصدقائي الحقيقيين، الذين ظلوا أوفياء و مخلصين رغم المسافات وصعوبة اللقاء، والذين لم يغيرهم الزمن. ولن أذكر أسماءكم حتى لا أنسى أحداً منكم، فمكانتكم محفوظة في قلبي.
- ❖ إلى وطني الحبيب، الذي أرجو أن أراه غانماً منعماً و سالماً مكرماً.

أهدي أطروحتي لنيل درجة الدكتوراه في الطب البيطري.
رامي نقولا سلمو
لوغو- إسبانيا

AGRADECIMIENTOS

A mi santo en el cielo, siempre presente en mi memoria, en mi ser y en mis oraciones, quien me ha llevado a ser quien soy hoy. A mi querido padre, cuyas oraciones me protegen ante el trono del Señor.

- ❖ A la fuente de ternura en mi vida, la mariposa de mi corazón y el dulce encanto de mis días. A mi amada madre, cuya existencia da significado y valor a mi vida.
- ❖ A mi querida hermana, símbolo de apoyo y devoción incalculable, y a su familia, que ocupa un lugar especial en mi corazón.
- ❖ A mi querido hermano, el mayor apoyo con un corazón generoso, y a su querida familia.
- ❖ A mis verdaderos amigos, quienes han permanecido fieles a pesar de las distancias y la dificultad de los encuentros, y que el tiempo no ha cambiado. No mencionaré nombres para no olvidar a ninguno, pues cada uno tiene un lugar guardado en mi corazón.
- ❖ A mi querida patria, con la esperanza de verla prosperar, bendecida, segura y digna.

- ❖ Quiero darles las gracias a los miembros del Grupo de Investigación COPAR, quienes con su colaboración han contribuido enormemente a mi desarrollo profesional y al desarrollo de esta Tesis.
- ❖ Un agradecimiento especial a mis directoras, Dra. María Sol Arias Vázquez y Dra. Cristiana Cazapal Monteiro, por su asistencia y paciencia, así como su ayuda en la realización, organización y culminación de mi Tesis.
- ❖ Asimismo, quiero expresar mi especial gratitud al Dr. Adolfo Paz Silva y a la Dra. Rita Sánchez-Andrade por acercarme a la Parasitología Veterinaria, enseñarme los protocolos de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

laboratorio, ayudarme siempre que lo he requerido y brindarme el apoyo necesario para colaborar con el Grupo COPAR, lo cual me ayudó tanto de manera financiera como práctica para el desarrollo de mi Tesis.

- Gracias a la USC por concederme una beca de un año que me brindó la oportunidad de continuar en Galicia y poder finalizar esta Tesis.
- Muchísimas gracias a Jaidioly Moreno y su familia, a quienes considero mi segunda familia, por brindarme siempre su apoyo y ofrecerme su hogar cuando necesité un lugar donde quedarme.
- Agradezco de corazón a José Ángel Hernández Malagón y Ceferino Manuel López Sandez por dedicarme su valioso tiempo para ayudarme.
- Agradecer a los catedráticos del Departamento, Dr. Pablo Díez Baños y Dra. Patrocinio Morrondo Pelayo y Dra. Rosario Panadero Fontán.
- Finalmente, agradezco a todas las personas amables, a todos los amigos que han pasado por mi vida durante estos 4 años de Doctorado y que han aportado cosas positivas y "buenas vibras" a mi vida.

Me complace obsequiarles mi Tesis Doctoral a todos ustedes
Rami Nicola Salmo

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

LISTA DE PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

- **Artículo nº1:**

Salmo R, Viña C, Lozano J, Palomero AM, Hernández JÁ, Bonilla R, Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A, Madeira de Carvalho LM, Arias MS, Cazapal-Monteiro C. (2024). Saprophytic Filamentous Fungi against Helminths Affecting Captive Wild Animals. *Encyclopedia*; *4(1)*: 91-100.

https://doi.org/10.3390/encyclopedia4010008

Publisher: MDPI, Basel, Switzerland. ISSN: 2673-8392

Journal quality indexes

Copernicus Index (2024): 95.02
Academic Search Ultimate (EBSCO)
Directory of Open Access Journals (DOAJ)
Citations: 6

- **Artículo nº2:**

Paz-Silva A, Salmo R, Viña C, Palomero AM, Hernández JÁ, Sánchez-Andrade R, Cazapal-Monteiro C, Arias MS. (2023). Gelatin treats containing filamentous fungi to promote sustainable control of helminths among pets and zoo animals. *Biological Control*,*179*,105184.

https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2023.105184

Publisher: ACADEMIC PRESS INC ELSEVIER SCIENCE. ISSN 1049-9644

Journal quality indexes

Journal Impact Factor (2023): 3.7 – 5-year Impact Factor: 4
Rank (2023): 10/109 (Q1) (ENTOMOLOGY)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- **Artículo nº3:**

Salmo R, Viña C, Zubiria I, Malagón JÁH, Sanchís JM, Cazapal C, Arias MS, Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A. (2024). Formulating Parasiticidal Fungi in Dried Edible Gelatins to Reduce the Risk of Infection by *Trichuris* sp. among Continuous Grazing Bison. *Pathogens*. *13(1)*:82.

https://doi.org/10.3390/pathogens13010082

Publisher: MDPI, Basel, Switzerland. EISSN: 2076-0817

Journal quality indexes

Journal Impact Factor (2023): 3.3 – 5 Year Impact Factor: 3.5
Rank (2024): 70/161; Q2 (MICROBIOLOGY)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ÍNDICE

1. SUMMARY / RESUMEN / RESUMO 1

1.1. SUMMARY 1

1.2. RESUMEN 9

1.3. RESUMO 18

2. INTRODUCCIÓN 26

2.1. Antecedentes históricos de las colecciones de animales 26

2.1.1. Especies animales mantenidas en cautividad en zoológicos 29

2.1.2. Zoonosis presentes en zoológicos 31

2.1.3. Parásitos que afectan a animales salvajes mantenidos en cautiverio en zoológicos 32

2.1.4. Parásitos identificados en herbívoros mantenidos en zoológicos 34

2.1.5. Control de la fase endógena 36

2.1.6. Control de la fase exógena 38

2.2. Domesticación de perros 39

2.2.1. La historia del perro y datos arqueológicos 39

2.2.2. Parásitos que afectan a perros y que pueden causar zoonosis en España 42

2.2.3. Patogenia y potencial zoonósico de los parásitos entéricos del perro 45

1.2.4. Patogenia y potencial zoonósico de los parásitos entéricos del gato 45

2.2.5. Prevalencia de helmintosis en mascotas 46

2.2.6. Control de los parásitos en las mascotas 47

2.3. Helmintos transmitidos por el suelo 51

2.3.1. Infección por ascáridos 52

2.3.2. Clasificación de *Toxocara* spp. 53

2.3.3. Ciclo biológico de *Toxocara* spp. 53

2.3.4. *Trichuris* spp. 57

2.3.5. Ciclo biológico de *Trichuris* spp. 58

2.3.6. Clasificación del género *Trichuris* spp. 58

2.3.7. Infección por *Trichuris* en los animales 59

2.3.8. Zoonosis causadas por *Trichuris* 60

2.3.9. Respuesta del hospedador frente al parásito 61

2.3.10. Resistencia del parásito frente a los antihelmínticos 61

2.4. Control biológico 62

2.4.1. Control biológico mediante derivados de plantas 63

2.4.2. Control biológico mediante bacterias y virus 63

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 74
4. MATERIAL Y MÉTODOS 76
3.1. Material y métodos utilizados en el Artículo 1. 76
3.2. Material y métodos utilizados en el Artículo 2. 76
3.2.1. Hongos telúricos 76
3.2.2. Preparación del medio de cultivo sólido y siembra de los hongos en placas. 77
3.2.4. Preparación de gelatina comestible con hongos parasiticidas. 78
3.3. Los estudios realizados se llevaron a cabo en las siguientes ubicaciones 80
53.4. Animales empleados en el Artículo 2. 81
3.5. Animales empleados en el Artículo 3. 82
3.6. Análisis estadístico 83
5. PUBLICACIONES 84
4.1. ARTÍCULO NÚMERO 1 84
4.2. ARTÍCULO NÚMERO 2 96
4.3. ARTÍCULO NÚMERO 3 107
6. DISCUSIÓN GENERAL 120
7. CONCLUSIONES 130
8. REFERENCIAS 132
9. ANEXOS 166
9.1. ANEXO I: LISTA DE TABLAS 166
9.2. ANEXO II: LISTA DE FIGURAS 167
9.3. ANEXO III: LISTA DE ABREVIATURAS 169
9.4. ANEXO IV: FIGURAS Y TABLAS 170

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1. SUMMARY / RESUMEN / RESUMO

1.1. SUMMARY

For thousands of years, cultures like the Egyptians, Chinese, and Greeks kept exotic animals as symbols of status and power. By the 15th and 16th centuries, European exploration intensified the trade of exotic animals, adding species from the Americas, such as parrots and iguanas, to royal collections. In the 18th century, these private collections began transitioning into public spaces in cities like London and Madrid, shifting the focus to public engagement. With the Industrial Revolution, zoos developed further, incorporating conservation, education, and recreation as central goals. Today, zoos work to replicate animals' natural habitats, fostering educational experiences and raising awareness of conservation. However, this close contact also brings zoonotic risks, like toxoplasmosis and Q fever, making hygiene practices and protective measures essential. Initiatives such as landscape immersion and environmental enrichment have further improved welfare by creating conditions closer to animals' native environments. Modern zoos are now multifaceted institutions, focusing on biodiversity conservation, scientific research, education, and animal welfare. Through these initiatives, zoos contribute to the preservation of endangered species and global biodiversity. Helminths, or parasitic worms, encompass phyla such as Platyhelminthes, Nematoda, and Acanthocephala are widespread in these environments. Captive wild animals are particularly vulnerable to parasitic infections due to factors such as confinement, stress, and shared enclosures that promote parasite accumulation in the soil. Among helminths in zoos, nematodes are the most common, followed by cestodes and trematodes. Many zoos house ruminants in pasture areas that mimic their natural habitats, which enhances their welfare but also supports the proliferation of gastrointestinal parasites. These organisms can thrive in humid, grassy settings, leading to frequent subclinical infections that, if undetected, may cause serious health issues.

Parasite transmission in zoos can occur through contaminated food, intermediate hosts such as insects and rodents, or the introduction of animals from other environments, particularly areas previously occupied by domestic animals. Parasites with direct life cycles, like certain nematodes, are particularly prevalent in captivity due to their ability to survive in the environment for extended periods. Gastrointestinal nematodes such as *Trichostrongylus*, *Nematodirus*, and *Trichuris*, as well as protozoa like *Eimeria* and *Entamoeba*, are commonly found in zoo herbivores. These parasites affect various animal families, and their detection is essential for effective health management in zoos. Regular monitoring and management of parasitic infections are critical to preventing serious disease and ensuring the well-being of captive animals.

USC DE COMPOSTELA

Parasite control in zoo animals involves thorough management of both the endogenous and exogenous phases of the parasite life cycle, with the goal of reducing parasite loads and the risk of zoonosis in captive environments. Below is a summary of the main aspects of each phase and the protocols applied in a specific zoo. The **endogenous control** of parasites relies on anthelmintic drugs to eliminate adult parasites in the definitive host. These treatments are effective against superficial intestinal forms but do not act on larva encysted in tissues, which can reactivate, completing their life cycle with the production of eggs which will be eliminated in the feces, without external reinfection:

- Personalized treatment: the selection and frequency of treatment are tailored to each animal, considering factors such as age, health, medical history, and environmental conditions that may influence infection risk, including contact with other animals.
- Administration routes: antiparasitic therapies may be administered orally (tablets, suspensions), topically (spot-on treatments), or via injection, with the route chosen based on the animal type and treatment conditions.
- Deworming protocol examples:
    - in a program applied to bovids in a zoo (2013-2017), a combination of fenbendazole and ivermectin was used with applications scheduled from March to November, with the anthelmintic selected according to each subfamily's needs (e.g., Caprinae, Bovinae).
    - in another case at the "Marcelle Natureza" Zoological Park (2024), doses of fenbendazole, mebendazole, and other drugs were tailored to each species (e.g., lynxes, wolves, foxes, ruminants) according to their specific requirements and results from parasitological assessments.

Exogenous control measures aim to reduce the presence of parasitic forms in the environment to minimize reinfection and zoonotic risk.

- Waste management: proper and frequent removal of feces is essential to prevent the spread of oocysts and other resistant forms in the environment, especially in species with high zoonotic infection risks (e.g., felines).
- Cleaning and disinfection: regular cleaning of enclosures and resting areas helps eliminate parasite residues and reduce infection risk. Recommendations include cleaning public areas after defecation, particularly for carnivores.
- Challenges in pasture management: while pasture rotation and species alternation are effective methods in livestock to disrupt parasite life cycles, their implementation in zoos is limited by space constraints and the stress animal movement may cause.
- Coprological analysis and regular monitoring: Frequent removal of faecal samples and coprological evaluation help adjust deworming programs and assess treatment effectiveness.

These measures are essential for the effective prevention and control of parasite infections in captive animals, supporting their health and minimizing zoonotic risks.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

The domestication of the dog is one of the oldest and most fascinating processes in human-animal relationships. This phenomenon likely began unintentionally during the Upper

Paleolithic, around 35,000 years ago, a period during which wolves began approaching human settlements in search of food. This interaction, known as proto-domestication, involved the most human-tolerant wolves gradually adapting to life alongside humans, establishing a close contact that resulted in the natural selection of less aggressive individuals. This process created an early form of cohabitation which, while not yet considered true domestication, marked the beginning of a special relationship between humans and wolves. The earliest archaeological evidence of differentiation between wolves and dogs comes from a fossil skull found in the Goyet Cave in Belgium, dated to about 31,700 years ago, suggesting that prehistoric dogs already existed during the Aurignacian period. However, the most compelling evidence of early domestication is from Bonn-Oberkassel in Germany, where the remains of a dog and a human were buried together 14,000 years ago, demonstrating a significant social bond between the two species. The development of improved hunting strategies, such as the use of arrows, may have intensified this collaboration. Pre-domesticated dogs helped track and retrieve prey, strengthening a mutually cooperative relationship with humans. At sites such as Ein Mallaha in the Levant, dated to 12,000 years ago, burials have been found that indicate a close bond between dogs and humans. The domestication process was neither linear nor uniform, spanning thousands of years and various geographic regions. Genetically, the wolf (*Canis lupus*) is the main ancestor of the dog (*Canis familiaris*), as studies reveal a 98% similarity in mitochondrial DNA between the two species. This genetic connection also indicates that the dog was, by far, the first domesticated animal, long before other agriculturally valuable animals, such as sheep, horses, or cattle, whose domestication occurred around 10,000 years ago with the advent of agriculture. The domestication of the dog was not only a biological process but also a social phenomenon involving genetic and phenotypic adaptations. Domesticated dogs developed traits distinct from their ancestors, adapting to their human environment and differentiating from wild populations through genetic drift. With advances in genetic sequencing, studies of ancient dog DNA are expected to further clarify the stages of domestication and the role of natural selection in shaping today's breeds.

In Spain, 27% of households had at least one dog and 17% had at least one cat in 2023, equating to 9.3 million dogs and 5.8 million cats. While pets provide psychological and physical benefits to their owners, they also carry health risks, including the transmission of parasites. Many of these parasites, including protozoa, helminths, and arthropods, have zoonotic potential, meaning they can be transmitted between animals and humans. Common zoonotic intestinal parasites include *Toxocara* spp., *Ancylostoma* spp., *Dipylidium caninum*, and species from the Taenidae family. Parasites like *Toxocara canis* and *Toxocara cati* are widespread in Spain, with infection rates in dogs ranging from 7.4-31.8%, and in cats from 7.7-58%. These parasites can be found in public spaces, such as playground sand, posing risks to Public Health, especially to children, as they can cause visceral or ocular *larva migrans* in humans. Similarly, *Ancylostoma* species, which cause cutaneous *larva migrans*, are also common and have been found in park soils in Spain. *D. caninum*, a tapeworm, affects a significant percentage of dogs and cats, and its transmission to humans usually occurs through ingestion of fleas or lice. Other helminths such as *Taenia* and *Echinococcus* species are also of concern. While human infections with *Taenia* are rare, *Echinococcus* species, especially *E. granulosus*, can cause

serious zoonotic diseases like cystic echinococcosis. The risk of transmission is increased in areas where pets frequently defecate in public spaces, which may become contaminated with infective parasite eggs. Recent studies highlight the increasing role of protozoan zoonotic diseases like *Giardia* and *Cryptosporidium*. These findings stress the need for regular veterinary care, including deworming, and the implementation of preventive measures such as proper hygiene and responsible pet ownership. The potential risks posed by imported pets carrying zoonotic parasites, particularly *E. multilocularis*, further underscore the need for strict pet health screening.

Preventive measures for controlling parasitic infections include regular veterinary check-ups, proper disposal of pet waste, hand hygiene, and avoiding raw meat feeding. For pet shelters and animal welfare organizations, there are specific guidelines to ensure proper parasite control and overall animal health. These efforts are essential for reducing the zoonotic risks posed by pet parasites in Spain.

Soil-transmitted helminths (STH) are a group of parasitic worms that infect humans and animals through contact with their eggs or larva. Among these, *Toxocara* and *Ancylostoma* are among the most prevalent, especially in tropical and subtropical regions, and are significant causes of physical and intellectual developmental delays in developing countries. The transmission of these parasites depends on the presence of infected individuals, the constant contamination of soil with feces, and environmental factors like soil temperature and humidity. Over 2 billion people are estimated to be infected globally with these helminths, with children being at higher risk due to their contact with contaminated areas like parks and grass. The *Ascarididae* family of nematodes, including *Toxocara* is a major cause of STH infections. While different *Toxocara* species are adapted to specific hosts, they can infect humans when their larva migrates erratically in the body. Commonly, these infections manifest as visceral *larva migrans* (VLM) or ocular *larva migrans* (OLM), causing damage to organs such as the liver, lungs, and eyes. Infections can remain asymptomatic or result in clinical symptoms depending on the severity, host immune response, and affected organs. Chronic toxocariasis can persist for years, especially in immunocompromised individuals. The *Toxocara* genus includes several species, with *T. canis* being the most commonly identified zoonotic species. Other species such as *T. cati*, *T. vitulorum*, and *T. pteropodis* are also of concern, with *T. cati* being less frequently associated with human infections. Among non-zoonotic species, *T. vitulorum* is economically significant. The taxonomy of *Toxocara* is well-defined, with 21 species identified to date. *Toxocara* species have a direct lifecycle. The eggs, released in the feces of definitive hosts like dogs (*T. canis*) and cats (*T. cati*), become infective after 1-4 weeks in the environment. Upon ingestion by a definitive host, larva hatch and migrate to organs like the lungs, liver, and intestines, where they mature and produce eggs. In young dogs and cats, larva undergo a full cycle, but in older animals, larva may remain dormant in tissues until reactivated, especially during pregnancy. Transmission can also occur via paratenic hosts (like rodents or other animals), with larva completing their development when consumed by the definitive host. *Toxocara* eggs are resilient and can survive in harsh environmental conditions due to their protective outer shell. The eggs mature into infective larva within 20-40 days under optimal conditions (22°C and 80% humidity). Temperature is a critical factor for the

development of eggs, with viability being highest at around 28°C. *Toxocara canis* is a zoonotic geohelminth that can infect humans through accidental ingestion of infective eggs in contaminated soil. These eggs can enter sewage systems through waste disposal and runoff, where they can survive wastewater treatment processes. Thus, *Toxocara* poses a significant Public Health risk, especially in areas with poor sanitation.

Tricuriosis is caused by *Trichuris* spp. that is preferentially located in the cecum and the first section of the colon. *T. trichiura*, the second most common helminth in humans, is responsible for this parasitic disease of worldwide distribution, considered a Neglected Tropical Disease. Infection occurs when embryonated eggs, containing L1 larva, are ingested through contaminated food, water, or soil. The eggs hatch in the intestine, releasing L1 larva that penetrate the epithelial layer of the colon and cecum, growing into adults. After reproduction, unembryonated eggs are excreted in feces, continuing the cycle. *Trichuris* belongs to the Nematoda phylum, Trichuridae family. *Trichuris* is commonly found in non-human primates, including species like macaques, baboons, and vervet monkeys. Infections can range from asymptomatic to severe, with clinical signs like enteritis, anorexia, and sometimes death. In ruminants, species like *T. ovis*, *T. globulosa*, and *T. skrjabini* affect sheep, goats, and cattle, with *T. ovis* being the most commonly detected. The parasite has also been found in other wild animals, including primates, camels, and zoo animals, indicating its broad distribution. *Trichuris* species, including *T. trichiura*, is a multi-host pathogen shared between humans and non-human primates, with evidence suggesting the presence of cryptic species. Recent studies have identified new species in primates, such as *Trichuris rhinopiptheroxella* and *Trichuris ursinus*, showing that *T. trichiura* is not the only whipworm infecting primates. There are significant gaps in the taxonomy of *Trichuris*, largely due to the lack of comparative morphological and genetic data. Host immunity against *Trichuris* varies with age, with younger animals being more susceptible and older animals developing some immunity. Female animals tend to show higher infection rates, possibly due to physiological stress. The treatment of *Trichuris* infections with benzimidazole (BZ) antihelmintics has been challenging, with low efficacy in both animals and humans. Multiple studies have shown that traditional treatments like albendazole and mebendazole have low cure rates for *T. trichiura* infections. Infections caused by *Trichuris* spp., particularly *T. trichiura*, are a significant health issue in both animals and humans. There is a need for better understanding the parasite's genetic diversity, its host interactions, and more effective treatments. Efforts should be made to prevent zoonotic transmission, particularly in settings like zoos, and to improve management protocols for both human and animal health.

Biological control is defined as an ecological method created by humans to reduce a pest or parasitic population to acceptable subclinical levels, or to maintain a population at a non-harmful level using natural antagonists. The use of these natural antagonists for unwanted species has led to very positive results in the control of certain agricultural pests. Intensive research has been carried out in recent decades on alternative methods of parasite control. These include pasture management, vaccine development, genetic selection of definitive hosts with some resistance to parasitic forms, and environmental biological control. This last approach is relevant in the control of zoonoses caused by soil-transmitted helminths, as there are certain

USC UNIVERSIDADE

species of saprophytic fungi in the environment with nematophagous capabilities. Certain natural plant extracts have been administered for a long time as dewormers for livestock, even when the scientific basis is inconclusive and most of the active compounds remain unknown. These plant derivatives can be obtained from forage legumes, trees and shrubs collected in temperate and tropical zones, with some of them showing other activities such as antioxidant or anti-inflammatory properties. Among the most common species are horned clover, common sainfoin, Chaco red quebracho or golden wattle. An interesting approach is to sow pastures with leguminous plants such as jumbay, black acacia or neem. It has been shown that saponins from Medicago species can exert different biological roles such as haemolytic, antimicrobial, insecticidal or anthelmintic against some plant nematodes. The use of different herbs such as garlic, pumpkin, thyme or artemisia against nematodes that infect livestock in organic regimes has been recommended.

An option that has been the subject of study in recent years is the use of nematophagous fungi to combat infectious parasitic forms found free in the environment. This approach is part of what is known as biological control. Fungi are a diverse group of organisms with heterotrophic nutrition, which means they do not have an internal digestive system. Most fungi are saprophytic, which means they feed on organic matter remains in the environment. However, in the case of nematophagous fungi, they can also act as predators of parasitic forms. These species are part of the normal soil microbiota, which demonstrates their ability to survive in adverse environmental conditions. The fact that these fungi can be isolated directly from the soil and from different habitats, as well as from feces, suggests that under natural conditions they are ingested and eliminated in feces without alterations. This capacity is essential to achieve practical benefits in their use as biological control agents, as they can survive passage through the digestive tract, develop in feces and maintain their predatory capacity intact. For these eukaryotic organisms to be suitable for use in biological control, they must have capacity for reproduction at an industrial level. Little research has been done on the usefulness of predatory fungi against the eggs of trematodes, cestodes or ascarids, most studies focusing on *Pochonia chlamydosporia*.

Recent research has demonstrated the ability of *Mucor circinelloides* to destroy the eggs of *Fasciola hepatica* and *Parascaris equorum* in the feces of infected animals. The possibility has been raised that the introduction of large quantities of these fungi into the environment could displace the microflora and mesofauna of the medium, which could cause an imbalance in ecosystems. Regarding this topic, it has been proven that *Duddingtonia flagrans* does not affect the population of fungi present in the soil or free-living nematodes nor microarthropods. The lack of adverse effects on animals that consume these fungi has also been demonstrated. In their activity, nematophagous fungi combine both a mechanical and chemical action, through the intervention of various products such as toxins or hydrolytic enzymes. There are different mechanisms for develop the parasiticide activity depending on their action.

- Nematode trapping fungi: these types of fungi form traps, such as rings, adherent endings, networks and columns of adhesive hyphae, that will capture nematode larva when nutrient availability is limited. When there are no larvae in the environment, they return to a saprophytic activity.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- Endoparasitic fungi, use spores to infect nematodes. They have limited saprophytic nutrition, which means they depend heavily on the presence of nematodes for survival.
- Ovicidal fungi are characterized by developing specialized structures for egg penetration, such as the *haustorium* and the *appressorium*.
- Toxin-producing fungi use different products to immobilize nematode larva before penetrating the cuticle with their hyphae.

The **first article** aims to review existing literature on the biological control of parasites in zoological parks and highlight its significance. It discusses the types of parasites commonly infecting animals in such settings, including ascarids, strongylids, trichurids, and bronchopulmonary nematodes. The study also examines challenges in managing parasites in captive animals, who often remain confined to the same plots of land, leading to high parasite concentrations in the environment. Additionally, it highlights issues such as the frequent use of parasiticidal drugs, improper dosages, and incorrect administration methods, which contribute to the emergence of drug-resistant strains of gastrointestinal nematodes, a problem parallel to that observed in livestock. To address these challenges, the study suggests an alternative approach: biological control using saprophytic fungi that act as natural antagonists to various parasites. Unlike chemical anthelmintics, this ecological method aims not to eliminate all parasites but to maintain a balance between host animals and parasites, avoiding adverse impacts on health or productivity. These parasiticidal fungi are categorized on their activity. The review provides an updated overview of trials conducted with parasiticidal fungi in zoological settings and their outcomes.

Based on these findings, the study proposes a comprehensive parasite control program for wild captive animals. This program integrates fecal analysis prior to deworming, the targeted use of suitable anthelmintics (such as benzimidazoles or macrocyclic lactones), and the periodic administration of chlamydospores from saprophytic fungi. Such an approach is presented as an innovative and effective contribution to the sustainable management of parasitic digestive infections in zoological parks. Furthermore, this eco-friendly strategy could extend beyond zoological gardens to include animals in public spaces, offering a safe and environmentally sustainable solution.

To support the first article and to develop a new edible formulation containing a specific concentration of parasitic fungi, *M. circinelloides* (ovicide) and *D. flagrans* (larvicide), for the control of helminths affecting animals, two assays were conducted in the **second article**. Firstly, gelatin-based treats were manufactured with a blend of 3-6×10^7 chlamydospores of each fungus and provided to three groups of six puppies, each shedding eggs of *T. canis*, three times a week for eight weeks. A similar assay was conducted on a group of six captive baboons, but some refused to ingest the gelatins, while others consumed them with difficulty. The second assay involved drying the gelatin treats and administering them (three times a week for eight weeks) to two other groups of six puppies infected with *T. canis* (different from those in assay I) and to six captive baboons in a zoo shedding eggs of *Trichuris* sp. This trial on baboons was performed in triplicate at four-month intervals. Feces collected after eight weeks were examined over four weeks, as previously described. The viability of *T. canis* eggs was significantly reduced by half with both edible formulations, and 44% of eggs reached the infective stage. In

the feces of baboons consuming the dried treats, 50% of *Trichuris* sp. eggs remained viable, and 14% became infective. Soil contamination by these nematodes was reduced to 20% and 5%, respectively.

It was concluded that gelatin treats containing chlamydospores of a blend of *M. circinelloides* and *D. flagrans* offer a highly effective and practical formulation for the biological control of helminths affecting pets. In addition to retaining high helminthicidal activity, dehydrating the gelatins provides a safe, easy-to-store edible formulation that is simple to administer to companion animals and captive wild species. Its use is strongly recommended to reduce the risk of infection by soil-transmitted helminths.

Finally, in the **third article,** to assure the importance of parasiticidal fungi in biological control specifically and the integration of parasitic control in animals in general, and to support the previous article about the utility of dehydrated gelatins, another experiment was conducted. It tested dried gelatins containing $\geq 10^6$ chlamydospores of both *M. circinelloides* and *D. flagrans* on captive bison maintained in the same plot at "Marcelle Natureza" Zoological Park to control *Trichuris* sp. Since anthelmintic treatments do not affect the survival and/or development of parasites in the soil until they reach the infective stage, the chance of infection should be considered high or even increasing. It must be emphasized that in the present research, egg viability dropped to less than half, and the risk of soil contamination by *Trichuris* sp. was reduced fivefold in feces containing parasiticidal fungi. Ovistatic and ovicidal effects were determined throughout the study. In fecal samples, the viability of *Trichuris* eggs decreased from 9% (in the first week) to 57% (by the fourth week). Egg development was delayed during the first two weeks, and the percentage of viable infective eggs was significantly lower than in control feces.

The data obtained after administering chlamydospores of *M. circinelloides* and *D. flagrans* to bison could be directly extrapolated to domestic ruminants kept on continuous grazing whereas the risk of infection should be expected to decrease significantly.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.2. RESUMEN

Durante miles de años, culturas como la egipcia, la china y la griega mantuvieron animales exóticos como símbolos de estatus y poder. En los siglos XV y XVI, los viajes realizados por los europeos intensificaron el comercio de animales exóticos, añadiendo especies de América, como loros e iguanas, a las colecciones reales. En el siglo XVIII, estas colecciones privadas comenzaron a transformarse en espacios públicos en ciudades como Londres y Madrid, cambiando el enfoque hacia la interacción con el público. Con la Revolución Industrial, los zoológicos evolucionaron aún más, incorporando la conservación, la educación y el recreo como objetivos centrales. Hoy en día, los zoológicos trabajan para simular los hábitats naturales de los animales, fomentando experiencias educativas y sensibilizando sobre la conservación. Sin embargo, este contacto cercano también conlleva riesgos zoonósicos, como la toxoplasmosis y la fiebre Q, lo que hace esenciales las prácticas de higiene y las medidas de protección. Iniciativas como la inmersión paisajística y el enriquecimiento ambiental han mejorado aún más el bienestar al crear condiciones más cercanas a los entornos nativos de los animales. Los zoológicos modernos son ahora instituciones multifacéticas, centradas en la conservación de la biodiversidad, la investigación científica, la educación y el bienestar animal. A través de estas iniciativas, los zoológicos contribuyen a la preservación de especies en peligro de extinción y la biodiversidad global. Los helmintos son parásitos que incluyen a los Platelmintos, Nematelmintos y Acantocéfalos y son comunes en estos entornos. Los animales silvestres en cautividad son particularmente vulnerables a las infecciones parasitarias debido a factores como el confinamiento, el estrés y los recintos compartidos que fomentan la acumulación de parásitos en el suelo. Entre los helmintos presentes en zoológicos, los nematodos son los más comunes, seguidos por los cestodos y los trematodos. Muchos zoológicos alojan rumiantes en áreas de pastoreo que imitan sus hábitats naturales, lo que mejora su bienestar, pero también favorece la proliferación de parásitos gastrointestinales. Estos organismos pueden prosperar en entornos húmedos y con hierba, causando infecciones subclínicas frecuentes que, si no se detectan, pueden derivar en problemas graves de salud. La transmisión de parásitos en zoológicos puede ocurrir a través de alimentos contaminados, hospedadores intermediarios como insectos y roedores, o la introducción de animales de otros entornos, especialmente áreas previamente ocupadas por animales domésticos. Los parásitos con ciclos de vida directos, como ciertos nematodos, son particularmente prevalentes en cautiverio debido a su capacidad de sobrevivir en el ambiente durante largos períodos. Nematodos gastrointestinales como *Trichostrongylus*, *Nematodirus* y *Trichuris*, así como protozoos como *Eimeria* y *Entamoeba*, son comúnmente hallados en herbívoros de zoológicos. Estos parásitos afectan a diversas familias de animales, y su detección es esencial para una gestión sanitaria eficaz en zoológicos. La monitorización y la gestión regular de las infecciones parasitarias son fundamentales para prevenir enfermedades graves y garantizar el bienestar de los animales en cautiverio.

El control de parásitos en los animales de zoológico implica la gestión exhaustiva de las fases endógena y exógena del ciclo de vida del parásito, con el objetivo de reducir las cargas parasitarias y el riesgo de zoonosis. A continuación, se resumen los principales aspectos de cada fase y los protocolos aplicados en un zoológico específico. El **control endógeno** de los parásitos

USC DE COMPOSTELA

se basa en fármacos antihelmínticos para eliminar los parásitos adultos en el hospedador definitivo. Estos tratamientos son eficaces contra formas intestinales superficiales, pero no actúan sobre larvas enquistadas en tejidos, las cuales pueden reactivarse, completando su ciclo biológico con la producción de huevos que serán eliminados en las heces, sin reinfección:

- Tratamiento personalizado: la selección y frecuencia del tratamiento se adaptan a cada animal, considerando factores como edad, salud, historial médico y condiciones ambientales que puedan influir en el riesgo de infección, incluido el contacto con otros animales.
- Vías de administración: las terapias antiparasitarias pueden administrarse oralmente (comprimidos, suspensiones), tópicamente (tratamientos *spot-on*) o mediante inyección, según el tipo de animal y las condiciones del tratamiento.
- Ejemplos de protocolos de desparasitación:
    - En bóvidos mantenidos en un zoológico entre 2013-2017 se utilizó una combinación de fenbendazol e ivermectina con aplicaciones programadas de marzo a noviembre, seleccionándose el antihelmíntico según las necesidades de cada subfamilia (p. ej., Caprinae, Bovinae).
    - En otro caso, en el Parque Zoológico "Marcelle Natureza" (2024), se ajustaron dosis de fenbendazol, mebendazol y otros fármacos a cada especie (p. ej., linces, lobos, zorros, rumiantes) según sus requerimientos específicos y los resultados de análisis coprológicos.

Las medidas de **control exógeno** buscan reducir la presencia de formas parasitarias en el ambiente para minimizar la reinfección y el riesgo de zoonosis.

- Gestión de residuos: la eliminación adecuada y frecuente de las heces es esencial para prevenir la propagación de ooquistes y otras formas resistentes en el ambiente, especialmente en especies con alto riesgo de infección zoonósica (p. ej., felinos).
- Limpieza y desinfección: la limpieza regular de recintos y áreas de descanso ayuda a eliminar formas parasitarias y reducir el riesgo de infección. Se recomienda limpiar los recintos tras la defecación, particularmente en carnívoros.
- Desafíos en la gestión de pastos: aunque la rotación de pastos y la alternancia de especies son métodos eficaces en la ganadería para interrumpir los ciclos biológicos de los parásitos, su implementación en zoológicos se ve limitada por restricciones de espacio y el estrés que puede causar el traslado de animales.
- Análisis coprológico y monitorización regular: la recogida frecuente de muestras fecales y la evaluación coprológica ayudan a ajustar los programas de desparasitación y a evaluar la eficacia de los tratamientos.

Estas medidas son esenciales para la prevención y el control eficaz de infecciones parasitarias en animales cautivos, manteniendo su salud y minimizando los riesgos zoonósicos.

La domesticación del perro es uno de los procesos más antiguos y fascinantes en las relaciones entre humanos y animales. Este fenómeno probablemente comenzó de manera no intencionada durante el Paleolítico Superior, hace unos 35.000 años, un periodo durante el cual los lobos comenzaron a acercarse a los asentamientos humanos en busca de alimento. Esta interacción, conocida como proto-domesticación, implicó que los lobos más tolerantes a los

humanos se adaptaran gradualmente a la vida junto a ellos, estableciendo un contacto cercano que resultó en la selección natural de individuos menos agresivos. Este proceso originó una forma temprana de convivencia que, aunque no se considera aún una verdadera domesticación, marcó el inicio de una relación especial entre humanos y lobos. La evidencia arqueológica más antigua que diferencia a lobos y perros proviene de un cráneo fósil encontrado en la cueva de Goyet en Bélgica, datado aproximadamente 31.700 años atrás, lo que sugiere que los perros prehistóricos ya existían durante el periodo Auriñaciense. Sin embargo, la evidencia más decisiva de domesticación temprana procede de Bonn-Oberkassel en Alemania, donde los restos de un perro y un humano fueron enterrados juntos hace 14.000 años, demostrando un vínculo social significativo entre ambas especies. La evolución de estrategias de caza mejoradas, como el uso de flechas, pudo haber intensificado esta colaboración. Los perros pre-domesticados ayudaban a rastrear y recuperar presas, fortaleciendo una relación cooperativa mutua con los humanos. En sitios como Ein Mallaha en el Levante, se han encontrado tumbas que indican un vínculo estrecho entre perros y humanos datados en 12.000 años. El proceso de domesticación no fue lineal ni uniforme, abarcando miles de años y diversas regiones geográficas. Genéticamente, el lobo (*Canis lupus*) es el principal ancestro del perro (*Canis familiaris*), ya que los estudios revelan una similitud del 98% en el ADN mitocondrial entre ambas especies. Esta conexión genética también indica que el perro fue el primer animal domesticado, mucho antes que otros animales valiosos para la agricultura, como ovejas, caballos o vacas, cuya domesticación ocurrió hace unos 10.000 años con la llegada de la agricultura. La domesticación del perro no fue solo un proceso biológico, sino también un fenómeno social que implicó adaptaciones genéticas y fenotípicas. Los perros domesticados desarrollaron rasgos distintos a los de sus ancestros, adaptándose a su entorno humano y diferenciándose de las poblaciones silvestres a través de la deriva genética. Con los avances en la secuenciación genética, se espera que los estudios de ADN antiguo de perros aclaren aún más las etapas de la domesticación y el papel de la selección natural en la formación de las razas actuales.

En España, en 2023, el 27% de los hogares tenía al menos un perro y el 17% al menos un gato, lo que equivale a 9,3 millones de perros y 5,8 millones de gatos. Si bien las mascotas proporcionan beneficios psicológicos y físicos a sus dueños, también conllevan riesgos para la salud, incluida la transmisión de parásitos. Muchos de estos parásitos, incluidos protozoos, helmintos y artrópodos, tienen potencial zoonósico, es decir, pueden transmitirse entre animales y humanos. Los parásitos intestinales zoonósicos comunes incluyen *Toxocara* spp., *Ancylostoma* spp., *Dipylidium caninum* y especies de la familia *Taenidae*. Los parásitos como *Toxocara canis* y *Toxocara cati* son muy comunes en España, con tasas de infección en perros que varían entre el 7,4-31,8% y en gatos del 7,7-58%. Estos parásitos pueden encontrarse en espacios públicos, como en la arena de parques infantiles, representando riesgos para la Salud Pública, especialmente para los niños, ya que pueden causar *larva migrans* visceral u ocular en humanos. De manera similar, las especies de *Ancylostoma*, que causan *larva migrans* cutánea, también son comunes y se han encontrado en suelos de parques en España. *D. caninum*, un cestodo, afecta a un porcentaje significativo de perros y gatos, y su transmisión a humanos generalmente ocurre por la ingestión de pulgas o piojos. Otros helmintos como diferentes

USC UNIVERSIDADE

especies de *Taenia* y *Echinococcus* también son motivo de preocupación. Aunque las infecciones humanas por *Taenia* son raras, las especies de *Echinococcus*, especialmente *E. granulosus*, pueden causar enfermedades zoonósicas graves como la equinococosis quística. El riesgo de transmisión aumenta en áreas donde las mascotas defecan con frecuencia en espacios públicos, que pueden contaminarse con huevos de parásitos infectantes. Estudios recientes destacan el creciente papel de enfermedades zoonósicas por protozoos como *Giardia* y *Cryptosporidium*. Estos hallazgos subrayan la necesidad de controles veterinarios regulares, incluidas desparasitaciones, y la implementación de medidas preventivas como una higiene adecuada y la tenencia responsable de mascotas. Los riesgos potenciales planteados por mascotas importadas que pueden introducir parásitos zoonósicos, particularmente *E. multilocularis*, subrayan aún más la necesidad de controles estrictos de salud animal. Las medidas preventivas para controlar las infecciones parasitarias incluyen revisiones veterinarias regulares, la eliminación adecuada de los desechos de las mascotas, la higiene de manos y evitar alimentar a las mascotas con carne cruda. Para los refugios de animales y las organizaciones de protección del bienestar animal, existen directrices específicas para garantizar un control adecuado de parásitos y la salud general de los animales. Estos esfuerzos son esenciales para reducir los riesgos zoonósicos planteados por los parásitos de las mascotas en España.

Los helmintos transmitidos por el suelo (HTS) son un grupo de parásitos que infectan a humanos y animales tras el contacto con sus huevos o larvas. Entre ellos, *Toxocara* y *Ancylostoma* son los más prevalentes, especialmente en regiones tropicales y subtropicales, y representan una causa significativa de retrasos en el desarrollo físico e intelectual en países en desarrollo. La transmisión de estos parásitos depende de la presencia de individuos infectados, la constante contaminación del suelo con heces y factores ambientales como la temperatura y la humedad del suelo. Se estima que más de 2 mil millones de personas están infectadas en todo el mundo con estos helmintos, siendo los niños los más vulnerables debido a su contacto con áreas contaminadas como parques y césped. La familia Ascarididae, que incluye a *Toxocara*, es una de las principales causas de infecciones por HTS. Aunque las diferentes especies de *Toxocara* están adaptadas a hospedadores específicos, pueden infectar a humanos cuando sus larvas migran erráticamente en el cuerpo. Estas infecciones suelen manifestarse como *larva migrans* visceral (LMV) o *larva migrans* ocular (LMO), causando daños en órganos como el hígado, los pulmones y los ojos. Las infecciones pueden ser asintomáticas o provocar síntomas clínicos dependiendo de la gravedad, la respuesta inmunitaria del hospedador y los órganos afectados. La toxocariosis crónica puede persistir durante años, especialmente en individuos inmunocomprometidos. El género *Toxocara* incluye varias especies, siendo *T. canis* la especie zoonósica más comúnmente identificada. Otras especies como *T. cati*, *T. vitulorum* y *T. pteropodis* también se deben tener en cuenta, aunque *T. cati* se asocia con menor frecuencia a infecciones humanas. Entre las especies no zoonósicas, *T. vitulorum* tiene relevancia económica. La taxonomía de *Toxocara* está bien definida, con 21 especies identificadas hasta la fecha, todas ellas con un ciclo biológico directo. Los huevos, liberados en las heces de hospedadores definitivos como perros (*T. canis*) y gatos (*T. cati*), se vuelven infectantes después de 1-4 semanas en el ambiente. Al ser ingeridos por un hospedador definitivo, las larvas eclosionan y migran hacia órganos como los pulmones, el hígado y los intestinos, donde

maduran y producen huevos. En perros y gatos jóvenes, las larvas completan el ciclo completo, pero en animales adultos, pueden permanecer latentes en los tejidos hasta ser reactivadas, especialmente durante el embarazo. La transmisión también puede ocurrir a través de hospedadores paraténicos (como roedores u otros animales), con las larvas completando su desarrollo cuando son consumidas por el hospedador definitivo. Los huevos son muy resistentes y pueden sobrevivir en condiciones ambientales adversas gracias a su capa externa protectora. Bajo condiciones óptimas (22°C y 80% de humedad), en los huevos se desarrollan las larvas infectantes en 20-40 días. La temperatura es un factor crítico para el desarrollo de los huevos, siendo mayor alrededor de los 28°C. *T. canis* es un geohelminto zoonósico que puede infectar a los humanos mediante la ingestión accidental de huevos infectantes en suelo contaminado. Estos huevos pueden entrar en sistemas de alcantarillado a través de desechos y escorrentías, donde pueden sobrevivir a los procesos de tratamiento de aguas residuales. Por lo tanto, este parásito representa un importante riesgo de Salud Pública, especialmente en áreas con saneamiento deficiente.

La tricuriosis es causada por *Trichuris* spp., que se localizan preferentemente en el ciego y la primera sección del colon. *T. trichiura*, el segundo helminto más común en humanos es responsable de esta enfermedad parasitaria de distribución mundial, considerada una enfermedad tropical desatendida. La infección ocurre cuando los huevos embrionados, que contienen L1, son ingeridos a través de alimentos, agua o suelo contaminados. Los huevos eclosionan en el intestino, liberándose la larva que penetra la capa epitelial del colon y el ciego, desarrollándose hasta convertirse en adultos. Después de reproducirse, los huevos no embrionados son excretados en las heces, continuando el ciclo. *Trichuris* pertenece al filo Nematoda, familia Trichuridae. *Trichuris* se encuentra comúnmente en primates no humanos, incluidas especies como macacos, babuinos y monos verdes. Las infecciones pueden variar de asintomáticas a graves, con signos clínicos como enteritis, anorexia y, a veces, la muerte. En rumiantes, especies como *T. ovis*, *T. globulosa* y *T. skrjabini* afectan a ovejas, cabras y ganado, siendo *T. ovis* la más detectada. El parásito también se ha encontrado en otros animales silvestres, incluidos primates, camellos y animales de zoológico, lo que indica su amplia distribución. Las especies de *Trichuris*, incluido *T. trichiura*, son patógenos de múltiples hospedadores compartidos entre humanos y primates no humanos, con evidencia que sugiere la presencia de especies crípticas. Estudios recientes han identificado nuevas especies en primates, como *Trichuris rhinopiptheroxella* y *Trichuris ursinus*, mostrando que *T. trichiura* no es el único tricocéfalo que infecta a primates. Existen importantes vacíos en la taxonomía de *Trichuris*, en gran parte debido a la falta de datos morfológicos y genéticos comparativos. La inmunidad del hospedador frente a *Trichuris* varía según la edad, siendo los animales más jóvenes más susceptibles, desarrollando los más viejos algo de inmunidad. Las hembras suelen mostrar tasas de infección más altas, posiblemente debido al estrés fisiológico. El tratamiento de las infecciones por *Trichuris*, que se realiza con benzimidazoles (BZ) resulta complicado, con baja eficacia tanto en animales como en humanos. Diversos estudios han mostrado que tratamientos tradicionales como albendazol y mebendazol tienen bajas tasas de curación en las infecciones por *T. trichiura*. Las infecciones causadas por *Trichuris* spp., particularmente *T. trichiura*, son un problema de salud significativo tanto en animales como en humanos. Es

necesario un mejor entendimiento de la diversidad genética del parásito, sus interacciones con los hospedadores y tratamientos más eficaces. Se deben hacer esfuerzos para prevenir la transmisión zoonósica, particularmente en lugares como zoológicos, y mejorar los protocolos de manejo para la salud humana y animal.

El control biológico se define como un método ecológico creado por los humanos para reducir una población de plagas o parásitos a niveles subclínicos aceptables, o para mantener una población en un nivel no dañino utilizando antagonistas naturales. Con el uso de estos antagonistas naturales frente a especies no deseadas se han obtenido resultados muy positivos en el control de ciertas plagas agrícolas. En las últimas décadas se ha realizado una intensa investigación sobre métodos alternativos de control de parásitos. Estos incluyen el manejo de pastizales, el desarrollo de vacunas, la selección genética de hospedadores definitivos con cierta resistencia a formas parasitarias, y el control biológico ambiental. Este último enfoque es relevante en el control de zoonosis causadas por helmintos transmitidos por el suelo, ya que existen ciertas especies de hongos saprófitos en el ambiente con capacidades nematófagas. Se han administrado ciertos extractos naturales de plantas durante mucho tiempo como antiparasitarios para el ganado, aunque la base científica es incierta y la mayoría de los compuestos activos siguen siendo desconocidos. Estos derivados de plantas se pueden obtener de leguminosas forrajeras, árboles y arbustos recolectados en zonas templadas y tropicales, algunos de los cuales muestran otras actividades como propiedades antioxidantes o antiinflamatorias. Entre las especies más comunes están el trébol cornudo, el sainfoin común, el quebracho rojo del Chaco o la mimosa dorada. Un enfoque interesante es sembrar pastos con plantas leguminosas como jumbay, acacia negra o neem. Se ha demostrado que las saponinas de especies de *Medicago* pueden ejercer diversos roles biológicos, como hemolíticos, antimicrobianos, insecticidas o antihelmínticos frente a algunos nematodos de plantas. Se ha recomendado el uso de diferentes hierbas como ajo, calabaza, tomillo o artemisa frente a los nematodos que infectan al ganado en regímenes ecológicos.

Una alternativa que ha sido objeto de estudio en los últimos años es el uso de hongos nematófagos para combatir formas parasitarias infecciosas presentes en el medio. Este enfoque es parte de lo que se conoce como control biológico. Los hongos son un grupo diverso de organismos con nutrición heterotrófica, lo que significa que no tienen un sistema digestivo interno. La mayoría de los hongos son saprófitos, lo que significa que se alimentan de los restos de materia orgánica en el ambiente. Sin embargo, en el caso de los hongos nematófagos, también pueden actuar como depredadores de formas parasitarias. Estas especies son parte del microbiota normal del suelo, lo que demuestra su capacidad para sobrevivir en condiciones ambientales adversas. El hecho de que estos hongos se puedan aislar directamente del suelo y de diferentes hábitats, así como de heces, sugiere que, en condiciones naturales, son ingeridos y eliminados en las heces sin alteraciones. Esta capacidad es esencial para lograr beneficios prácticos en su uso como agentes de control biológico, ya que pueden sobrevivir al paso a través del tracto digestivo, desarrollarse en las heces y mantener intacta su capacidad depredadora. Para que estos organismos eucariotas sean adecuados para su uso en control biológico, deben tener la capacidad de reproducirse a nivel industrial. Se ha realizado pocas investigaciones sobre la utilidad de los hongos depredadores frente a los huevos de trematodos, cestodos o ascáridos,

centrándose la mayoría de los estudios en *Pochonia chlamydosporia*. Estudios recientes han demostrado la capacidad de *Mucor circinelloides* para destruir los huevos de *Fasciola hepatica* y *Parascaris equorum* en las heces de animales infectados. Se ha planteado la posibilidad de que la introducción de grandes cantidades de estos hongos en el ambiente pueda desplazar la microflora y mesofauna del medio, lo que podría causar un desequilibrio en los ecosistemas. Sobre este tema, se ha demostrado que *Duddingtonia flagrans* no afecta a la población de hongos presentes en el suelo ni a los nematodos libres o microartrópodos. También se ha demostrado la ausencia de efectos adversos en los animales que consumen estos hongos. En su actividad, los hongos nematofágos combinan una acción mecánica y química, a través de la intervención de diversos productos como toxinas o enzimas hidrolíticas. Existen diferentes mecanismos para desarrollar la actividad parasiticida dependiendo de su acción.

- Hongos depredadores de nematodos: estos tipos de hongos forman trampas, como anillos, extremos adherentes, redes y columnas de hifas adhesivas, que capturan larvas de nematodos cuando la disponibilidad de nutrientes es limitada. Cuando no hay larvas en el ambiente, regresan a una actividad saprófita.
- Hongos endoparásitos, usan esporas para infectar a los nematodos. Tienen una nutrición saprófita limitada, lo que significa que dependen en gran medida de la presencia de nematodos para sobrevivir.
- Hongos ovicidas, se caracterizan por desarrollar estructuras especializadas para la penetración de los huevos, como el *haustorium* y el *appressorium*.
- Hongos productores de toxinas, utilizan diferentes productos para inmovilizar las larvas de nematodos antes de penetrar la cutícula con sus hifas.

El **primer artículo** tiene como objetivo revisar la literatura existente sobre el control biológico de parásitos en parques zoológicos y destacar su importancia. Se describen los parásitos que infectan comúnmente a los animales en estas localizaciones, incluidos ascáridos, estrongílidos, tricúridos y nematodos broncopulmonares. El estudio también examina los desafíos en la gestión de parásitos en animales cautivos, que a menudo permanecen confinados en las mismas parcelas, lo que conduce a altas concentraciones de parásitos en el medio. Además, resalta problemas como el uso frecuente de medicamentos antiparasitarios, las dosis inadecuadas y los métodos incorrectos de administración, lo que contribuye a la aparición de cepas resistentes a los medicamentos, un problema similar al observado en el ganado. Para abordar estos desafíos, el estudio sugiere un enfoque alternativo: el control biológico mediante hongos saprófitos que actúan como antagonistas naturales de diversos parásitos. A diferencia de los antihelmínticos químicos, este método ecológico no busca eliminar todos los parásitos, sino mantener un equilibrio entre los animales hospedadores y los parásitos, evitando impactos negativos en la salud o la productividad. Estos hongos parasiticidas se clasifican según su actividad. La revisión ofrece una visión actualizada de los ensayos realizados con hongos parasiticidas en parques zoológicos y sus resultados.

Basándose en estos hallazgos, se propone un programa integral de control de parásitos para animales salvajes cautivos que integra el análisis fecal previo a la desparasitación, el uso de antihelmínticos adecuados (como benzimidazoles o lactonas macrocíclicas) y la administración periódica de clamidosporas de hongos saprófitos. Este enfoque se presenta

como una contribución innovadora y eficaz para la gestión sostenible de infecciones parasitarias digestivas en parques zoológicos. Además, esta estrategia ecológica podría extenderse más allá de los zoológicos a espacios públicos con animales, ofreciendo una solución segura y sostenible para el medio.

Para respaldar el primer artículo y desarrollar una nueva formulación comestible que contenga una concentración específica de hongos parasiticidas, *M. circinelloides* (ovicida) y *D. flagrans* (larvicida), para el control de helmintos en animales, se realizaron dos ensayos en el **segundo artículo**. En primer lugar, se fabricó una formulación a base de gelatina con una mezcla de 3-6×10^7 clamidosporas de cada hongo, y se proporcionó tres veces por semana durante ocho semanas a tres grupos de seis cachorros que eliminaban huevos de *T. canis*. Un ensayo similar se realizó en un grupo de seis babuinos en cautividad, pero algunos se negaron a ingerir las gelatinas, mientras que otros las consumieron con dificultad. El segundo ensayo consistió en secar la formulación a base de gelatina y administrarla tres veces por semana durante ocho semanas a otros dos grupos de seis cachorros infectados con *T. canis* (diferentes de los del primer ensayo) y a seis babuinos cautivos en un zoológico que eliminaban huevos de *Trichuris* sp. Este ensayo en babuinos se realizó por triplicado a intervalos de cuatro meses. Las heces recolectadas después de ocho semanas se examinaron durante cuatro semanas. La viabilidad de los huevos de *T. canis* se redujo significativamente a la mitad con ambas formulaciones comestibles, y el 44% de los huevos alcanzaron la fase infectante. En las heces de los babuinos que consumieron la formulación deshidratada, el 50% de los huevos de *Trichuris* sp. permanecieron viables y el 14% se volvieron infectantes. La contaminación del suelo por estos nematodos se redujo al 20% y al 5%, respectivamente.

Se concluyó que la formulación a base de gelatina que contenía clamidosporas de *M. circinelloides* y de *D. flagrans* resultaba altamente eficaz y práctica para el control biológico de helmintos que afectan a mascotas. Además de mantener una alta actividad antihelmíntica, la deshidratación proporciona una formulación comestible segura, fácil de almacenar y simple de administrar tanto a animales de compañía como a especies silvestres en cautiverio. Se recomienda encarecidamente su uso para reducir el riesgo de infección por helmintos transmitidos por el suelo.

Finalmente, en el **tercer artículo**, para fortalecer la importancia de los hongos parasiticidas en el control biológico específicamente y la integración del control parasitario en animales en general, y para respaldar el artículo anterior sobre la utilidad de la formulación deshidratada, se realizó otro experimento. Se empleó la formulación deshidratada que contenía ≥10^6 clamidosporas de *M. circinelloides* y *D. flagrans* en bisontes cautivos mantenidos en la misma parcela en el Parque Zoológico "Marcelle Natureza" para controlar *Trichuris* sp. Dado que los tratamientos antihelmínticos no afectan la supervivencia y/o el desarrollo de los parásitos en el suelo hasta que alcanzan la fase infectante, el riesgo de infección debe considerarse alto o incluso creciente. En esta investigación, la viabilidad de los huevos disminuyó a menos de la mitad, y el riesgo de contaminación del suelo por *Trichuris* sp. se redujo cinco veces en las heces que contenían hongos parasiticidas. Los efectos ovistáticos y ovicidas se determinaron a lo largo del estudio. En las muestras fecales, la viabilidad de los huevos de *Trichuris* disminuyó del 9% (en la primera semana) al 57% (en la cuarta semana). El

USC UNIVERSIDADE

desarrollo de los huevos se retrasó durante las dos primeras semanas, y el porcentaje de huevos infectantes viables fue significativamente menor que en las heces del grupo testigo.

Los resultados obtenidos tras la administración de clamidosporas de *M. circinelloides* y *D. flagrans* a bisontes podrían extrapolarse directamente a rumiantes domésticos mantenidos en pastoreo continuo, donde se espera que el riesgo de infección disminuya significativamente.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.3. RESUMO

Durante miles de anos, culturas como a exipcia, a chinesa e a grega mantiveron animais exóticos como símbolos de estatus e poder. Nos séculos XV e XVI, as viaxes realizadas polos europeos intensificaron o comercio de animais exóticos, engadindo especies de América, como papagaios e iguanas, ás coleccións reais. No século XVIII, estas coleccións privadas comezaron a transformarse en espazos públicos en cidades como Londres e Madrid, cambiando o enfoque cara á interacción co público. Coa Revolución Industrial, os zoolóxicos evolucionaron aínda máis, incorporando a conservación, a educación e o recreo como obxectivos centrais. Hoxe en día, os zoolóxicos traballan para simular os hábitats naturais dos animais, fomentando experiencias educativas e sensibilizando sobre a conservación. Porén, este contacto próximo tamén leva consigo riscos zoonósicos, como a toxoplasmose e a febre Q, o que fai esenciais as prácticas de hixiene e as medidas de protección. Iniciativas como a inmersión paisaxística e o enriquecemento ambiental melloraron aínda máis o benestar ao crear condicións máis próximas aos contornos nativos dos animais. Os zoolóxicos modernos son agora institucións multifacéticas, centradas na conservación da biodiversidade, a investigación científica, a educación e o benestar animal. A través destas iniciativas, os zoolóxicos contribúen á preservación de especies en perigo de extinción e da biodiversidade global. Os helmintos son parasitos que inclúen aos Platelmintos, Nematelmintos e Acantocéfalos e son comúns nestes contornos. Os animais silvestres en catividade son particularmente vulnerables ás infeccións parasitarias debido a factores como o confinamento, o estrés e os recintos compartidos que fomentan a acumulación de parasitos no solo. Entre os helmintos presentes nos zoolóxicos, os nematodos son os máis comúns, seguidos polos cestodos e os trematodos. Moitos zoolóxicos aloxan ruminantes en áreas de pastoreo que imitan os seus hábitats naturais, o que mellora o seu benestar, pero tamén favorece a proliferación de parasitos gastrointestinais. Estes organismos poden prosperar en contornos húmidos e con herba, causando infeccións subclínicas frecuentes que, se non se detectan, poden derivar en problemas graves de saúde. A transmisión de parasitos en zoolóxicos pode ocorrer a través de alimentos contaminados, hospedadores intermediarios como insectos e roedores, ou a introdución de animais doutros contornos, especialmente áreas previamente ocupadas por animais domésticos. Os parasitos con ciclos de vida directos, como certos nematodos, son particularmente prevalentes en catividade debido á súa capacidade de sobrevivir no ambiente durante longos períodos. Nematodos gastrointestinais como *Trichostrongylus*, *Nematodirus* e *Trichuris*, así como protozoos como *Eimeria* e *Entamoeba*, son comunmente atopados en herbívoros de zoolóxicos. Estes parasitos afectan a diversas familias de animais, e a súa detección é esencial para unha xestión sanitaria eficaz nos zoolóxicos. A monitorización e a xestión regular das infeccións parasitarias son fundamentais para previr enfermidades graves e garantir o benestar dos animais en catividade.

O control de parasitos nos animais de zoolóxico implica a xestión exhaustiva das fases endóxena e exóxena do ciclo de vida do parasito, co obxectivo de reducir as cargas parasitarias e o risco de zoonoses. A continuación, resúmense os principais aspectos de cada fase e os protocolos aplicados nun zoolóxico específico. O **control endóxeno** dos parasitos baséase en fármacos antihelmínticos para eliminar os parasitos adultos no hospedador definitivo. Estes tratamentos son eficaces contra formas intestinais superficiais, pero non actúan sobre larvas

USC DE COMPOSTELA

enquistadas en tecidos, que poden reactivarse, completando o seu ciclo biolóxico coa produción de ovos que serán eliminados nas feces, sen reinfección:

- Tratamento personalizado: a selección e frecuencia do tratamento adáptanse a cada animal, considerando factores como idade, saúde, historial médico e condicións ambientais que poidan influír no risco de infección, incluído o contacto con outros animais.
- Vías de administración: as terapias antiparasitarias poden administrarse oralmente (comprimidos, suspensións), tópicamente (tratamentos *spot-on*) ou mediante inxección, segundo o tipo de animal e as condicións do tratamento.
- Exemplos de protocolos de desparasitación:
    - Nos bóvidos mantidos nun zoolóxico entre 2013-2017 utilizouse unha combinación de fenbendazol e ivermectina con aplicacións programadas de marzo a novembro, seleccionándose o antihelmíntico segundo as necesidades de cada subfamilia (p. ex., Caprinae, Bovinae).
    - Noutro caso, no Parque Zoolóxico "Marcelle Natureza" (2024), axustáronse doses de fenbendazol, mebendazol e outros fármacos a cada especie (p. ex., linces, lobos, raposos, ruminantes) segundo os seus requirimentos específicos e os resultados das análises coprolóxicas.

As medidas de **control exógeno** buscan reducir a presenza de formas parasitarias no medio para minimizar a reinfección e o risco de zoonoses:

- Xestión de residuos: a eliminación adecuada e frecuente das feces é esencial para previr a propagación de ooquistes e outras formas resistentes no medio, especialmente en especies con alto risco de infección zoonósica (p. ex., felinos).
- Limpeza e desinfección: a limpeza regular de recintos e áreas de descanso axuda a eliminar as formas parasitarias e reducir o risco de infección. Recoméndase limpar os recintos tras a defecación, particularmente en carnívoros.
- Desafíos na xestión de pastos: aínda que a rotación de pastos e a alternancia de especies son métodos eficaces na gandaría para interromper os ciclos biolóxicos dos parasitos, a súa implementación en zoolóxicos vese limitada por restricións de espazo e o estrés que pode causar o traslado de animais.
- Análise coprolóxica e monitorización regular: a recollida frecuente de mostras fecais e a avaliación coprolóxica axudan a axustar os programas de desparasitación e a avaliar a eficacia dos tratamentos.

Estas medidas son esenciais para a prevención e o control eficaz de infeccións parasitarias en animais cautivos, mantendo a súa saúde e minimizando os riscos zoonósicos.

A domesticación do can é un dos procesos máis antigos e fascinantes nas relacións entre humanos e animais. Este fenómeno probablemente comezou de maneira non intencionada durante o Paleolítico Superior, hai uns 35.000 anos, un período no cal os lobos comezaron a achegarse aos asentamentos humanos na procura de alimento. Esta interacción, coñecida como proto-domesticación, implicou que os lobos máis tolerantes aos humanos se adaptasen gradualmente á vida xunto a eles, establecendo un contacto próximo que resultou na selección natural de individuos menos agresivos. Este proceso orixinou unha forma temperá de convivencia que, aínda que non se considera unha verdadeira domesticación, marcou o inicio

dunha relación especial entre humanos e lobos. A evidencia arqueolóxica máis antiga que diferencia lobos e cans provén dun craneo fósil atopado na cova de Goyet en Bélxica, datado aproximadamente en 31.700 anos, o que suxire que os cans prehistóricos xa existían durante o período Auriñaciense. Porén, a evidencia máis decisiva de domesticación temperá procede de Bonn-Oberkassel en Alemaña, onde os restos dun can e un humano foron enterrados xuntos hai 14.000 anos, demostrando un vínculo social significativo entre ambas especies. A evolución de estratexias de caza melloradas, como o uso de frechas, puido intensificar esta colaboración. Os cans pre-domesticados axudaban a rastrexar e recuperar presas, fortalecendo unha relación cooperativa mutua cos humanos. En sitios como Ein Mallaha no Levante, atopáronse tumbas que indican un vínculo estreito entre cans e humanos datado en 12.000 anos. O proceso de domesticación non foi lineal nin uniforme, abarcando miles de anos e diversas rexións xeográficas. Xeneticamente, o lobo (*Canis lupus*) é o principal antepasado do can (*Canis familiaris*), xa que os estudos revelan unha similitude do 98% no ADN mitocondrial entre ambas especies. Esta conexión xenética tamén indica que o can foi o primeiro animal domesticado, moito antes que outros animais valiosos para a agricultura, como ovellas, cabalos ou vacas, cuxa domesticación ocorreu hai uns 10.000 anos coa chegada da agricultura. A domesticación do can non foi só un proceso biolóxico, senón tamén un fenómeno social que implicou adaptacións xenéticas e fenotípicas. Os cans domesticados desenvolveron trazos distintos aos dos seus devanceiros, adaptándose ao seu entorno humano e diferenciándose das poboacións silvestres a través da deriva xenética. Cos avances na secuenciación xenética, espérase que os estudos de ADN antigo de cans aclaren aínda máis as etapas da domesticación e o papel da selección natural na formación das razas actuais.

En España, en 2023, o 27% dos fogares tiña polo menos un can e o 17% polo menos un gato, o que equivale a 9,3 millóns de cans e 5,8 millóns de gatos. Aínda que as mascotas proporcionan beneficios psicolóxicos e físicos aos seus donos, tamén levan consigo riscos para a saúde, incluída a transmisión de parasitos. Moitos destes parasitos, incluídos protozoos, helmintos e artrópodos, teñen potencial zoonósico, é dicir, poden transmitirse entre animais e humanos. Os parasitos intestinais zoonósicos comúns inclúen *Toxocara* spp., *Ancylostoma* spp., *Dipylidium caninum* e especies da familia Taenidae. Os parasitos como *Toxocara canis* e *Toxocara cati* son moi comúns en España, con taxas de infección en cans que varían entre o 7,4-31,8% e en gatos do 7,7-58%. Estes parasitos poden atoparse en espazos públicos, como na area de parques infantís, representando riscos para a Saúde Pública, especialmente para os nenos, xa que poden causar *larva migrans* visceral ou ocular en humanos. De maneira similar, as especies de *Ancylostoma*, que causan *larva migrans* cutánea, tamén son comúns e foron detectadas en solos de parques en España. *D. Caninum* é un cestodo que afecta a unha porcentaxe significativa de cans e gatos, e a súa transmisión a humanos adoita ocorrer pola inxestión de pulgas ou piollos. Outros helmintos como diferentes especies de *Taenia* e *Echinococcus* tamén son motivo de preocupación. Aínda que as infeccións humanas por *Taenia* son raras, as especies de *Echinococcus*, especialmente *E. granulosus*, poden causar enfermidades zoonósicas graves como a equinococose quística. O risco de transmisión aumenta en áreas onde as mascotas defecan con frecuencia en espazos públicos, que poden contaminarse con ovos de parasitos infectantes. Estudos recentes destacan o crecente papel de enfermidades

zoonósicas por protozoos como *Giardia* e *Cryptosporidium*. Estes achados subliñan a necesidade de controis veterinarios regulares, incluídas desparasitacións, e a implementación de medidas preventivas como unha hixiene adecuada e a tenza responsable de mascotas. Os riscos potenciais derivados de mascotas importadas que poden introducir parasitos zoonósicos, particularmente *E. multilocularis*, subliñan aínda máis a necesidade de controis estritos de saúde animal. As medidas preventivas para controlar as infeccións parasitarias inclúen revisións veterinarias regulares, a eliminación adecuada das feces das mascotas, a hixiene de mans e evitar alimentar ás mascotas con carne crúa. Para os refuxios de animais e as organizacións de protección do benestar animal, existen directrices específicas para garantir un control adecuado de parasitos e a saúde xeral dos animais. Estes esforzos son esenciais para reducir os riscos zoonósicos derivados dos parasitos das mascotas en España.

Os helmintos transmitidos polo solo (HTS) son un grupo de parasitos que infectan a humanos e animais tras o contacto cos seus ovos ou larvas. Entre eles, *Toxocara* e *Ancylostoma* son os máis prevalentes, especialmente en rexións tropicais e subtropicais, e representan unha causa significativa de atrasos no desenvolvemento físico e intelectual en países en desenvolvemento. A transmisión destes parasitos depende da presenza de individuos infectados, da constante contaminación do solo con feces e de factores ambientais como a temperatura e a humidade do solo. Estímase que máis de 2.000 millóns de persoas están infectadas en todo o mundo con estes helmintos, sendo os nenos os máis vulnerables debido ao seu contacto con áreas contaminadas como parques e céspede. A familia Ascarididae, que inclúe o xénero *Toxocara*, é unha das principais causas de infeccións por HTS. Aínda que as diferentes especies de *Toxocara* están adaptadas a hospedadores específicos, poden infectar a humanos cando as súas larvas migran erraticamente polo corpo. Estas infeccións adoitan manifestarse como *larva migrans* visceral (LMV) ou *larva migrans* ocular (LMO), causando danos en órganos como o fígado, os pulmóns e os ollos. As infeccións poden ser asintomáticas ou provocar signos clínicos dependendo da gravidade, da resposta inmunitaria do hospedador e dos órganos afectados. A toxocariose crónica pode persistir durante anos, especialmente en individuos inmunocomprometidos. O xénero *Toxocara* inclúe varias especies, sendo *T. canis* a especie zoonósica máis comunmente identificada. Outras especies como *T. cati*, *T. vitulorum* e *T. pteropodis* tamén se deben ter en conta, aínda que *T. cati* asóciase con menor frecuencia a infeccións humanas. Entre as especies non zoonósicas, *T. vitulorum* ten relevancia económica. A taxonomía de *Toxocara* está ben definida, con 21 especies identificadas ata a data, todas elas cun ciclo biolóxico directo. Os ovos, liberados nas feces de hospedadores definitivos como cans (*T. canis*) e gatos (*T. cati*), convértense en infectantes despois de 1-4 semanas no medio. Ao ser inxeridas por un hospedador definitivo, as larvas migran cara a órganos como os pulmóns, o fígado e os intestinos, onde maduran e producen ovos. En cans e gatos novos, as larvas completan o ciclo completo, pero en animais adultos poden permanecer latentes nos tecidos ata ser reactivadas, especialmente durante o embarazo. A transmisión tamén pode ocorrer a través de hospedadores paraténicos (como roedores ou outros animais), coas larvas completando o seu desenvolvemento cando son consumidas polo hospedador definitivo. Os ovos son moi resistentes e poden sobrevivir en condicións ambientais adversas grazas á súa capa externa protectora. Baixo condicións óptimas (22°C e 80% de humidade), nos ovos desenvólvense as

larvas infectantes en 20-40 días. A temperatura é un factor crítico para o desenvolvemento dos ovos, sendo maior ao redor dos 28°C. *T. canis* é un geohelminto zoonósico que pode infectar aos humanos mediante a inxestión accidental de ovos infectantes en solo contaminado. Estes ovos poden entrar en sistemas de sumidoiros a través de refugallos e escorrentías, onde poden sobrevivir aos procesos de tratamento de augas residuais. Por tanto, este parasito representa un importante risco para a Saúde Pública, especialmente en áreas con saneamento deficiente.

A tricuriose é causada por *Trichuris* spp., que se localizan preferentemente no cego e na primeira sección do colon. *T. trichiura*, o segundo helminto máis común nos humanos, é responsable desta enfermidade parasitaria de distribución mundial, considerada unha enfermidade tropical desatendida. A infección ocorre cando os ovos embrionados, que conteñen L1, son inxeridos a través de alimentos, auga ou solo contaminados. Os ovos eclosionan no intestino, liberando a larva que penetra a capa epitelial do colon e o cego, desenvolvéndose ata converterse en adulto. Despois de reproducirse, os ovos non embrionados son excretados nas feces, continuando o ciclo.

Trichuris pertence ao filo Nematoda, familia Trichuridae. *Trichuris* atópase comunmente en primates non humanos, incluíndo especies como macacos, babuínos e monos verdes. As infeccións poden variar de asintomáticas a graves, con signos clínicos como enterite, anorexia e, ás veces, a morte. Nos ruminantes, especies como *T. ovis*, *T. globulosa* e *T. skrjabini* afectan a ovellas, cabras e gando, sendo *T. ovis* a máis detectada. O parasito tamén foi atopado noutros animais silvestres, incluíndo primates, camelos e animais de zoolóxico, o que indica a súa ampla distribución. As especies de *Trichuris*, incluída *T. trichiura*, son patóxenos de múltiples hospedadores compartidos entre humanos e primates non humanos, con evidencias que suxiren a presenza de especies crípticas. Estudos recentes identificaron novas especies en primates, como *Trichuris rhinopiptheroxella* e *Trichuris ursinus*, mostrando que *T. trichiura* non é o único tricocéfalo que infecta primates. Existen importantes baleiros na taxonomía de *Trichuris*, en gran parte debido á falta de datos morfolóxicos e xenéticos comparativos. A inmunidade do hospedador fronte a *Trichuris* varía segundo a idade, sendo os animais máis novos máis susceptibles, mentres que os máis vellos desenvolven certa inmunidade. As femias adoitan mostrar taxas de infección máis altas, posiblemente debido ao estrés fisiolóxico. O tratamento das infeccións por *Trichuris*, realizado con benzimidazois (BZ), resulta complicado, con baixa eficacia tanto en animais como en humanos. Diversos estudos demostraron que tratamentos tradicionais como o albendazol e o mebendazol teñen baixas taxas de curación nas infeccións por *T. trichiura*. As infeccións causadas por *Trichuris* spp., particularmente *T. trichiura*, son un problema de saúde significativo tanto en animais como en humanos. É necesario un mellor entendemento da diversidade xenética do parasito, as súas interaccións cos hospedadores e tratamentos máis eficaces. Débense facer esforzos para previr a transmisión zoonósica, especialmente en lugares como zoolóxicos, e mellorar os protocolos de manexo para a saúde humana e animal.

O control biolóxico defínese como un método ecolóxico creado polos humanos para reducir unha poboación de pragas ou parasitos a niveis subclínicos aceptables, ou para manter unha poboación nun nivel non daniño utilizando antagonistas naturais. Co uso destes antagonistas naturais fronte a especies non desexadas obtivéronse resultados moi positivos no

USC UNIVERSIDADE

control de certas pragas agrícolas. Nos últimos anos realizouse unha intensa investigación sobre métodos alternativos de control de parasitos. Estes inclúen o manexo de pastizais, o desenvolvemento de vacinas, a selección xenética de hospedadores definitivos con certa resistencia a formas parasitarias, e o control biolóxico ambiental. Este último enfoque é relevante no control de zoonoses causadas por helmintos transmitidos polo solo, xa que existen certas especies de fungos saprófitos no ambiente con capacidades nematófagas. Administráronse certos extractos naturais de plantas durante moito tempo como antiparasitarios para o gando, aínda que a base científica é incerta e a maioría dos compostos activos seguen sendo descoñecidos. Estes derivados de plantas pódense obter de leguminosas forraxeiras, árbores e arbustos recollidos en zonas temperadas e tropicais, algúns dos cales amosan outras actividades como propiedades antioxidantes ou antiinflamatorias. Entre as especies máis comúns están o trébol cornudo, o sainfoin común, o quebracho vermello do Chaco ou a mimosa dourada. Un enfoque interesante é sementar pastos con plantas leguminosas como jumbay, acacia negra ou neem. Demostrouse que as saponinas de especies de *Medicago* poden exercer diversos roles biolóxicos, como hemolíticos, antimicrobianos, insecticidas ou antihelmínticos fronte a algúns nematodos de plantas. Recoméndase o uso de diferentes herbas como allo, cabaza, tomillo ou artemisa fronte aos nematodos que infectan o gando en réximes ecolóxicos.

Unha alternativa que foi obxecto de estudo nos últimos anos é o uso de fungos nematófagos para combater formas parasitarias infecciosas presentes no medio. Este enfoque forma parte do que se coñece como control biolóxico. Os fungos son un grupo diverso de organismos con nutrición heterotrófica, o que significa que non teñen un sistema dixestivo interno. A maioría dos fungos son saprófitos, o que significa que se alimentan dos restos de materia orgánica no medio. Porén, no caso dos fungos nematófagos, tamén poden actuar como depredadores de formas parasitarias. Estas especies son parte do microbiota normal do solo, o que demostra a súa capacidade para sobrevivir en condicións ambientais adversas. O feito de que estes fungos se poidan illar directamente do solo e de diferentes hábitats, así como de feces, suxire que, en condicións naturais, son inxeridos e eliminados nas feces sen alteracións. Esta capacidade é esencial para lograr beneficios prácticos no seu uso como axentes de control biolóxico, xa que poden sobrevivir ao paso a través do tracto dixestivo, desenvolverse nas feces e manter intacta a súa capacidade depredadora. Para que estes organismos eucariotas sexan adecuados para o seu uso en control biolóxico, deben ter a capacidade de reproducirse a nivel industrial. Realizáronse poucas investigacións sobre a utilidade dos fungos depredadores fronte aos ovos de trematodos, cestodos ou ascáridos, centrando a maioría dos estudos en *Pochonia chlamydosporia*. Estudos recentes demostraron a capacidade de *Mucor circinelloides* para destruír os ovos de *Fasciola hepatica* e *Parascaris equorum* nas feces de animais infectados. Plantexouse a posibilidade de que a introdución de grandes cantidades destes fungos no ambiente poida desprazar a microflora e mesofauna do medio, o que podería causar un desequilibrio nos ecosistemas. Sobre este tema, demostrouse que *Duddingtonia flagrans* non afecta á poboación de fungos presentes no solo nin aos nematodos libres ou microartrópodos. Tamén se demostrou a ausencia de efectos adversos nos animais que consumen estes fungos. Na súa actividade, os fungos nematófagos combinan unha acción mecánica e química, a través

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

da intervención de diversos produtos como toxinas ou enzimas hidrolíticas. Existen diferentes mecanismos para desenvolver a actividade parasiticida dependendo da súa acción.

• Fungos depredadores de nematodos: estes tipos de fungos forman trampas, como aneis, extremos adherentes, redes e columnas de hifas adhesivas, que capturan larvas de nematodos cando a dispoñibilidade de nutrientes é limitada. Cando non hai larvas no ambiente, regresan a unha actividade saprófita.

• Fungos endoparásitos, usan esporas para infectar aos nematodos. Teñen unha nutrición saprófita limitada, o que significa que dependen en gran medida da presenza de nematodos para sobrevivir.

• Fungos ovicidas, caracterízanse por desenvolver estruturas especializadas para a penetración dos ovos, como o *haustorium* e o *appressorium*.

• Fungos produtores de toxinas, utilizan diferentes produtos para inmobilizar as larvas de nematodos antes de penetrar a cutícula coas súas hifas.

O **primeiro artigo** ten como obxectivo revisar a literatura existente sobre o control biolóxico de parasitos en parques zoolóxicos e destacar a súa importancia. Descríbense os parasitos que infectan comúmente os animais nestas localizacións, incluíndo ascáridos, estronxílidos, tricúridos e nematodos broncopulmonares. O estudo tamén examina os desafíos na xestión de parasitos en animais cautivos, que a miúdo permanecen confinados nas mesmas parcelas, o que conduce a altas concentracións de parasitos no medio. Ademais, resáltanse problemas como o uso frecuente de medicamentos antiparasitarios, as doses inadecuadas e os métodos incorrectos de administración, o que contribúe á aparición de cepas resistentes aos medicamentos, un problema semellante ao observado no gando. Para abordar estes desafíos, o estudo suxire un enfoque alternativo: o control biolóxico mediante fungos saprófitos que actúan como antagonistas naturais de diversos parasitos. A diferenza dos antihelmínticos químicos, este método ecolóxico non busca eliminar todos os parasitos, senón manter un equilibrio entre os animais hospedadores e os parasitos, evitando impactos negativos na saúde ou na produtividade. Estes fungos parasiticidas clasifícanse segundo a súa actividade. A revisión ofrece unha visión actualizada dos ensaios realizados con fungos parasiticidas en parques zoolóxicos e os seus resultados.

Baseándose nestes achados, propónse un programa integral de control de parasitos para animais salvaxes en catividade que integra a análise fecal previa á desparasitación, o uso de antihelmínticos adecuados (como benzimidazois ou lactonas macrocíclicas) e a administración periódica de clamidosporas de fungos saprófitos. Este enfoque preséntase como unha contribución innovadora e eficaz para a xestión sostible de infeccións parasitarias dixestivas en parques zoolóxicos. Ademais, esta estratexia ecolóxica podería estenderse máis aló dos zoolóxicos a espazos públicos con animais, ofrecendo unha solución segura e sostible para o medio.

Para respaldar o primeiro artigo e desenvolver unha nova formulación comestible que conteña unha concentración específica de fungos parasiticidas, *M. circinelloides* (ovicida) e *D. flagrans* (larvicida), para o control de helmintos en animais, realízase dous ensaios no **segundo artigo**. En primeiro lugar, fabricouse unha formulación a base de xelatina cunha mestura de 3-6×10^7 clamidosporas de cada fungo, e proporcionouse tres veces por semana durante oito

semanas a tres grupos de seis cachorros que eliminaban ovos de *T. canis*. Un ensaio semellante realizouse nun grupo de seis babuínos en catividade, pero algúns negáronse a inxerir as xelatinas, mentres que outros as consumiron con dificultade. O segundo ensaio consistiu en secar a formulación a base de xelatina e administrala tres veces por semana durante oito semanas a outros dous grupos de seis cachorros infectados con *T. canis* (diferentes dos do primeiro ensaio) e a seis babuínos cautivos nun zoolóxico que eliminaban ovos de *Trichuris* sp. Este ensaio en babuínos realízase por triplicado a intervalos de catro meses. As feces recollidas despois de oito semanas examínanse durante catro semanas. A viabilidade dos ovos de *T. canis* redúcese significativamente á metade con ambas formulacións comestibles, e o 44% dos ovos alcanzan a fase infectante. Nas feces dos babuínos que consumiron a formulación deshidratada, o 50% dos ovos de *Trichuris* sp. permanecen viables e o 14% vólvense infectantes. A contaminación do solo por estes nematodos redúcese ao 20% e ao 5%, respectivamente.

Concluíuse que a formulación a base de xelatina que contiña clamidosporas de *M. circinelloides* e de *D. flagrans* resultaba altamente eficaz e práctica para o control biolóxico de helmintos que afectan a mascotas. Ademais de manter unha alta actividade antihelmíntica, a deshidratación proporciona unha formulación comestible segura, fácil de almacenar e simple de administrar tanto a animais de compañía como a especies silvestres en catividade. Recoméndase encarecidamente o seu uso para reducir o risco de infección por helmintos transmitidos polo solo.

Finalmente, no **terceiro artigo**, para fortalecer a importancia dos fungos parasiticidas no control biolóxico especificamente e a integración do control parasitario en animais en xeral, e para respaldar o artigo anterior sobre a utilidade da formulación deshidratada, realizouse outro experimento. Empregouse a formulación deshidratada que contiña $\geq 10^6$ clamidosporas de *M. circinelloides* e *D. flagrans* en bisontes cautivos mantidos na mesma parcela no Parque Zoolóxico "Marcelle Natureza" para controlar *Trichuris* sp. Dado que os tratamentos antihelmínticos non afectan a supervivencia e/ou o desenvolvemento dos parasitos no solo ata que alcanzan a fase infectante, o risco de infección debe considerarse alto ou incluso crecente. Nesa investigación, a viabilidade dos ovos diminuíu a menos da metade, e o risco de contaminación do solo por *Trichuris* sp. reduciuse cinco veces nas feces que contiñan fungos parasiticidas. Os efectos ovistáticos e ovicidas determínanse ao longo do estudo. Nas mostras fecais, a viabilidade dos ovos de *Trichuris* diminúe do 9% (na primeira semana) ao 57% (na cuarta semana). O desenvolvemento dos ovos retrasouse durante as dúas primeiras semanas, e o porcentaxe de ovos infectantes viables foi significativamente menor que nas feces do grupo control.

Os resultados obtidos tras a administración de clamidosporas de *M. circinelloides* e *D. flagrans* a bisontes poderían extrapolarse directamente a ruminantes domésticos mantidos en pastoreo continuo, onde se espera que o risco de infección diminúa significativamente.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2. INTRODUCCIÓN

2.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE LAS COLECCIONES DE ANIMALES

A pesar de que muchas especies animales mostraban potencial para la domesticación, solo algunas cumplían con los requisitos necesarios, como una alimentación sencilla, docilidad y la capacidad de reproducirse en cautividad (Norton, 1997). En consecuencia, algunas especies fueron capturadas y mantenidas en condiciones de cautiverio como colecciones de animales, sin la intención de domesticarlas. En algunos casos, los motivos detrás de esto eran mostrar poder, riqueza, estatus o destreza militar. Las primeras instancias documentadas de animales en cautiverio se atribuyen a egipcios, chinos y griegos entre los años 2000 y 500 a.C. Describieron animales enjaulados como leones, aves y jirafas para el entretenimiento de la población. A menudo, se preferían animales depredadores debido a su apariencia más imponente (Benbow, 2004). En consecuencia, los reyes hititas exhibían leones, tigres, lobos, leopardos u osos, la reina egipcia Hatshepsut mostraba rinocerontes, jirafas o galgos, y el emperador Wu Di exhibía elefantes, yaks, pandas gigantes, cormoranes y garzas, todo con el objetivo de resaltar su capacidad para conquistar enemigos, geografía y entorno (Peart, 1993). Posteriormente, surgieron colecciones de animales salvajes en ciudades romanas con fines de exhibición, simbolizando poder y riqueza (Fig. 1-2).



Fig. 2 Modelo de piedra de león de hace 2.500 años en Egipto.

Fuente: The Walters Art Museum



Fig. 1 Mosaico de Lod (año 300 d.C.)

Fuente: Carole Raddato

En la Edad Media, la pasión de las clases sociales más altas por los animales cautivos impulsó un comercio global, especialmente en lo que respecta a especies salvajes. Como ejemplo, resultaba muy extraño y poco frecuente que los reyes no tuvieran un elefante o una cebra. Como consecuencia, los comerciantes capturaban, enviaban y vendían legiones de

animales destinados a colecciones reales y/o pertenecientes a personas adineradas. Además, algunos espectáculos públicos como ferias itinerantes llevaban animales exóticos (elefantes, rinocerontes, jirafas e hipopótamos) de pueblo en pueblo (Fig. 3).



Fig. 3 Colección de fieras real, Exeter Change, Strand, Londres, 1820

Fuente: London Museum

El descubrimiento de América por parte de los españoles fue una contribución importante al conocimiento de nuevas especies de animales exóticos. Entre 1493 y 1496, Cristóbal Colón regaló sesenta loros y un guacamayo a los Reyes Católicos, la Reina Isabel y el Rey Fernando, sentando así un precedente que significó un impulso en el alcance e importancia simbólica de los animales salvajes, que se convirtieron en juguetes de los imperios europeos. De esta manera, Hernán Cortés y sus tropas pudieron observar la existencia de una gran variedad de especies animales (leones, tigres, osos, halcones, jaguares, serpientes o águilas) en enormes jaulas bajo la propiedad de Moctezuma en Tenochtitlán, la ciudad flotante que dio origen a lo que hoy conocemos como la Ciudad de México (Croke, 1997). Además, se ha informado de la participación de especialistas que cuidaban de individuos enfermos o heridos.

Durante los siglos XV y XVI, iguanas, bisontes, cobayas, llamas, pavos, patos moscovitas, ardillas y muchas especies de aves se volvieron muy frecuentes en Europa. Un rinoceronte fue regalado amigablemente por el sultán Muzaffar Shah de Malaca en 1515 al gobernador de la India portuguesa, quien lo envió a Don Manuel I, rey de Portugal. A finales del siglo XVIII y principios del XIX, las prósperas colecciones de animales exóticos pasaron de ser privadas a públicas debido a la transformación de los reinos en estados-nación, lo que implicó un cambio en la financiación de privada a pública (Kohl, 2004). Después de la Revolución Francesa, en 1793, el Jardin Royal des Plantes (anteriormente la colección del rey Luis XIII) fue transferido de propiedad real a pública. Más tarde, en unas pocas décadas, zoológicos en Madrid, Londres, Dublín, Amberes, Melbourne y Filadelfia abrieron sus puertas y se extendieron por todo el mundo a fines del siglo XIX. Este proceso se aceleró gracias a la aparición de una clase media en Europa y América, impulsada en ese momento por un

crecimiento poblacional significativo, la revolución industrial y el nivel de urbanización. Se dieron nuevos nombres a las colecciones de animales, como jardines zoológicos, parques zoológicos y coloquialmente zoológicos (Fig. 4).



Fig. 4 Zoo de Londres (1897).

Fuente: The National Archives, 1897

En la actualidad, los animales salvajes en cautiverio se mantienen principalmente en instalaciones como zoológicos, acuarios, parques marinos y temáticos. Los centros de rehabilitación, santuarios y hogares privados, donde se mantienen como animales de compañía, son menos comunes, y la importancia y cantidad de circos y espectáculos itinerantes, así como de laboratorios de investigación científica, han disminuido en muchos países debido a la conciencia pública (Hoage *et al*., 1996). Como se mencionó anteriormente, la transformación o evolución de las colecciones en zoológicos modernos ha sido difícil y tortuosa, y como resultado, estos lugares han crecido en tamaño, albergando un mayor número de especies, y se han establecido mercados internacionales (Kisling, 2000). A pesar de la incorporación de más personal, principalmente administrativo, profesional, trabajadores, veterinarios y cuidadores de zoológicos, los resultados finales no siempre han sido los esperados, con cambios aún por venir (Fa *et al*., 2011). En la actualidad, es común diseñar y organizar eventos y cursos educativos, esfuerzos importantes para que las personas disfruten con sus familias. Los zoológicos de hoy en día también suelen contar con restaurantes, tiendas de recuerdos y áreas recreativas enfocadas en los niños, donde se aplican medidas de actualización tecnológica (Packer y Ballantyne, 2010). Los zoológicos modernos deben satisfacer diferentes áreas que involucran la investigación científica, la conservación de la vida silvestre, la recreación pública y la educación. Además, cabe destacar que los zoológicos han evolucionado en las últimas décadas para convertirse en mucho más que simples lugares para pasar una tarde divertida (Fig. 5). De esta manera, los parques zoológicos pueden actuar como espacios con el propósito de enriquecer a las personas, áreas para disfrutar y entretenerse, brindándoles educación científica, libres de ruido y contaminación (Roe *et al*., 2014).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

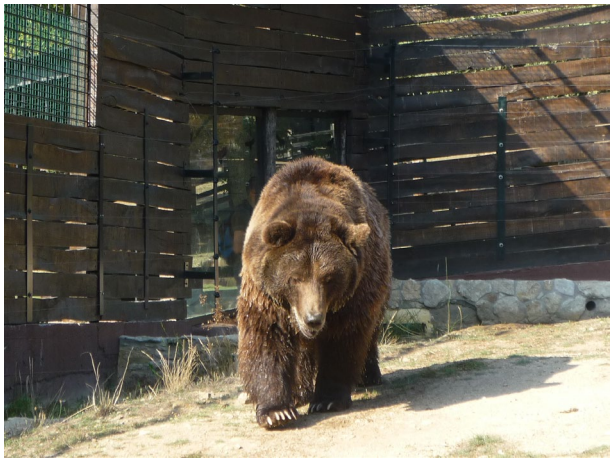


Fig. 5 Instalaciones Parque Zoológico "Marcelle Natureza".

El papel de los zoológicos comprende no solo la exhibición de animales para el disfrute de los visitantes, sino también la posibilidad de educar en la promoción de la conservación de especies en peligro de extinción como contribución a la preservación de la diversidad biológica (Schaaf, 1994). Con el objetivo de participar en estas estrategias, muchos zoológicos se involucran en mantener ciertas especies de animales salvajes en hábitats centrados en comportamientos naturales, con la posibilidad de interactuar con el entorno, pastar y socializar (Okello *et al*., 2002). En consecuencia, los herbívoros en cautividad se mantienen en áreas con pasto disponible casi durante todo el año, según las condiciones climáticas. Para disfrutar de espacios abiertos similares a sus hábitats originales, los rumiantes salvajes en cautividad en parques zoológicos tienden a ser mantenidos en prados verdes, lo que contribuye al bienestar adecuado y la alimentación. Debido a que los animales siempre se mantienen en los mismos recintos, se proporciona suplementación con heno cuando escasea el pasto, y con frecuencia se les da concentrado con el mismo propósito (Palomero *et al*., 2018).

2.1.1. Especies animales mantenidas en cautividad en zoológicos

Inicialmente, las colecciones de animales estaban dedicadas a especies exóticas o aquellas provenientes de otros continentes. En paralelo a la evolución histórica de los zoológicos, los objetivos cambiaron desde ser lugares de entretenimiento hasta instituciones centradas principalmente en la conservación y la educación (Patrick *et al*., 2007; Carr y Cohen, 2011), lo que parece más aceptable social y moralmente para la opinión pública. Desde la década de 1970 y 1980, los zoológicos orientaron sus actividades hacia la conservación de especies en peligro de extinción y de la vida silvestre, y muchos de ellos se convirtieron en refugios donde se mantienen tanto especies amenazadas como no amenazadas. Es importante destacar que la rica diversidad del reino animal no se refleja únicamente en colecciones de ***megafauna carismática*** (leones, tigres, jirafas, elefantes, cebras, osos, hipopótamos y rinocerontes). A lo largo del siglo XX, se incrementó significativamente la cría de animales *in situ*, lo que facilitó el intercambio de algunas especies entre parques zoológicos, enriqueciendo sus propias colecciones (Conway, 2011). Aunque la gran mayoría de estos animales no serían (ni podrían ser) introducidos o reintroducidos en sus hábitats naturales, este enfoque resultó en

USC DE COMPOSTELA

poblaciones zoológicas de individuos criados en cautiverio en lugar de ser capturados. Esta actividad protectora fue respaldada por el lema "Cautividad para la conservación" como una clara definición para los zoológicos modernos (Keulartz *et al*., 2015).

Es importante recordar la contribución de Carl Hagenbeck en la década de 1890, un empresario alemán de animales que marcó un nuevo escenario en el establecimiento de zoológicos al introducir animales de diferentes especies en el mismo recinto, que previamente había sido acondicionado con plantas, tierra y rocas artificiales para simular su hábitat natural (Rothfels, 2002). Esta denominada revolución se convirtió en el primer intento de construir áreas más cercanas al entorno salvaje para que los visitantes pudieran disfrutar imaginando a los animales en su mundo natural. En consecuencia, el tamaño de los recintos zoológicos aumentó notablemente, aunque siguieron siendo artificiales. A pesar de estas buenas intenciones, no siempre es posible reproducir entornos para diferentes especies animales, ya que los requisitos pueden ser muy diversos. Así, el hábitat de un avestruz no guarda relación con el de una cabra de montaña o una jirafa.

A lo largo del último cuarto del siglo XX, se difundió el concepto de recintos de inmersión paisajística entre los parques zoológicos. Esta idea se ha definido como la provisión de estímulos que promueven la expresión de actividades comportamentales y mentales apropiadas para la especie en un entorno poco estimulante (Reinhardt y Reinhardt, 1998), lo cual conecta con las pautas propuestas por Chamove y Moodie (1990) sobre los principales objetivos del enriquecimiento: (1) Aumentar la diversidad comportamental; (2) Reducir las frecuencias de comportamientos anormales; (3) Aumentar el rango de patrones de comportamiento normales (es decir, salvajes); (4) Aumentar la utilización positiva del entorno; (5) Aumentar la capacidad para enfrentar desafíos de una manera más normal. Hoy *et al.* (2010) han descrito ocho tipos de enriquecimiento.

Como se explicó anteriormente, ciertas especies de animales salvajes fueron alojadas en zoológicos para el entretenimiento y disfrute de las personas. En la actualidad, los parques zoológicos están enfocados principalmente en la educación y la conservación, considerando que algunas especies salvajes están en riesgo de extinción (Rabb, 2004). En las últimas décadas, se han desarrollado diferentes programas con el objetivo de reintroducir herbívoros en algunos zoológicos (Gilbert *et al*., 2017; Gonzálvez *et al*., 2021). Basándose en el papel renovado de estas instituciones, algunos de los cambios más importantes se han centrado en mejorar el entorno para los animales salvajes mantenidos en zoológicos, enfocándose en el comportamiento natural, el cuidado veterinario y la nutrición adecuada (Fig. 6). Entre los cambios y los intentos de mejorar el entorno para los herbívoros, la presencia de cercados con pasto donde estas especies animales pueden pastar e incluso socializar es destacable. Esto parece ser una contribución significativa a su bienestar, aunque la presencia de pasto depende principalmente de la ubicación o un clima más propicio. Se sabe que los herbívoros dedican la mayor parte de su tiempo al pastoreo, y se pueden detectar diferencias en función de la estructura social, la estrategia nutricional y la actividad gastrointestinal (Okello *et al*., 2002), que varían desde el 45% en caballos de Przewalski hasta el 61% en cabras y ovejas (Pokorná y

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

Hejcmanová, 2013). En cualquier caso, es importante tener en cuenta que los herbívoros pastan durante la mitad del día o incluso más.

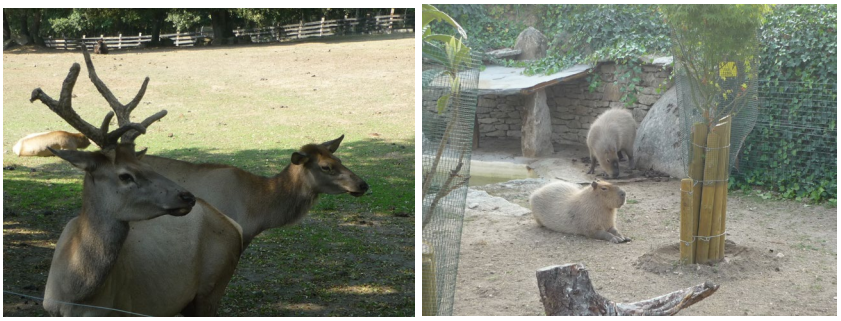


Fig. 6 Animales mantenidos en recintos vallados (Parque Zoológico "*Marcelle Natureza*", Outeiro de Rei, Lugo, España)

2.1.2. Zoonosis presentes en zoológicos

Muchas especies animales diferentes suelen vivir en un área pequeña y en proximidad con cuidadores, visitantes y otros animales silvestres. En algunas situaciones, la presión infecciosa podría superar la defensa inmunitaria de los animales del zoológico y los patógenos podrían propagarse entre diversas especies animales. *Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum* son parásitos protozoarios con la capacidad de causar enfermedades en un amplio espectro de animales (Bártová *et al*., 2018). Muchas especies que viven en cautividad (monos del Nuevo Mundo, lémures, gatos de Pallas, marsupiales, etc.) han muerto de toxoplasmosis clínica. También existe un riesgo potencial de exposición de niños y ancianos a los ooquistes de *T. gondii* excretados por los felinos en los zoológicos (Camps *et al*., 2008; Pas *et al*., 2008). A diferencia de *T. gondii*, *N. caninum* no se considera zoonósico, aunque hay evidencia serológica de exposición humana, principalmente en personas inmunocomprometidas (Lobato *et al*., 2006; Barratt *et al*., 2010). *N. caninum* ha sido estudiado en años recientes en cuanto a su importancia veterinaria, especialmente en cánidos, y las pérdidas económicas en el ganado debido a problemas reproductivos (Reichel *et al*., 2013; Donahoe *et al*., 2015). También se detectaron problemas reproductivos asociados con la infección por *N. caninum* en rinocerontes blancos del sur (*Ceratotherium simum simum*) en un zoológico australiano (Sangster *et al*., 2010). *Encephalitozoon cuniculi* pertenece al grupo de microsporidios y es una de las tres especies patógenas del género *Encephalitozoon*. La diferenciación de la microsporidiosis de otras enfermedades en animales cautivos es difícil debido a signos clínicos no específicos. Esta enfermedad podría permanecer sin reconocerse o diagnosticarse incorrectamente. En animales exóticos, *E. cuniculi* generalmente no causa signos; sin embargo, se han registrado algunos casos mortales (Guscetti *et al*., 2003; Asakura *et al*., 2006; Juan-Sallés *et al*., 2006; Davis *et al*., 2008; Kitz *et al*., 2018). *Chlamydia abortus* y *Coxiella burnetii* son bacterias intracelulares obligadas. *Ch. abortus* es un patógeno zoonósico y causa fallos reproductivos, especialmente en ovejas, cabras y ganado vacuno. Este agente también fue detectado en rumiantes silvestres y animales de zoológico como causa de abortos (Berri *et al*., 2004; Salinas *et al*., 2009). *Co. burnetii* es el agente zoonósico de la fiebre Q que causa enfermedades en humanos y ganado. Animales domésticos y silvestres, aves, anfibios y artrópodos actúan como reservorios de

infección (Cutler *et al*., 2007). Aunque la infección en el ganado es principalmente asintomática, puede provocar abortos, trastornos reproductivos, crías débiles o infertilidad (Agerholm, 2013). Esta enfermedad también se diagnosticó como causa de aborto en animales de zoológico y se aisló de ungulados de zoológico y vida silvestre en Eslovaquia, España y Portugal (Clemente *et al*., 2008; Ruiz-Fons *et al*., 2008; Dorko *et al*., 2009; Lloyd *et al*., 2010).

Las zoonosis en los seres humanos varían, de enfermedades autolimitadas hasta enfermedades que pueden incapacitar a la persona durante varios días incluso después de la curación. Enfermedades virales emergentes como el virus del Ébola son altamente contagiosas y mortales. Factores como el hacinamiento, la contención inadecuada, el cambio en los hábitos alimenticios y el transporte de animales salvajes a un nuevo entorno inducen estrés en los animales. La negligencia de veterinarios y personal de zoológicos hacia el uso de equipo de protección personal durante el diagnóstico, tratamiento, necropsia y la higiene de manos inadecuada aumentaron la propagación de zoonosis (Murphy, 2008). Los métodos inadecuados para la eliminación de cadáveres de animales salvajes, órganos, heces, orina y alimentos no utilizados, sirven como fuentes de patógenos. La falta de buenas prácticas de laboratorio y procedimientos operativos estándar durante el manejo de muestras clínicas también contribuye a la propagación de zoonosis (Murphy, 1998). Además, el personal del zoológico debe ser educado sobre las zoonosis y las medidas preventivas para minimizar riesgos, como el uso de guantes, limpieza de zapatos al entrar/salir de los recintos, lavado frecuente de manos y eliminación adecuada de heces, deben implementarse o reforzarse. Además, los cadáveres y la carne deben ser congelados antes de alimentar para prevenir infecciones, como por ejemplo en el lobo, por cestodos o con el trematodo *Alaria alata* con el fin de proteger la salud tanto de los lobos como de los humanos (Bindke, 2017).

2.1.3. Parásitos que afectan a animales salvajes mantenidos en cautiverio en zoológicos

El término helminto se refiere de manera general a los vermes parásitos y abarca varios filos, entre ellos los Platelmintos, Nematelmintos y Acantocéfalos (Fig. 7). Estos parásitos tienen una distribución mundial, y la infección por ellos está determinada por múltiples factores, principalmente de naturaleza ambiental (Baron y Wakelin, 1996).

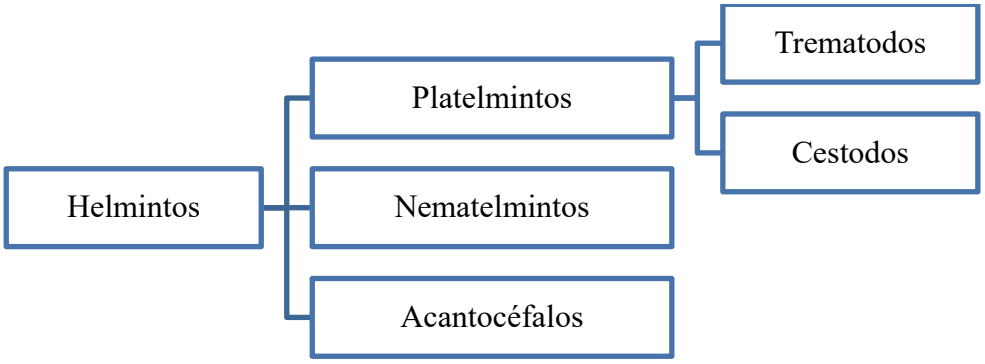


Fig. 7 Clasificación taxonómica general de los helmintos

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Los animales salvajes en cautiverio parecen ser altamente susceptibles a la infección por parásitos gastrointestinales transmitidos por vía oro-fecal, por lo tanto, los zoológicos se caracterizan como ambientes ricos en parásitos (Mir *et al*., 2016; Capasso *et al*., 2019). Aunque por razones estéticas, los excrementos se eliminan periódicamente de las parcelas de los parques zoológicos antes de que los visitantes ingresen. Los animales en parques zoológicos criados en entornos restringidos suelen estar confinados en la misma área, lo que aumenta las concentraciones elevadas de parásitos en el suelo (Citino, 2003). Este problema empeora debido al estrés, las condiciones de vida y/o las limitaciones de espacio, aumentando la susceptibilidad de los animales a algunas infecciones parasitarias (Gracenea *et al*., 2002). Estos animales son especialmente vulnerables a las infecciones parasitarias cuando se encuentran en terrenos previamente ocupados por animales domésticos (Cunningham, 1996; Wemmer *et al*., 1996). Además, el pastoreo aumenta el riesgo de infección por ingerir ooquistes, huevos o larvas presentes en el pasto (Romaniuk *et al*., 2004; Meana *et al*., 2005), así como por consumir forraje contaminado proveniente de áreas donde hay animales domésticos parasitados. Es crucial considerar también la posibilidad de que se produzca un flujo de enfermedades tanto hacia adentro como hacia afuera del parque, incluso entre los propios animales. Es importante tener en cuenta los aspectos zoonósicos, es decir, aquellos que pueden transmitirse entre animales y personas, como visitantes o cuidadores (Pérez Cordón *et al*., 2008). Los helmintos representan los parásitos más frecuentemente encontrados en los animales que habitan en los zoológicos de Europa (Gonzálvez *et al*., 2021). Según la frecuencia en su detección, los nematodos son los más ampliamente distribuidos, seguidos por los cestodos y trematodos (Panayotova-Pencheva *et al*., 2013).

Para que los rumiantes salvajes en cautiverio en parques zoológicos puedan disfrutar de espacios abiertos similares a sus hábitats originales, tienden a ser mantenidos en prados verdes, lo que contribuye al bienestar adecuado y a una alimentación nutritiva. Debido a que los animales siempre se mantienen en los mismos recintos, se proporciona suplementación con heno cuando escasea el pasto, y se suministra concentrado con frecuencia con el mismo propósito (Palomero *et al*., 2018). Este régimen puede convertirse en un riesgo de infección por ciertos parásitos, como los nematodos gastrointestinales, debido a que las fases de vida libre desarrolladas a partir de huevos eliminados en las heces de individuos infectados pueden sobrevivir en áreas con hierba y humedad (Santos *et al*., 2012). Se han detectado infecciones causadas por helmintos gastrointestinales pertenecientes al orden Strongylida entre antílopes, gacelas y jiráfidos mantenidos en dos zoológicos en Bélgica (Goossens *et al*., 2005), así como entre jirafas y camellos de zoológicos en Polonia (Maesano *et al*., 2014; Nosal *et al*., 2016) o bisontes, antílopes y ciervos en Italia (Fagiolini *et al*., 2010).

En estudios realizados en animales silvestres en cautiverio en el Parque Zoológico "Marcelle Natureza" en Outeiro de Rei (Lugo, España) Arias *et al*. (2011) observaron una alta prevalencia de infección por nematodos gastrointestinales, los cuales causan diarreas significativas. Resultados similares se encontraron en el zoológico "Peña Escrita" (Granada, España) (Pérez Cordón *et al*., 2008). En dos zoológicos italianos ubicados en Fasano y Pistoia,

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

se observó que el 61% de los animales eliminaron huevos de parásitos gastrointestinales (Fagiolini *et al*., 2010). Es poco común encontrar cargas parasitarias elevadas en animales en su hábitat natural, a diferencia de lo que ocurre cuando están en cautiverio o semicautiverio (Rivera, 1999).

Debido a que muchas infecciones parasitarias son subclínicas, la detección ocurre demasiado tarde y ya se ha causado un daño importante, lo que puede llevar a la muerte de los animales (Maesano *et al*., 2014). Investigaciones previas sugieren que los parásitos que necesitan para el desarrollo de su ciclo exógeno uno o más hospedadores intermediarios como **trematodos** o **cestodos**, son más difíciles de encontrar en zoológicos (Atanaskova *et al*., 2011), ya que los individuos se mantienen en parcelas cercadas con poco acceso a esos hospedadores intermediarios (Atanaskova, 2011; Mirzapour *et al*., 2018; Dashe y Berhanu, 2020).

Por lo tanto, aquellos con un ciclo biológico directo son altamente prevalentes en cautividad, especialmente parásitos capaces de sobrevivir durante largos períodos en el medio ambiente como **estrongilos** o **ascáridos** (Overgaauw y Knapen 2013; Sengar *et al*., 2017). Los signos clínicos atribuibles a parásitos rara vez se observan en animales en cautividad, lo que podría indicar que las infecciones subclínicas se desarrollan en la mayoría de los casos (Mir *et al*., 2016). Sin embargo, los helmintos pueden causar infecciones fatales si falla el programa de control antiparasitario (Garijo *et al*., 2004; Beyazit y Selver, 2011).

Se han propuesto diversas formas de explicar la presencia de parásitos en zoológicos. Además de la ingestión de alimentos contaminados (carne, pescado, frutas, verduras, etc.), en el caso de los herbívoros parece más realista y fácil la participación de hospedadores intermediarios y paraténicos (caracoles, hormigas, cucarachas, otros insectos, gusanos, roedores, etc.), o incluso a través de animales recientemente adquiridos que estén parasitados. También se debe tener en cuenta la posibilidad de que se coloquen animales salvajes en cautiverio en áreas previamente pastoreadas por especies animales domésticas o silvestres, ya que esto podría aumentar fácilmente la presencia de ciertas especies de parásitos y, por lo tanto, el riesgo de infección (Perec *et al*., 2008).

2.1.4. Parásitos identificados en herbívoros mantenidos en zoológicos

Existe poca información sobre los parásitos que infectan a los animales en cautividad en parques zoológicos. Se han detectado huevos de nematodos gastrointestinales, como *Nematodirus, Capillaria* y *Trichuris*, en las heces de rumiantes en cautiverio (antílopes, gacelas y jiráfidos) en dos zoológicos en Bélgica (Goossens *et al*., 2005). En los herbívoros del zoológico "Peña Escrita" (Almuñécar, España), con una extensión estimada de 600 ha, Pérez Cordón *et al*. (2008) informaron que las prevalencias más altas se alcanzaron en protozoos (principalmente *Entamoeba* spp., *Endolimax nana* y *Eimeria* spp.), seguidos por *Nematodirus* spp. Este zoológico está dividido en diferentes áreas por cercas de alambre, y los animales viven en entornos naturales con zonas abiertas, comederos, abrevaderos y áreas de escondite o cuevas. Parsani *et al*. (2001) llevaron a cabo un estudio en un zoológico municipal en Gujarat (India) y encontraron que el nilgó y el ciervo moteado estaban infectados con *Trichostrongylus* y

Balantidium coli. En dos zoológicos italianos ubicados en Apulia y Toscana, las infecciones por helmintos fueron más comunes que las infecciones protozoarias en todos los mamíferos examinados (Fagiolini *et al*., 2010). Los parásitos más frecuentes encontrados en las heces de herbívoros salvajes en un zoológico en Punjab fueron los estrongílidos, seguidos de *Trichuris, Eimeria* y anfistómidos (Singh *et al*., 2006). Arias *et al.*, (2013) realizó un estudio coprológico entre los animales en cautiverio en el Parque zoológico Marcelle Natureza (Outeiro de Rei, Lugo, España) y detectó protozoos y helmintos (Tabla1). En los herbívoros de un zoológico en Varsovia, Maesano *et al*. (2014) aplicaron la técnica FLOTAC para el análisis de muestras de heces de rumiantes y herbívoros monogástricos. Observaron que los estróngilos (60,5%) eran prevalentes en rumiantes que también eliminaban ooquistes de coccidios (*Eimeria* spp.), *Trichuris* spp. y *Nematodirus*. Además, los estróngilos fueron los parásitos más frecuentes en herbívoros monogástricos, seguidos por *Parascaris equorum*. Ninguno de los animales mostró síntomas asociados con infecciones parasitarias gastrointestinales.

Familias	Protozoos	Cestodos	NGI
Canidae		*Taenia*	
Ursidae	*Eimeria*		*Trichostrongylus*
Felidae	*Eimeria*		*Toxocara cati* *Toxascaris leonina*
Equidae			*Cyathostomum* *Strongylus* *Gyalocephalus* *Trichostrongylus* *Poteriostomum*
Bovidae	*Eimeria*		*Trichostrongylus* *Nematodirus* *Haemonchus* *Chabertia*
Camelidae	*Eimeria*		*Trichostrongylus* *Trichuris*
Cervidae	*Eimeria*		*Trichostrongylus* *Nematodirus*
Cercopithecidae			*Strongylus* *Ascaris lumbricoides Trichuris trichiura*

Tabla 1 Parásitos detectados en animales salvajes en cautividad en el Parque Zoológico Marcelle Natureza (Lugo, España)

El examen anatomopatológico del tracto digestivo de una jirafa del Cabo (*Giraffa camelopardalis giraffa*) en el Zoológico de Aitana (Alicante, España) mostró un total de 2.724 nematodos, identificados como *Trichostrongylus axei, Ostertagia ostertagi, Teladorsagia circumcincta, Teladorsagia trifurcata, Marshallagia marshalli, Trichostrongylus vitrinus, Trichostrongylus colubriformis, Spiculopteragia asymmetrica,* especies también observadas en

muflones, gamos y ciervos rojos (Garijo *et al*., 2004). Además de esto, también se identificaron *Camelostrongylus mentulatus* y *Trichuris giraffae*.

Atanaskova *et al*. (2011) llevaron a cabo un estudio de los endoparásitos que afectan a los animales salvajes: muntjac (*Muntiacus muntjak*), ciervos, llamas, ponis, elands, camellos y yaks en un zoológico en Skopje (Macedonia), mediante análisis de heces utilizando el método de flotación con ZnSO4, e identificaron huevos de *Strongyloides, Nematodirus, Trichostrongylus* y *Trichuris*. En un estudio realizado en un mini zoológico en Punjab (India) (Mir *et al*., 2016) se analizaron muestras de heces de nilgai (*Boselaphus tragocamelus*), ciervos moteados (*Axis axis*), antílopes negros (*Antelope cervicapra*), ciervos sambar (*Cervus unicolor*), ciervos porcinos (*Axis porcinus*) y muntjacs mediante la técnica de flotación se detectaron estrongilos (67%), *Strongyloides* spp., coccidios, *Trichuris* spp., áscaris y *Capillaria* spp., mientras que no se apreciaron cestodos ni tampoco trematodos utilizando la técnica de sedimentación. Nosal *et al*. (2016) informaron de la presencia de huevos de nematodos de la familia Trichuridae (*Trichuris* sp., *Aonchotheca* (*Capillaria*) sp.) y algunos huevos no especificados de la familia Strongylidae en jirafas de dos zoológicos de Polonia (el Jardín Zoológico de Silesia en Chorzów y el Zoológico de Cracovia). Los camellos estaban infectados por el protozoo *Eimeria bactriani* y *E. dromedarii* y por los nematodos *Trichostrongylus* y *Cooperia.* Se identificaron huevos de estrongilos y *Trichuris* en las heces de herbívoros en cautiverio en un zoológico ubicado en Dehiwali (Sri Lanka) (Aviruppola *et al*., 2016). En un parque zoológico de Madhya Pradesh (India), el examen de un total de 374 muestras de heces de herbívoros salvajes (chital: *Axis axis*, sambar, nilgai y chinkara: *Gazella bennettii*) mostró que la mayoría tenía infección mixta por *Eimeria* spp., *Trichuris* spp., *Moniezia* spp., anfistómidos, *Strongyloides* spp., *Balantidium* spp. y *Fasciola* spp. (Sengar *et al*., 2017). Sprenger *et al*. (2018) apreciaron que los herbívoros salvajes (alpacas, dromedarios, camellos y llamas) en cautiverio en un zoológico del estado de Paraná (Brasil) eliminaron huevos de la familia Strongyloidea en sus heces y *Trichuris*. Una encuesta realizada en cuatro parques zoológicos del sur y centro de Italia mostró que el 80% de las muestras de heces analizadas por FLOTAC fueron positivas para la presencia de parásitos (Capasso *et al*., 2019). Los parásitos identificados fueron los protozoos *Blastocystis* spp., *Giardia* spp. y *Eimeria* spp. Los estrongílidos fueron los más frecuentes entre los nematodos gastrointestinales, seguidos por *Trichuris* spp., *Parascaris* spp. y *Capillaria* spp. El análisis de endoparásitos que afectan a la vida silvestre en cautiverio en Bangladesh mostró la presencia de huevos de nematodos gastrointestinales en un 40% de los burros (Nath *et al*., 2021).

2.1.5. Control de la fase endógena

La investigación sobre parasitosis en animales salvajes en cautiverio es escasa, lo que subraya la importancia de llevar a cabo estudios actualizados para establecer programas de control, tratamiento y prevención en los parques zoológicos, El control de parásitos se centra en la administración de antiparasitarios químicos al menos dos o tres veces al año. (Tabla 2-3). El control de la fase endógena implica el uso de moléculas antihelmínticas para eliminar las formas parasitarias en el hospedador definitivo. Estas moléculas son eficaces contra las formas parasitarias localizadas en la luz del intestino o en su superficie, pero no contra las larvas

USC DE COMPOSTELA

enquistadas en los tejidos, que pueden sobrevivir durante meses o incluso años. Estas larvas pueden reactivarse, madurar sexualmente y comenzar a eliminar huevos, e incluso desarrollar enfermedades sin necesidad de reinfección. Al considerar este tipo de tratamientos, es importante adaptarlos a las condiciones individuales de cada animal, teniendo en cuenta sus características propias y las del entorno en el que viven. Factores como la edad, el estado de salud o reproductivo, y la historia clínica del animal (incluyendo los viajes realizados a zonas endémicas para ciertos parásitos) influyen en el tratamiento.

BABUINOS	- 50 mg/kg fenbendazol 5 días (Panacur® 500). - 100 mg/animal mebendazol dos veces al día, 3 días (Lomper® 100 mg).
CARNÍVOROS	- 100 mg/kg fenbendazol dosis única (Panacur® 500) → linces - 1 comprimido Simparica Trio® mensual (1,2-2,4 mg/kg sarolaner, 0,024-0,048 mg/kg moxidectina, 5-10 mg/kg pirantel) → lobos - 50 mg/kg fenbendazol 3 días (Panacur® 500) → zorros - 50 mg/kg fenbendazol dosis única (Panacur® 500) → mangostas - 0,2 mg/kg ivermectina *pour-on* (Animec® 5 mg/mL) → visón - 0,1 mL Stronghold Plus® 15 mg/2,5 mg → visón - ¼ comprimido Drontal® gatos → visón
RUMIANTES	- 7,5 mg/kg fenbendazol (Panacur® 100 mg/mL): dosis única, 3 o 5 días; en función de resultados y parásitos presentes. - 10 mg/kg fenbendazol (Panacur® 100 mg/mL): dosis única, 3 o 5 días; en función de resultados y parásitos presentes. - 7,5 mg/kg albendazol (Ganadexil® 100 mg/mL): dosis única, 3 o 5 días; en función de resultados y parásitos presentes. - 10 mg/kg albendazol (Ganadexil® 100 mg/mL): dosis única, 3 o 5 días; en función de resultados y parásitos presentes. - 1 mL/50 kg ivermectina oral dosis única. - 1 mL/10 kg ivermectina *pour-on.* - Equimax® (jeringa regulada por peso, se administra la misma dosis que en équidos).

Tabla 2 Fármacos y dosis empleados para la desparasitación de babuinos, carnívoros y rumiantes en el Parque Zoológico "*Marcelle Natureza*" (junio 2024)

		Subfamilia						
		Antilopinae		**Caprinae**		**Bovinae**		**Reduncinae**
		A. cervicapra (n = 2)	*G. cuvieri* (n = 4)	*C.aegrus hircus* (n = 5)	*O. orientalis musimon* (n = 15)	*B. bison* (n = 6)	*T. spekii* (n = 4)	*K. kob* (n = 5)
D	**Fecha**	1925 m^2	920 m^2	300 m^2	2250 m^2	10000 m^2	9450 m^2	2200 m^2
1	mar 2013	F	F	F	F	F	F	F
2	jun 2013	I	I			I		I
3	ag 2013	F			I		I	
4	nov 2013	I + P	F	I + P	F	F	F	F
5	jul 2014	F						
6	mar 2015	I	I					

Tabla 3 Programa de desparasitación en bóvidos mantenidos en el Parque Zoológico "Marcelle Natureza" entre 2013 y 2015 (Palomero et al., 2020). Área de pastoreo (m2). Desparasitación (D). Fenbendazol (F), ivermectina (I), praziquantel (P).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

El entorno también juega un papel importante, ya que vivir al aire libre, en compañía de otros animales, o en comunidades de carnívoros de diferentes orígenes puede influir en la frecuencia del tratamiento, debido al contacto cercano con las principales fuentes de infección. Las vías de administración de los tratamientos pueden ser oral (comprimidos, suspensión oral o pasta), tópica, mediante aplicación en *spot-on*, o inyectable.

La elección y aplicación de parasiticidas se presentan como algunos de los desafíos para los veterinarios de vida silvestre, debido a la falta de conocimiento sobre las dosis apropiadas o efectos secundarios. Debido a su confinamiento, se alcanzan niveles elevados de contaminación del suelo por parásitos a pesar de la desparasitación exitosa que se aplica regularmente (Fagiolini *et al*., 2010; Panayotova-Pencheva, 2016).

El control de los parásitos en animales de zoológico sigue siendo una pregunta pendiente, que incluye la administración de medicamentos antiparasitarios (Adkesson *et al*., 2007; Borges *et al*., 2017). Sin embargo, los análisis para establecer la presencia de infecciones parasitarias rara vez se realizan antes de la desparasitación, y la evaluación del éxito rara vez se tiene en cuenta.

2.1.6. Control de la fase exógena

Monjila Khatun (2014) y Rahman (2014) señalan que el hallazgo de infecciones mixtas podría deberse a la presencia de animales de todas las edades en el mismo recinto, la gestión de la alimentación y la eliminación inadecuada de heces. Por ejemplo, Darabus *et al*. (2014) mostraron infecciones múltiples con *Eimeria* sp. y *Trichostrongylus* sp. y otros parásitos intestinales en ciervos de siete jardines zoológicos de Rumania. Dubey (2022) señaló que los ooquistes de *Toxoplasma gondii* son resistentes al medio ambiente y pueden propagarse en los zoológicos por la eliminación inadecuada de heces felinas, el lavado de los recintos y por la lluvia. La infección puede propagarse a otros animales en cautividad y a humanos (tanto visitantes como cuidadores residentes). Por lo tanto, los cuidadores de zoológicos deben tener en cuenta estos puntos para controlar la fase exógena y reducir el riesgo de reinfección entre los animales en el zoológico y el riesgo de zoonosis.

Independientemente de la eficacia del control de la fase endógena, las medidas dirigidas a ese objetivo solo proporcionan un efecto a corto plazo. Por ello, se busca implementar diferentes estrategias para reducir la presencia de formas parasitarias en el ambiente, especialmente aquellas con una alta resistencia a las condiciones ambientales desfavorables, que mantienen la fuente de infección durante períodos prolongados.

Entre las medidas sugeridas se encuentran las emitidas por organismos como el Consejo Científico Europeo de Parásitos de Animales de Compañía (ESCCAP) en sus guías sobre "Control de parásitos en perros y gatos", dirigidas principalmente a los propietarios de mascotas, que también se pueden aplicar a los carnívoros. Estas medidas incluyen la recolección de heces después de la defecación, especialmente en espacios públicos, y la limpieza y desinfección regular de los lugares de descanso de los animales (ESCCAP, 2017).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Ciertos métodos recomendados para controlar parásitos en el ganado, como la rotación de pastos o la alternancia de especies animales, no se pueden observar en zoológicos debido a que no siempre hay suficientes parcelas disponibles (Arias *et al*., 2013), y el movimiento de animales dentro del parque es imposible sin causarles niveles elevados de estrés (Terry, 2013). Por lo tanto, los procedimientos más útiles parecen ser la eliminación frecuente de muestras fecales de las parcelas, además del análisis coprológico para evaluar la carga parasitaria y establecer la desparasitación adecuada que se administrará a intervalos regulares (Singh *et al*., 2006; Aviruppola *et al*., 2016).

2.2. DOMESTICACIÓN DE PERROS

La domesticación de perros probablemente comenzó muy temprano durante el período del Paleolítico superior (aproximadamente hace 35.000 años), mucho antes que cualquier otra domesticación de animales o plantas. Este proceso temprano, probablemente inconsciente, se denomina proto-domesticación para distinguirlo del proceso de domesticación real que se ha fechado alrededor del 14.000 a.C. Los análisis del ADN genómico han demostrado recientemente que la domesticación comenzó en el Medio Oriente y se expandió rápidamente a todas las poblaciones humanas (Fig. 8). Hoy en día, la población canina está fragmentada en varios cientos de razas bien caracterizadas por sus fenotipos que ofrecen un espectro único de polimorfismo. Estudios más recientes detectan firmas genéticas que serán útiles para resaltar la historia de las razas, así como el impacto de la domesticación a nivel de ADN.



Fig. 8 Arte rupestre libio (*Tadrart Acacus)* que representa a un cazador y su perro (7.000 años de antigüedad).
Fuente: UNESCO/CPE

2.2.1. La historia del perro y datos arqueológicos

La familia de los cánidos (Canidae) es un grupo de mamíferos carnívoros divididos en 38 especies (Clutton-Brock y Serpell, 1995). Entre ellos, el perro, *Canis familiaris*, es el único miembro que ha sido domesticado, aunque el zorro rojo y el mapache han sido criados por su piel. Hasta hace poco tiempo, ha habido muchos debates sobre el/los ancestro(s) del perro. Considerando la enorme diversidad fenotípica, el principal punto de discusión era si una sola especie salvaje o varias estaban en el origen de los perros de hoy en día, algunos creían que el

lobo era el único ancestro y otros el chacal o una especie extinta desconocida también eran ancestros. Darwin mismo sugirió que los perros derivaban de varias especies (Darwin y Murray, 1868). Hoy en día, los estudios combinados sobre comportamiento, vocalizaciones, morfología y más particularmente biología molecular muestran claramente que el lobo, *Canis lupus*, es el principal si no el único ancestro del perro. Un estudio mostró que el perro y el lobo comparten el 98% de su ADN mitocondrial, lo que contrasta con el 7,5% de diferencia entre el lobo y los coyotes (*Canis latrans*), la especie que es su pariente silvestre más cercano (Vila *et al*., 1997). Huesos de lobos y de homínidos primitivos han sido encontrados juntos en varios lugares como Zhoukoundian en el norte de China fechado en 300.000 años AP (antes del presente) o la cueva de Lazaret en el sur de Francia fechada en 150.000 años AP. (Fig. 9).

Estas asociaciones no demuestran que la domesticación ya estaba en marcha, pero sugieren que los humanos y los lobos probablemente compartían los mismos territorios y vivían en contacto cercano. El cráneo de perro más antiguo que muestra claros signos de diferenciación

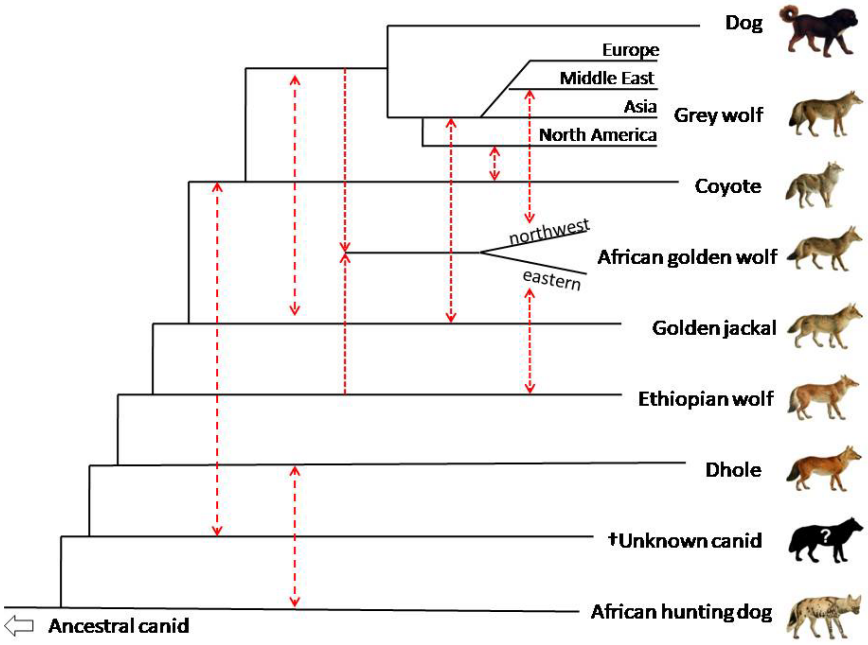


Fig. 9 Ancestro(s) de los perros.
Fuente: William Harris

de los lobos fue descubierto en la cueva Goyet (Bélgica) durante mediados del siglo XIX. Fue examinado recientemente junto con una serie de otros cánidos fósiles y datado por Espectrometría de Masas con Acelerador (AMS) en 31.700 años AP (Germonpre *et al*., 2009). Por todos los criterios analizados, el gran fósil de cánido es claramente diferente de los lobos recientes, presumiblemente se asemeja a los perros prehistóricos. Se identifica como un perro del Paleolítico. El estudio que examinó la mencionada cueva también identificó lo que parecen ser perros prehistóricos en la cueva Chauvet (26.000 años AP) y en Mezhirich en Ucrania (15.000 años AP). Estos resultados sugieren que la domesticación del perro ya había comenzado

durante el período Aurignaciano. Sin embargo, no todos están convencidos por esta sugerencia y algunos autores argumentaron que, en estos primeros días, los homínidos podrían no tener la capacidad cerebral para proyectarse en un programa complejo de domesticación. Más bien, como explicó Clutton-Brock (Clutton-Brock y Serpell, 1995), se puede considerar que los lobos en busca de comida eran atraídos por los campamentos humanos donde podían encontrar sobras y así se acostumbraban progresivamente a la presencia humana. Los cazadores humanos, también, probablemente mataban lobos en busca de comida alrededor de sus campamentos y usaban sus pieles para vestimenta. A veces, llevaban cachorros vivos que ocasionalmente se acostumbraban a la familia y se domesticaban. Estos lobos domesticados estaban muchas generaciones lejos de los verdaderos perros domesticados, pero sin duda fueron sus precursores. Esta teoría de la proto-domesticación, en contraposición a la domesticación real como ocurre en muchas otras ocasiones, también es compartida por Coppinger y Coppinger (2001). Una evidencia más sólida de la domesticación se podría encontrar en un sitio de entierro en Alemania llamado Bonn-Oberkassel, datado en 14.000 años AP. Este sitio pertenece a un período cultural llamado Epipaleolítico. Hasta ese período, los animales eran asesinados por impacto directo, pero en el Epipaleolítico, las estrategias de caza cambiaron cuando los humanos comenzaron a usar flechas armadas con pequeñas cuchillas de piedra. El éxito de esta nueva estrategia habría mejorado una nueva asociación entre cazadores y perros pre-domesticados, que ayudarían a rastrear y traer de vuelta animales heridos. En el contexto de esta relación humano-perro más fuerte, los restos arqueológicos encontrados en el sitio de Ein Mallaha, datado en 12.000 años AP, son de interés. Los habitantes de este sitio eran cazadores-recolectores, que enterraban a sus muertos en tumbas cubiertas de piedra. En una de estas tumbas, un esqueleto humano acostado sobre su lado derecho en una posición flexionada tiene su mano izquierda sobre el tórax de un cachorro.

Del siguiente período prehistórico (11.000-7000 años AP), se encontraron una gran cantidad de restos de perros en muchas partes del mundo, entre los cuales se encuentra la cueva Danger en Utah, el caso más antiguo de entierro de perros en las Américas, hace aproximadamente 11.000 años. En Europa Occidental, los restos datados de al menos 8500 años AP brindan información sobre la domesticación del lobo en Europa (Vigne, 2005; Vigne *et al*., 2005). Así, incluso si no se puede determinar una fecha precisa principalmente debido a la duración del proceso de domesticación en su conjunto, el perro es, con mucho, el primer animal domesticado. Su domesticación precedió al advenimiento de la agricultura alrededor de 10.000 años AP y la domesticación de otros animales de valor agrícola. También se puede sugerir que el proceso de domesticación del perro sirvió como modelo para la domesticación de otros animales. Como informamos, el comienzo de la domesticación durante el Aurignaciano probablemente no fue una acción intencional de los humanos, lo que explica que este proceso pudo haber durado un período de 15.000 años, entre 30.000 y 15.000 años AP. Situaciones y eventos completamente diferentes caracterizan la domesticación de ovejas, caballos o ganado. El proceso biológico de domesticación parece una evolución natural en la que los animales padres se vuelven aislados reproductivamente de la población silvestre y constituyen un pequeño grupo fundador que aumenta progresivamente en número y se diferencia

USC DE COMPOSTELA

genéticamente bajo un proceso de deriva genética. A lo largo de generaciones sucesivas, este grupo de animales acumula diferencias genéticas y fenotípicas en respuesta a su nuevo entorno humano. Hasta ahora, no se han producido datos genómicos relacionados con restos de perros.

Pero con la mejora y disminución de costos que caracterizan a las técnicas de secuenciación de genomas recientes conocidas bajo el término genérico de secuenciación de próxima generación, es razonable pensar que tales datos pronto estarán disponibles. Ya se han recopilado numerosas muestras arqueológicas por Vigne *et al*. (2005) y se están procesando en el laboratorio PalGene en la ENS Lyon, Francia (Fig. 10). La secuenciación de regiones conocidas por haber estado bajo selección positiva durante la domesticación aportaría nuevas piezas al rompecabezas (Vonholdt *et al*., 2010).



Fig. 10 Perro guardián. Mosaico romano de la Casa de *Paquius Proculus* en Pompeya
Fuente: Todd Gary

2.2.2. Parásitos que afectan a perros y que pueden causar zoonosis en España

En España, en 2023, el 27% de los hogares tenía al menos un perro y el 17% al menos un gato. En total, había 9,3 millones de perros y 5,8 millones de gatos viviendo en hogares en todo el país (Trenda, 2024). Aunque las mascotas ofrecen beneficios psicológicos y físicos significativos para sus dueños (Cutt *et al*., 2007), también existen riesgos para la salud bien documentados asociados con ser dueño de una mascota, incluidas mordeduras, arañazos y alergias. Las mascotas también pueden ser portadoras de agentes infecciosos (como parásitos, bacterias, hongos y virus) a pesar de parecer estar sanas (Robertson *et al*., 2000). Más importante aún, muchos parásitos que afectan a las mascotas tienen potencial zoonósico, principalmente protozoos, helmintos y artrópodos. Los helmintos, incluidos los nematodos, cestodos y trematodos, infectan comúnmente a perros y gatos en Europa (Robertson *et al*., 2000). Los parásitos intestinales prevalentes con un potencial zoonósico significativo son *Toxocara* spp., *Ancylostoma* spp., *Dipylidium caninum* y especies de la familia Taenidae (géneros *Taenia* y *Echinococcus*) (Robertson *et al*., 2000). *Toxocara canis* y *T. cati* son parásitos cosmopolitas. En España, la prevalencia de estas infecciones parasitarias varía entre el 7,4% y el 31,8% en perros y entre el 7,7% y el 58,0% en gatos (Beugnet *et al*., 2014;

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Rodríguez *et al*., 2016). Sin embargo, los datos de prevalencia de diferentes estudios son difíciles de comparar debido a diferencias en la edad (la prevalencia es mayor en cachorros y gatitos), el hábitat (por ejemplo, refugios, animales callejeros) y las técnicas de diagnóstico (técnica coprológica, *post mortem*, etc.) (Beugnet *et al*., 2014; Rodríguez *et al*., 2016). *Toxocara* spp. también se encuentran entre los parásitos que se detectan con mayor frecuencia en la arena de los parques infantiles, y las prevalencias en muestras de suelo de parques públicos en España se han estimado entre 3,8% -16,4% (Martínez-Moreno *et al*., 2007; Dado *et al*., 2012). Estos parásitos pueden tener un impacto significativo en la Salud Pública, especialmente en niños que utilizan frecuentemente los parques infantiles, ya que *Toxocara* spp. pueden causar *larva migrans* visceral u ocular en humanos (Schantz, 1989; Lee *et al*., 2010).

Los nematodos de la familia Ancylostomatidae (*Ancylostoma* spp. y *Uncinaria stenocephala*) son responsables de la *larva migrans* cutánea en humanos, con una prevalencia que oscila entre el 4,3% y el 25,7% y el 3,0% y el 91,0% en perros y gatos domésticos y callejeros en España, respectivamente (Beugnet *et al*., 2014; Miró *et al*., 2014; Ortuño *et al*., 2014; Rodríguez *et al*., 2016). Estos parásitos también han sido detectados en muestras de suelo (3,0% -9,3%) en parques de Madrid (Dao *et al*., 2012). Este hallazgo es preocupante ya que los huevos de *Ancylostoma* spp. eclosionan en el suelo y luego en su interior se desarrollan las larvas infectantes. Mientras que la ingestión oral de estas larvas es la ruta de transmisión más común, también pueden penetrar la piel de los humanos. Por lo tanto, los humanos pueden experimentar picazón debido al movimiento de las larvas, y las infecciones bacterianas secundarias adquiridas al rascarse son comunes. En infecciones masivas, las larvas pueden penetrar en tejidos más profundos, lo que lleva a síntomas pulmonares o intestinales (Robertson *et al*., 2000).

Entre los cestodos, las infecciones por *D. caninum* son comunes en España y afectan al 8,3%-39,0% de los perros y al 4,2%-64,6% de los gatos (Martínez-Carrasco *et al*., 2007; Rodríguez *et al*., 2016; Beugnet *et al*., 2018). Es inusual que los adultos humanos se vean afectados ya que la transmisión ocurre a través de la ingestión inadvertida de pulgas o piojos infectados con el cisticercoide, y la dipilidiosis se encuentra más a menudo en niños pequeños. El riesgo de infección por *D. caninum* puede reducirse mediante el control efectivo de piojos y pulgas y mediante el tratamiento regular de mascotas con un cestocida como el praziquantel (Robertson y Thompson, 2002).

La familia Taenidae, que incluye los géneros *Taenia* y *Echinococcus*, es responsable de otras infecciones comúnmente encontradas en mascotas (Deplazes *et al*., 2011). Las infecciones humanas con metacestodos de diferentes especies de *Taenia* específicas de carnívoros son raras, aunque se han descrito algunos casos de cenurosis causados por *Taenia multiceps* y T. *serialis*, y de cisticercosis causada por *T. crassiceps* y *T. martis* (Deplazes *et al*., 2016). La equinococosis quística y alveolar causada por *Echinococcus granulosus* y *E. multilocularis*, respectivamente, se consideran entre las zoonosis helmínticas más graves debido a su alto potencial patógeno (Robertson y Thompson, 2002; Deplazes *et al*., 2011). *E. multilocularis* ha sido descrito como una amenaza emergente para la Salud Pública ya que han aparecido focos urbanos de infección

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

en algunos países europeos (por ejemplo, Suiza) (Deplazes *et al*., 2001; Deplazes *et al*., 2011; Torgerson y Macpherson, 2011). Hasta ahora, sin embargo, no se han reportado infecciones por adultos o metacestodos de *E. multilocularis* en España, permaneciendo *E. granulosus* como el principal cestodo responsable de la equinococosis quística en humanos en este país (Carmena y Cardona, 2013).

Debido a que existen áreas urbanas con grandes cantidades de mascotas y espacios abiertos limitados, los perros a menudo se concentran en lugares públicos como playas, parques y áreas de recreo. Estos sitios pueden estar contaminados con sus heces, lo que los convierte en áreas de riesgo significativas para la transmisión de parásitos que afectan a los humanos (Macpherson, 2005). A diferencia de los huevos de *Toxocara* spp. y *Ancylostoma* spp., los de *Echinococcus* spp. y *Taenia* spp. son ya infectantes al ser eliminados junto con las heces. Por lo tanto, los humanos (principalmente niños) pueden infectarse al jugar en áreas de juegos contaminadas o jugar con perros, ya que los huevos se adhieren a los pelos alrededor del ano, hocico y patas del perro infectado (Robertson y Thompson, 2002; Overgaauw *et al*., 2009). Actualmente, sin embargo, la principal fuente de infección por cestodos en humanos parece ser por la ingestión de vegetales y frutas contaminadas (Poulle *et al*., 2017).

Encuestas más recientes han informado de una menor prevalencia de estos parásitos y evidencias de la creciente importancia de protozoos zoonóticos como *Giardia* y *Cryptosporidium* (Macpherson, 2005; Overgaauw *et al*., 2009). Estas encuestas anteriores involucraron solo un pequeño número de animales, predominantemente muestrearon animales jóvenes, se limitaron a grupos de alto riesgo y se centraron en parásitos específicos (ESCAPP, 2017; Poulle *et al*., 2017).

Los parásitos intestinales zoonósicos no son la única preocupación, ya que otros gusanos pueden causar enfermedades graves en perros y gatos, y algunos también son causas de zoonosis como los gusanos del corazón *Diroflaria immitis*, *Diroflaria repens* y *Thelazia callipaeda*, o gusanos pulmonares (*Angiostrongylus vasorum*, *Crenosoma vulpis*, etc.) (Baneth *et al*., 2016). Por lo tanto, es importante que las mascotas sean examinadas por un veterinario que realizará las recomendaciones pertinentes para el control de parásitos.

Las infecciones fúngicas comunes transmitidas por mascotas incluyen la tiña corporal/capilar (dermatofitosis). Menos comúnmente, las mascotas pueden transmitir enfermedades artrópodo-portadoras y virales (por ejemplo, sarna, rabia). La infección en una mascota puede proporcionar una advertencia centinela sobre vectores locales y condiciones endémicas, como el riesgo de enfermedad de Lyme. El tratamiento es específico para la infección, aunque muchas infecciones son autolimitadas. La prevención implica medidas de sentido común como el lavado adecuado de manos, la eliminación adecuada de los desechos animales y asegurar que se diagnostiquen y traten los animales infectados. Se indican precauciones especiales para las personas inmunocomprometidas. Una mayor comunicación entre los médicos de atención primaria y los veterinarios podría mejorar el tratamiento y la prevención de estas condiciones (Rabinowitz, 2007).

USC SANTIAGO DE COMPOSTELA

2.2.3. Patogenia y potencial zoonósico de los parásitos entéricos del perro

Según Robertson y Thompson (2002) los parásitos entéricos con potencial zoonósico que pueden afectar a los perros se muestran en la siguiente (Tabla 4).

Parásito	Patogenia	Potencial zoonósico
Nematodos		
Spirocerca	***	Ninguno
Toxocara	*** +++	*Larva migrans* visceral y ocular
Toxascaris	*	Ninguno
***Ancylostoma* spp.**	*** +++/++++	*Larva migrans* cutánea y enteritis eosinofílica
Uncinaria	** +	*Larva migrans* cutánea
Trichuris	**	Ninguno
Strongyloides	* ++	Estrongiloidosis
Cestodos		
***Echinococcus* spp.**	* +++	Enfermedad hidatídica, equinococosis quística y alveolar
***Taenia* spp.**	* +++	Cenurosis (raro)
Dipylidium	* +	Dipilidiosis
***Spirometra* spp.**	* ++	Esparganosis (indirecta)
Protozoos		
Giardia	* +	Giardiosis
Isospora	*	Ninguno
***Sarcocystis* spp.**	*	Ninguno
***Cryptosporidium* spp.**	* ++	Criptosporidiosis
Hammondia	*	Ninguno
Neospora	***	Considerado improbable
Entamoeba	* ++	Sí

Tabla 4 Patogenia y potencial zoonósico de los parásitos entéricos de los perros (*) o en el ser humano (+) clasificado como bajo, medio o alto.

2.2.4. Patogenia y potencial zoonósico de los parásitos entéricos del gato

Según Robertson y Thompson (2002) los parásitos entéricos con potencial zoonósico que pueden afectar a los gatos se muestran en la Tabla 5.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Parásito	Patogenia	Potencial zoonósico
Nematodos		
Toxocara	** +++	*Larva migrans* visceral y ocular
Toxascaris	*	Ninguno
***Ancylostoma* spp.**	** +	*Larva migrans* cutánea
Uncinaria	* +	*Larva migrans* cutánea
Cestodos		
Dipylidium	*+	Dipilidiosis
***Spirometra* spp.**	*++	Esparganosis (indirecta)
***Taenia* spp.**	*	Ninguno
Protozoos		
Giardia	*++	Giardiosis
Toxoplasma	*+++	Toxoplasmosis
***Isospora* spp.**	*	Ninguno
***Sarcocystis* spp.**	*	Ninguno
***Cryptosporidium* spp.**	**++	Criptosporidiosis

Tabla 5 Patogenia y potencial zoonósico de los parásitos entéricos de los gatos (*) o humanos (+) clasificado como bajo, medio o alto.

2.2.5. Prevalencia de helmintosis en mascotas

Como se ha señalado anteriormente, las infecciones por helmintos ascáridos o ancilostómidos son muy comunes entre las mascotas. La Tabla 6 resume algunos de los estudios realizados en los últimos ocho años, lo que demuestra que estas infecciones parasitarias afectan a animales en todo el mundo.

		Toxocara	**Ancylostoma**
Hu *et al.* (2015)	China	-	34,8%
Shukullari *et al.* (2015)	Albania	8%	7,1%
Awadallah y Salem (2015)	Egipto	3%	6,15%
Simonato *et al.* (2015)	Italia	9,7%	8,2%
Mircean *et al.* (2010)	Rumanía	20,3%	10,1%
Yamamoto *et al.* (2009)	Saitama (Japón)	12,5%	10,4%
Little *et al.* (2009)	USA	2,2%	2,5%
Overgaauw *et al.* (2009)	Holanda	4,5%	-
Mohamed *et al.* (2009)	USA	5,04%	4,5%
Batchelor *et al.* (2008)	Reino Unido	1,4%	-
Palmer *et al.* (2008)	Australia	3,2%	6,7%

Tabla 6 Presencia de huevos de *Toxocara* y *Ancylostoma* en heces de perros y gatos.

En la siguiente (Tabla 7) se muestran los resultados obtenidos del análisis de muestras de tierra en parques públicos. Estos datos evidencian que se trata de un problema de Salud Pública a nivel global, lo que resalta la importancia de mantener un control adecuado del estado parasitario de las mascotas para prevenir la eliminación de formas parasitarias en el medio ambiente que puedan alcanzar los estadios infectantes.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

		Toxocara	Ancylostoma
Otero *et al*. (2017)	Lisboa (Portugal)	85,7%	-
Kleine *et al*. (2017)	Hanover (Germany)	6,5-41,3%	-
Moskvina *et al*. (2016)	Moscú (Rusia)	-	-
Moudgil *et al*. (2015)	Palampur	44,9%	15,94%
Shukullari *et al*. (2015)	Albania	8%	7,1%
Hoopes *et al*. (2015)	Canadá	-	-
Paller y de Chavez (2014)	Filipinas	77%	7%
Neves *et al*. (2014)	Oporto (Portugal)	7,8%	-
Manini *et al*. (2012)	Umurama (Brasil)	100%	-

Tabla 7 Presencia de huevos de *Toxocara* y *Ancylostoma* en parques públicos.

Se han llevado a cabo encuestas epidemiológicas con el propósito de determinar el nivel de exposición a *Toxocara* responsables de zoonosis en personas que tienen contacto con mascotas, especialmente en lo que respecta a los niños, ver (Tabla 8).

La relevancia de la toxocariosis en humanos ha impulsado la realización de estudios en poblaciones específicas, como individuos con discapacidad intelectual (Alvarado-Esquivel, 2013) o con deficiencia visual (Alvarado-Esquivel *et al*., 2015), revelando seroprevalencias inferiores al 10%.

	País	Toxocara
Sowemimo *et al*. (2017)	Nigeria	37,3%
Mughini-Gras *et al*. (2016)	Holanda	8-10%
Yang *et al*. (2016)	Corea	16,07%
Kyei *et al*. (2015)	Ghana	53,5%
Martínez *et al*. (2015)	Venezuela	29%
Guilherme *et al*. (2013)	Brasil	4,2%
Romero-Núñez *et al*. (2013)	México	22,2%
Abdi *et al*. (2012)	Irán	21,6%
Manini *et al*. (2012)	Brasil	17,8%
Espinoza *et al*. (2008)	Perú	32,4%

Tabla 8 Seroprevalencia de anticuerpos frente a *Toxocara* en personas.

2.2.6. Control de los parásitos en las mascotas

Según las pautas de ESCCAP, los dueños de mascotas deben seguir un conjunto de medidas preventivas simples (por ejemplo, no dar de comer carne cruda a sus mascotas, lavarse las manos antes de comer, lavar los artículos y superficies que hayan estado en contacto con alimentos crudos, usar guantes cuando se trabaja el jardín, lavar y desinfectar adecuadamente frutas y verduras y eliminar diariamente las heces de las mascotas del entorno). Además, las mascotas deben ser vistas por un veterinario para evaluar su estado de salud y someterse a un examen coprológico al menos dos veces al año. De acuerdo con los resultados coprológicos y

USC DE COMPOSTELA

las condiciones de vida, necesitan desparasitación de manera regular (Overgaauw *et al*., 2009; Torgerson y Macpherson, 2011; ESCAPP, 2019).

Además, estas pautas recomiendan un régimen de desparasitación diseñado específicamente para cada mascota en función de una evaluación individual de los factores de riesgo (edad, estado reproductivo, estado de salud, nutrición, alojamiento compartido, vagabundeo, perros de trabajo, ubicación e historial de viajes) (ESCAPP, 2019). Los procedimientos de desparasitación rutinaria deben ser recomendados por los veterinarios teniendo en cuenta las circunstancias epidemiológicas locales y estos factores de riesgo individuales. En algunos países o regiones, la desparasitación de gatos y perros es obligatoria por ley por razones de Salud Pública. En algunas regiones españolas, la desparasitación contra las tenias al menos una vez al año es obligatoria. Sin embargo, esta frecuencia se ha descrito como insuficiente para el control efectivo de la equinococosis (Deplazes *et al*., 2011).

La educación es clave para controlar ciertas zoonosis. Los veterinarios a menudo están obligados a informar a los dueños de mascotas sobre los posibles riesgos y ofrecer información detallada sobre las vías de transmisión de parásitos, la importancia de la desparasitación desde una perspectiva de Salud Pública y la protección de otras mascotas, así como las medidas preventivas que ayudarán a los propietarios y mascotas a mantenerse saludables. Actividades como la eliminación diaria de heces del entorno reducirán la probabilidad de infección tanto en mascotas como en propietarios (Robertson y Thompson, 2002; ESCAPP, 2019).

Según ESCCAP, también existe un riesgo importante de importar enfermedades al introducir perros del extranjero. Por ejemplo, *E. multilocularis* es endémico en algunos países europeos, mientras que nunca se ha detectado en España. Esto significa que los perros importados deben ser examinados en busca de estas enfermedades zoonósicas y desparasitados correctamente por un veterinario, ya que estos parásitos pueden causar problemas de salud a largo plazo tanto en humanos como en mascotas (Deplazes *et al*., 2011, Torgerson y Macpherson, 2011).

En entidades como protectoras de animales, perreras o refugios, existen pautas específicas emitidas por diferentes organismos internacionales como la Asociación de Veterinarios de Refugios (ASV) o la Coalición Internacional de Gestión de Animales de Compañía (ICAM), que se preocupan por el bienestar de perros y gatos. Estas pautas se centran en aspectos como la ubicación de los centros, los materiales utilizados en su construcción, la implementación de rutinas de limpieza y desinfección, y los planes de desparasitación, entre otros, con el objetivo de garantizar niveles aceptables de salud y bienestar para los animales acogidos (ICAM, 2007; Newbury *et al*., 2010). Robertson y Thompson (2002) recogieron en la Tabla 9 diversas pautas para minimizar las infecciones parasitarias.

Los antihelmínticos para perros disponibles en España (ESCCAP, 2018) se recogen en la siguiente tabla 10. Asimismo, se indica la guía para la desparasitación individual de perros (Fig. 11).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Nematodes	
Toxocara	• Recoger y eliminar las heces regularmente (al menos semanalmente).
	• Uso regular de antihelmínticos; comenzar en cachorros no más tarde de las 4 semanas de edad y continuar quincenalmente hasta las 12 semanas de edad.
	• Lavarse las manos después de manipular mascotas.
Ancylostoma* y *Uncinaria	• Recoger y eliminar las heces regularmente (diariamente).
	• Uso regular de antihelmínticos.
	• Usar zapatos cerrados.
Cestodos	
Echinococcus	• No alimentar con vísceras crudas.
	• Evitar el acceso de los perros a cadáveres.
	• Impedir que el perro deambule sin correa en áreas boscosas.
	• Evitar que los perros cacen roedores.
	• Lavarse las manos después de tocar perros.
	• Usar praziquantel regularmente a intervalos de cinco semanas.
Dipylidium	• Usar antihelmínticos apropiados.
	• Controlar las pulgas en las mascotas.
Protozoos	
Toxoplasma	• Vaciar las bandejas de arena al menos cada dos días.
	• Minimizar la manipulación de carne cruda por personas embarazadas o inmunocomprometidas.
	• Cocinar bien la carne.
	• Lavarse las manos después de manipular la carne y después de hacer trabajos de jardinería.
Giardia	• Buena higiene (lavarse las manos después de manipular mascotas).
	• Vacunar a los animales frente a *Giardia.*
Cryptosporidium	• Buena higiene (lavarse las manos después de manipular mascotas).

Tabla 9 Recomendaciones para evitar la exposición a diferentes parásitos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

				Indicaciones de Uso				
Principios activos	**Forma farmacéutica**	**Dosificación**	**Precauciones especiales de uso**	**Protozoos**	**Nematocida**	**Cestocida**	**Preventivo dirofilariosis**	**Observaciones**
Afoxolaner + Milbemicina oxima	Comprimidos	2,5-4,5 mg/kg + 0,57-1 mg/kg	Edad mínima: 8 semanas Peso mínimo: 2 kg	-	Si	-	Si	Ectoparásitos Vermes pulmonares
Emodepsida + Praziquantel	Comprimidos	1 mg/ kg + 5 mg/kg	Edad mínima: 12 semanas Peso mínimo: 1 kg	-	Si	Si	-	-
Emodepsida + Toltrazurilo	Suspensión oral	0,45 mg/kg + 9 mg/kg	Edad mínima: 2 semanas NO durante gestación NO primeras 2 semanas lactación Peso mínimo: 0,4 kg	Coccidios	Si	-	-	-
Epsiprantel + Pirantel	Comprimidos	5,5 mg/kg + 5 mg/kg	Edad mínima: 4 semanas NO durante la gestación	-	Si	Si		-
Espinosad + Milbemicina oxima	Comprimidos	45-70 mg/kg + 0,75-1,18 mg/kg	Edad mínima: 14 semanas Peso mínimo: 3,9 kg	-	Si	-	Si	Ectoparásitos
Febantel + Pirantel	Suspensión oral	15 mg/kg + 5 mg/kg	Edad mínima: 2 semanas Peso mínimo: 0,6 kg NO durante gestación ni lactancia	-	Si	-	-	-
Febantel + Pirantel + Praziquantel	Comprimidos	15 mg/kg + 14,4 mg/kg + 5 mg/kg	Peso mínimo: 2 kg NO en primeros dos tercios de gestación	*Giardia duodenalis*	Si	Si	-	-
Fenbendazol	Pasta oral	50 mg/kg	NO en los 39 primeros días de gestación	*Giardia duodenalis*	Si	-	-	-
Fenbendazol	Comprimidos	20 mg/kg - 100 mg/kg	-	*Giardia duodenalis*	Si	Si	-	-
Flubendazol	Pasta oral	22 mg/Kg	-	-	Si	Si	-	-
Imidacloprid + Moxidectina	Spot on	10 mg/kg + 2,5 mg/kg	Edad mínima: 7 semanas	-	Si	-	Si	Vermes pulmonares *Spirocerca lupi* Ectoparásitos
Ivermectina + Pirantel	Comprimidos	6 µg/kg + 5 mg/kg	Edad mínima: 6 semanas	-	Si	-	Si	-
Mebendazol	Comprimidos / Suspensión oral	22 mg/kg	-	-	Si	Si	-	-
Melarsomina diclorhidrato	Inyectable	2,2 mg/kg	NO durante gestación	-	-	-	Si (Adulticida)	-
Milbemicina oxima + Lufenurón	Comprimidos	0,5 mg/kg +10 mg/kg	Edad mínima: 2 semanas Peso mínimo: 1 kg	-	Si	-	Si	Ectoparásitos
Milbemicina oxima + Praziquantel	Comprimidos	0,5 mg/kg + 5 mg/kg	Edad mínima: 2 semanas Peso mínimo: 1 kg	-	Si	Si	Si	*Thelazia callipaeda* Vermes pulmonares
Moxidectina	Inyectable	0,05 ml/kg	Edad mínima: 12 semanas	-	Si	-	Si	-
Niclosamida + Oxibendazol	Pasta oral	120 mg/kg + 15 mg/kg	Edad mínima: 2 semanas	-	Si	Si	-	-
Oxantel + Pirantel + Praziquantel	Comprimidos	20 mg/kg + 5 mg/kg + 5 mg/kg	Edad mínima: 8 semanas Peso mínimo: 1 kg NO durante gestación ni lactancia	-	Si	Si	-	-
Praziquantel	Comprimidos / Inyectable	5 mg/kg	-	-	-	Si	-	-
Praziquantel + Fenbendazol	Comprimidos	2,5-5 mg/kg + 25-50 mg/kg	Edad mínima: 2 semanas Peso mínimo: 0,5 kg		Si	Si		
Selamectina	Spot on	6 mg/kg	Edad mínima: 6 semanas	-	Si	-	Si	-

Tabla 10 Los antihelmínticos para perros disponibles en España (ESCCAP, 2018).

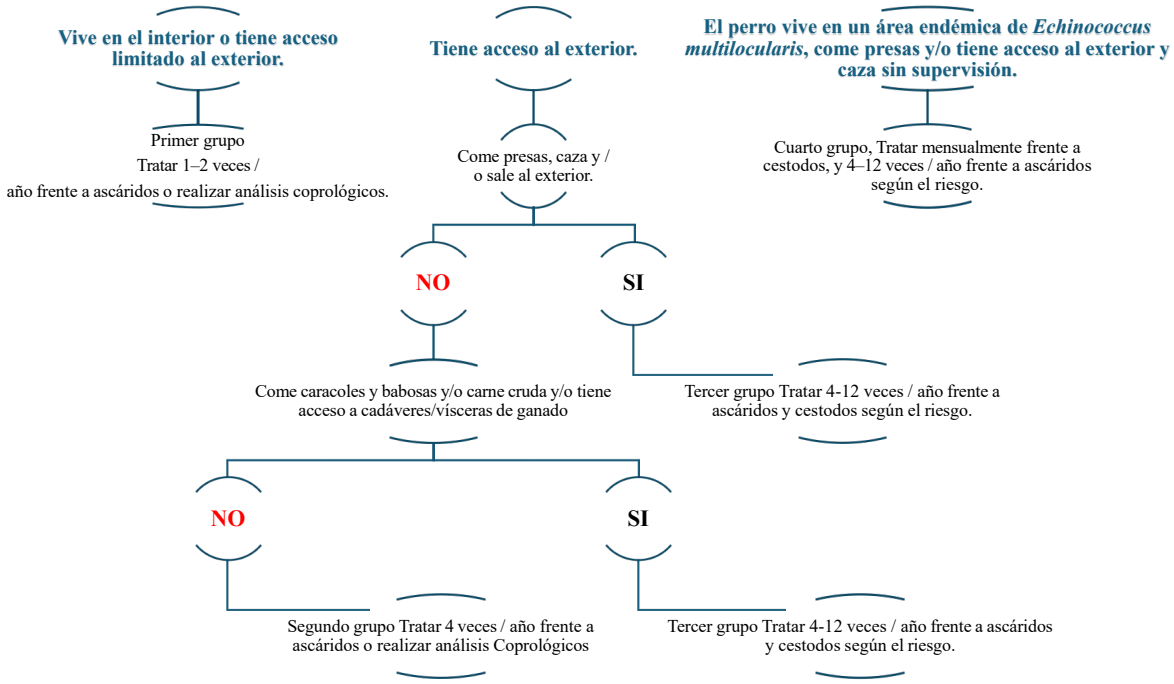


Fig. 11 Guía para la desparasitación individual de perros (ESCCAP, 2018).

2.3. HELMINTOS TRANSMITIDOS POR EL SUELO

Entre las infecciones parasitarias más recurrentes en el ser humano y los animales destacan aquellas producidas por helmintos transmitidos por el suelo (helmintos transmitidos por el suelo, HTS), que son un conjunto de especies de parásitos que causan la infección a través del contacto con los huevos o larvas (Bethony *et al*., 2006). Según Vercruysse *et al.* (2011), entre las infecciones producidas por STH, las transmitidas por los géneros *Toxocara* y *Ancylostoma* son las más frecuentes, y de acuerdo con Bethony *et al*. (2006), en especial en países tropicales y subtropicales, son también las principales causas de retraso de crecimiento físico e intelectual en países en vías de desarrollo (de Silva *et al*., 2003; OMS, 2004). El carácter endémico de estos helmintos depende sobre todo de la presencia de individuos infectados, de la contaminación fecal constante o habitual del suelo y de las condiciones ambientales apropiadas, como la temperatura y humedad del suelo (Beaver, 1964).

Según estimaciones de la OMS, más de 2000 millones de personas a nivel mundial se encuentran infectadas por al menos una de las especies de los géneros mencionados anteriormente (Bethony *et al*., 2006). Las tasas de morbilidad más altas las encontramos en niños de edad escolar y su infección por *Toxocara* se relaciona con mala condición corporal, retraso en el crecimiento y anemia ferropénica (Goodman *et al*., 2007). Estas mayores tasas de infección en niños se deben a que, a diferencia de los adultos, tienden a estar más en contacto con áreas posiblemente contaminadas, como parques y zonas con hierba. Asimismo, tienen menos inculcados los hábitos de limpieza (como lavarse las manos) y son más propensos a poner en contacto la boca con las manos sucias.

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

El suelo también actúa como un importante vehículo de transmisión de los huevos de *Toxocara canis* y *Toxocara cati*. Estos huevos se acumulan en las capas más profundas del suelo y se desarrollan hasta la fase infectante en pocas semanas durante el verano. Además, estos huevos sobreviven en el suelo durante muchos meses (Owen *et al*., 1930), dependiendo del tipo de suelo y las condiciones climáticas, ya que el suelo que retiene la humedad favorece el desarrollo de los huevos de *Toxocara*, mientras que la luz solar o la desecación son responsables de su degradación (Beaver *et al*., 1984). En Egipto, Khalil *et al*. (1978) examinaron muestras de suelo recogidas de diferentes provincias y registraron las siguientes tasas de contaminación por huevos de *T. canis*: 12,5%, 11,5%, 10% y 7,5% en Giza, El Cairo, Dakahlia y Qualyobia, respectivamente. Varios investigadores también han estudiado la influencia de las estaciones en la prevalencia de geohelmintos, especialmente sobre huevos de *Toxocara* spp. Shimizu et al. (1993) analizaron la presencia de huevos de *Toxocara* spp. en parques públicos de Tokushima (Japón) con una frecuencia más alta durante la primavera y principios del verano que en el invierno. Esto se asocia con la presencia de un mayor número de cachorros callejeros durante la primavera (Avcioglu y Burgu, 2008). Asimismo, Stojcevic *et al*. (2010) concluyeron que los huevos de *Toxocara* spp. eran menos frecuentes en verano que en invierno en áreas recreativas en Pula (Croacia).

2.3.1. Infección por ascáridos

Entre estas helmintosis transmitidas por el suelo destacan aquellas causadas por la familia de los ascáridos. Esta gran familia de nematodos cuenta con más de 15 géneros que afectan tanto a animales como al ser humano. A pesar de que cada especie posee hospedadores definitivos específicos, en ocasiones podemos encontrar especies capaces de convertirse en agentes zoonósicos y afectar al ser humano. Estudios iniciales realizados por Goodman *et al*. (2007) consideraban que únicamente el género *Toxocara* poseía carácter zoonósico; sin embargo, estudios recientes han demostrado que es posible encontrar infecciones producidas por *Ascaris suum* (Zhou *et al*., 2012), *Toxascaris* (Paquet-Durand *et al*., 2007; Soriano *et al*., 2010) y *Baylisascaris procyonis* (Samson *et al*., 2012).

Las personas pueden infectarse al ingerir huevos infectantes o carne/órganos crudos de hospedadores paraténicos infectados. Las personas se convierten entonces en el hospedador accidental al entrar en contacto con las fases infectantes, que realizan una migración errática en el organismo al no ser capaces de completar su ciclo biológico. Tras la ingestión, los huevos eclosionan y las larvas penetran la pared intestinal, siendo transportadas por la circulación a varios tejidos (hígado, corazón, pulmones, cerebro, músculos, ojos). La toxocariosis humana puede ser asintomática o puede presentarse en diferentes **síndromes clínicos** según el órgano afectado, la intensidad de la infección y el estado inmunológico del hospedador. Las manifestaciones alérgicas también son comunes (Macpherson *et al*., 2013). Aunque las larvas no experimentan más desarrollo en estos órganos, pueden causar reacciones locales y daño mecánico que provoca la toxocariosis clínica (Fisher, 2003; Fillaux y Magnaval, 2013; Moreira *et al*., 2014). Acha *et al*. (2001) proponen ejemplos claros de estas migraciones como el **síndrome de *larva migrans* visceral** (SLMV) y **síndrome de *larva migrans* ocular** (SLMO), o el **síndrome de *larva migrans* cutánea** (SLMC) (Overgaauw y Van Knapen, 2012;

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

Macpherson, 2013; Moreira *et al*., 2014). Además de neurotoxocariosis y toxocariosis encubierta o común (Fan *et al*., 2013). La toxocariosis encubierta se caracterizó clínicamente en niños por fiebre, anorexia, dolor de cabeza, dolor abdominal, náuseas, vómitos, letargo, trastornos del sueño y del comportamiento, faringitis, neumonía, tos, sibilancias, dolores en las extremidades, linfadenitis cervical y hepatomegalia. La toxocariosis común en adultos se caracterizó clínicamente por debilidad, prurito, erupción cutánea, dificultad para respirar y dolor abdominal (Magnaval *et al*., 1994). La toxocariosis puede persistir durante varios años como una infección crónica, y la reactivación de las larvas enquistadas puede ocurrir en individuos inmunocomprometidos, lo que conduce a una mayor migración larvaria y a la exageración de los síntomas clínicos (Eid *et al*., 2015).

No hay información completa sobre los cambios morfológicos de los huevos desde el estadio de desarrollo de una sola célula hasta la fase infectante. Además, existe un debate sobre cuál es la fase infectante de este importante helminto zoonósico, o bien el huevo que contiene la larva de segundo estadio (L2), o sino la larva de tercer estadio (L3) (Brunaská *et al*., 1995; Moreira *et al*., 2014).

2.3.2. Clasificación de *Toxocara* spp.

Toxocara spp. son nematodos parásitos que pertenecen al phylum Nematoda, orden Ascaridia, superfamilia Ascaridoidea, familia Ascarididae, subfamilia Toxocarinae y género *Toxocara*. Las especies más prevalentes dentro del género son *T. canis*, *T. cati* y *T. vitulorum*. De un total de 21 especies dentro del género *Toxocara* (Fan *et al*., 2015b).

Hasta la fecha, se han descrito morfológicamente 26 especies de *Toxocara*, y cuatro de ellas se han diferenciado mediante técnicas moleculares. La especie zoonósica más frecuentemente detectada y extendida es *T. canis*. La zoonosis causada por *T. cati* sigue siendo controvertida y solo se han reportado algunas infecciones, principalmente en niños con SLMO. Aunque, hasta el momento no se ha confirmado ninguna de estas infecciones mediante técnicas moleculares. Solo se ha detectado un caso sospechoso de infección por *T. pteropodis* en personas, y aún no se ha confirmado que esta especie sea zoonósica.

De las especies no zoonósicas, *T. vitulorum* es de gran importancia económica, y hay 13 especies menores: *T. alienata, T. apodemi, T. genettae, T. indica, T. leonine, T. mackerrasae, T. malaysiensis, T. paradoxura, T. pearsei, T. sprenti, T. suricattae, T. tanuki y T. vajrasthirae.* Además, otras nueve especies solo han sido reportadas una vez en la literatura: *T. canarisi, T. cynonycteridis, T. elephantis, T. herpestum, T. hippopotami, T. lyncis, T. manzadiensis, T. vincenti y T. warreni* (Ziegler y Macpherson, 2019).

2.3.3. Ciclo biológico de *Toxocara* spp.

Toxocara spp. presenta un ciclo biológico directo. Los huevos no embrionados se eliminan en las heces del hospedador definitivo (cánidos: *T. canis*; felinos: *T. cati*). Los huevos embrionan en el medio durante un período de 1-4 semanas y se vuelven infectantes, conteniendo larvas de segundo estadio (L2) en su interior. A continuación, cuando el hospedador definitivo ingiere esos huevos infectantes, eclosionan y las L2 penetran la pared intestinal. En perros

USC UNIVERSIDADE

jóvenes (*T. canis*) y gatos (*T. cati*), las larvas migran a través de los pulmones, el árbol bronquial y el esófago, donde son tosidas y tragadas hacia el tracto gastrointestinal, en el que se desarrollan hasta el estadio adulto y comienzan a eliminar huevos en el intestino delgado, que salen al exterior junto con las heces del hospedador. En perros mayores, también pueden ocurrir infecciones patentes (productoras de huevos), pero las larvas suelen quedar detenidas en los tejidos. Las larvas detenidas se reactivan en perras durante la gestación tardía y pueden infectar a los cachorros a través de las vías transplacentaria (principal) y transmamaria (secundaria), en cuyo intestino delgado los ascáridos adultos se mantienen. En gatos, las larvas de *T. cati* solo pueden transmitirse a través de la vía transmamaria a los gatitos si la madre está infectada durante la gestación, pero la detención y reactivación larval somática no parece ser tan importante como en *T. canis* (Fig. 12).

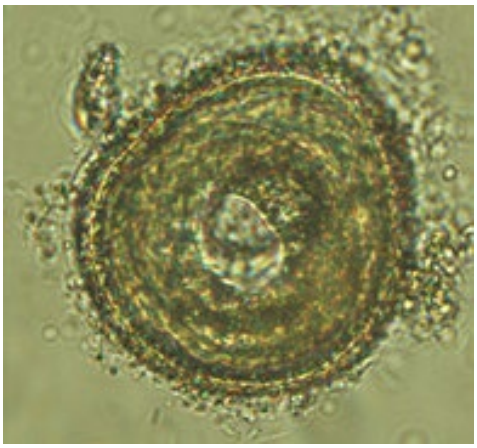


Fig. 12 Huevo de *T. canis* con larva L2 infectante en su interior.

Toxocara spp. también puede transmitirse mediante la ingestión de hospedadores paraténicos (roedores, diferentes tipos de ratones, ratas, jerbos, cerdos, especies avícolas, humanos y primates) (Strube *et al*., 2013).

Las larvas pueden ser ingeridas mediante carnivorismo, sin experimentar crecimiento ni desarrollo. La infección puede ser transmitida por los hospedadores paraténicos solo cuando se consumen sus tejidos (Acha y Szyfres, 2003). Si un perro o un gato consumen un hospedador paraténico, las larvas generalmente completan su desarrollo directamente en el tracto digestivo, sin migrar a través de los pulmones. Las larvas de *T. canis* pueden mantenerse vivas durante varias semanas o incluso más en ratones congelados a -20ºC (O'Lorcain, 1994).

Hasta la fecha, no se pueden obtener conclusiones definitivas sobre si las infecciones prenatales o lactogénicas desempeñan un papel importante en los hospedadores paraténicos. Existen varios estudios que tratan este modo de transmisión en el hospedador paraténico en relación con la infección por *T. canis*, sin embargo, son muy pocos los que abordan la infección por *T. cati*. Para *T. canis*, la transmisión prenatal parece ocurrir solo en condiciones especiales y en menor medida. Una posible explicación podría ser la migración somática recurrente en el hospedador paraténico en comparación con la migración hematogénica muy frecuente en el hospedador definitivo. Por lo tanto, la placenta puede no estar afectada. De hecho, varios

autores no pudieron demostrar ninguna transmisión transplacentaria en ratones (Taylor *et al.,* 1996; Jin *et al.,* 2008). Sin embargo, se demostró la migración transplacentaria de las larvas de *T. canis* en ratones cuando las hembras se infectaron durante la gestación. Los primeros signos de migración hacia el útero y la placenta se detectaron a partir del día 9 de preñez, mientras que la infección del feto se registró el día 11 (Lee *et al.,* 1976). Se proporcionaron pruebas adicionales de la transmisión transplacentaria en muy pocos casos (Oteifa *et al.,* 1996; Reiterová *et al.,* 2003).

A diferencia del hospedador definitivo, la transmisión lactogénica de *T. canis* parece ocurrir con bastante frecuencia en hospedadores paraténicos. En este contexto, en ratones se demostró que el recuento de larvas en la descendencia, así como en la leche, eran altos cuando las madres se infectaban durante la gestación (Baumm y Stoye, 1981). Oshima (1961) demostró fuertes efectos de la gestación y la lactancia en la distribución de *T. canis* en ratones. El autor sugiere que el estado hormonal durante la preñez juega un papel importante en la reactivación de las larvas. Después de la inyección de prolactina, se observó una disminución en el número de larvas de *T. canis* en el tejido de los ratones, lo que lleva a la conclusión de que la hormona puede estimular a las larvas detenidas a continuar la migración. Este estudio fue respaldado por los resultados de Jin *et al.* (2008), quienes también investigaron la transmisión materno-neonatal trans-lactacional de las larvas de *T. canis* en ratones teniendo en cuenta el efecto de la prolactina.

La transmisión vertical de *T. cati* en el hospedador paraténico se describió en estudios que proporcionaron datos similares a la transmisión vertical de *T. canis*. La transmisión intrauterina se observó ocasionalmente en ratones si habían sido infectados durante la gestación (Prokopic y Figallová, 1982; Schön y Stoye, 1986). Schön y Stoye (1986) demostraron que la transmisión lactogénica ocurría con frecuencia cuando la madre estaba infectada alrededor del momento del parto. La tasa de infección lactogénica de la descendencia disminuyó a medida que aumentaba el intervalo de tiempo entre la infección y la lactancia. Además, la descendencia infectada por vía lactógena mostró la capacidad de transmitir larvas a su descendencia mediante la transmisión lactogénica también. Cabe destacar que la descendencia infectada por vía lactógena muestra protección parcial contra la reinfección, marcada por una cantidad significativamente reducida de larvas en comparación con un grupo de control infectado oralmente (Reiterová *et al.,* 2006).

Además de la transferencia de larvas a la descendencia, el aborto de los fetos es otra consecuencia importante de la transmisión intrauterina. Se observó una disminución significativa en el tamaño de la camada de ratones en comparación con el grupo de control, así como hasta un 54% de abortos si las madres estaban infectadas en una etapa temprana de la gestación. El número de larvas de las madres disminuyó continuamente, mientras que las larvas en la descendencia solo pudieron detectarse a partir del día 5 después del nacimiento con números que aumentaban gradualmente durante el resto del estudio. El tamaño de la camada de las madres infectadas en una etapa tardía de la gestación mostró diferencias significativas en comparación con el de los ratones no infectados, pero solo el 21% sufrió abortos (Reiterová *et*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

al., 2003). Estos hallazgos sobre la influencia de la infección en el tamaño de la camada respaldan un estudio anterior que demostró una disminución en el tamaño de la camada después de la infección (Akao *et al.,* 1990).

La gruesa cubierta de los huevos permite su supervivencia en el medio durante muchos años y les confiere resistencia a las duras condiciones ambientales en el suelo, al procesamiento químico al que se someten las aguas residuales y los lodos de alcantarillado (Azam *et al*., 2012). Los huevos son de color marrón y casi esféricos y tienen un tamaño de 75-90 micrómetros. Los huevos están embrionados cuando se eliminan con las heces y tienen cavidades en la superficie (Roberts y Janvory, 2000). La cubierta de los huevos de *T. canis* es está formada por cuatro capas similares a las de *Ascaris lumbricoides* (Foor *et al*., 1967). Constan de una capa lipídica interna, una capa quitinosa intermedia, una capa proteica y una capa externa que presenta cavidades similares a las de la mayoría de los áscaridos. Estas capas tienen como objetivo minimizar la pérdida de agua, por lo que su grosor varía en función del ascárido, según el entorno en el que vive. Por ejemplo, *T. pteropoides*, el ascárido de los zorros voladores de cabeza gris que viven en entornos tropicales en ramas de manglares, tiene una capa externa más gruesa que la de los huevos de *T. canis*, que se encuentran en el suelo y están menos expuestos a la desecación (Prociv *et al*., 1990).

Foor *et al*. (1967) describió que la división celular comenzaba después de 24 h de cultivo. Los intervalos de tiempo necesarios para la aparición de cada etapa de desarrollo de *T. canis* varían entre diferentes estudios, principalmente debido a variaciones en las temperaturas de incubación. La temperatura es un factor crucial que influye en la tasa de desarrollo de los huevos de *T. canis*, aumentando significativamente el desarrollo diario con la temperatura (O'Lorcain *et al*., 1995; Gamboa *et al*., 2005; Azam *et al*., 2012). Los estadios de desarrollo identificados fueron huevos con: una célula, dos células, tres células, cuatro células, mórula temprana, mórula tardía, blástula, gástrula, prelarva, L1, L2 y L3. Se producen en total dos mudas larvarias. Los huevos no viables presentaban citoplasma degenerado, cubierta delgada o colapsada, y las larvas no se movían después de la exposición a la luz. No se encontraron diferencias significativas entre las proporciones de huevos viables entre 5-21 días en comparación con la viabilidad de los huevos completamente maduros (30 días) (El-Naga, 2018) (Fig. 13).

Los huevos de *T. canis* se vuelven infecciosos entre 20 y 40 días a 22°C y con un 80% de humedad en el entorno (Cazapal-Monteiro *et al*., 2015). Éstos no alcanzan la embriogénesis completa ni ≥37°C ni por debajo de 11,8°C (Azam *et al*., 2012), y el porcentaje más alto de huevos larvados viables se obtienen después de la incubación a 28°C (De Savigny *et al*., 1975). Se han utilizado varias técnicas para evaluar la viabilidad de los huevos de *Toxocara* spp., incluyendo la capacidad infectante en animales, la precisión de la estructura morfológica durante la observación bajo un microscopio, cambios estructurales internos, inducción de la motilidad larval, uso de colorantes y técnicas de PCR (Sudhakar *et al*., 2013; Ghimire et al., 2019; Araújo *et al*., 2021). Para el tratamiento de aguas residuales y lodos de alcantarillado, tanto en el método estándar de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos como

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

en el recomendado por la Organización Mundial de la Salud, la viabilidad se determina según la presencia o ausencia de larvas dentro de los huevos (Ayres *et al*., 1996).

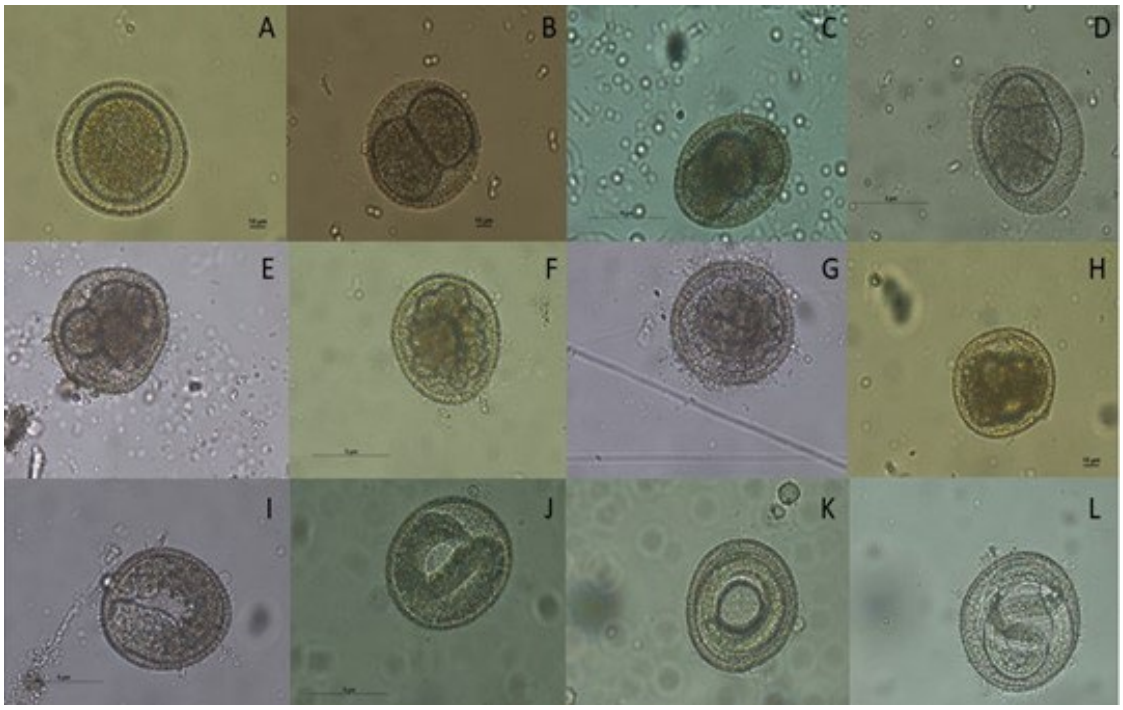


Fig. 13 Estadios de desarrollo de los huevos de *Toxocara canis*. A: una célula, B: dos células, C: tres células, D: cuatro células, E: mórula temprana, F: mórula tardía, G: blástula, H: gástrula, I: prelarva, J: L1, K: L2 y L: L3.

T. canis es un geohelminto zoonósico que causa toxocariosis. Las formas infectantes presentes en el suelo también pueden afectar a los humanos. Las infecciones por helmintos transmitidos por el suelo causadas por áscaris, como *T. canis*, *Ascaris suum*, *Toxascaris leonina*, y *Baylisascaris procyonis*, y tricúridos se transmiten a los humanos a través de la ingestión accidental de huevos que contienen una L2 en su interior (Cazapal-Monteiro *et al*., 2015). Los huevos de *T. canis* pueden ingresar al sistema de alcantarillado a través de inodoros o escorrentías pluviales y se ha demostrado que superan el tratamiento de aguas residuales municipales y permanecen viables. En consecuencia, existe un riesgo de transmisión de enfermedades si el lodo que contiene huevos parasitarios se utiliza en aplicaciones tópicas en el suelo (Fitzgerald *et al*., 1977). Las heces de perros infectados con parásitos que contienen huevos de *T. canis* en áreas públicas y su alta persistencia en el medio ambiente se consideran un problema de Salud Pública (Glickman y Magnaval, 1993). El desarrollo hasta el estadio infectante en el medio ambiente puede considerarse como una amenaza potencial para la Salud Pública. La identificación precisa de las etapas de desarrollo y la diferenciación clara entre huevos viables y no viables pueden ayudar a determinar una tasa de desarrollo basal precisa que podría utilizarse en estudios de compuestos ovicidas.

2.3.4. *Trichuris* spp.

Las infecciones por parásitos gastrointestinales son un problema mundial tanto para los agricultores a pequeña como a gran escala debido a la disponibilidad de una amplia gama de

USC UNIVERSIDADE

factores agroecológicos adecuados para diversos hospedadores y especies de parásitos. Las pérdidas económicas causadas por parásitos gastrointestinales se manifiestan de diversas maneras; causan pérdidas a través de la disminución de la fertilidad, la reducción de la capacidad de trabajo, una reducción en la ingesta de alimentos y menores ganancias de peso, el coste del tratamiento y la mortalidad en animales muy parasitados. Las relaciones hospedador-parásito en el caso de los nematodos provocan un daño en el lugar de fijación, lo que consecuentemente provoca pérdidas económicas (Padwal *et al*., 2011).

Las tricuriosis están causadas por *Trichuris* spp. que se localizan preferentemente en el ciego y la primera sección del colon (Rehbein *et al*., 1997). *T. trichiura*, el segundo helminto más común en los humanos es responsable de esta enfermedad parasitaria de distribución mundial, considerada como una Enfermedad Tropical Desatendida. La prevalencia es mayor en lugares con clima cálido y húmedo, con ausencia de servicios básicos de saneamiento. Entre el 30-80% de los casos se registran en niños, quienes sufren la mayor carga parasitaria y los síntomas más significativos (Mcdowell y Rafati, 2014).

2.3.5. Ciclo biológico de *Trichuris* spp.

La infección por este parásito ocurre después de la ingestión de huevos embrionados (con la L1 en el interior). Estos huevos pueden llegar a los hospedadores a través de las manos, alimentos, suelo y agua contaminada. Una vez ingeridos, eclosionan en el intestino, donde se liberan L1, que penetran la capa epitelial del intestino grueso y evolucionan hasta el estadio adulto. Finalmente, los huevos no embrionados son liberados por las hembras y salen al medio con las heces del hospedador (Fig. 14).

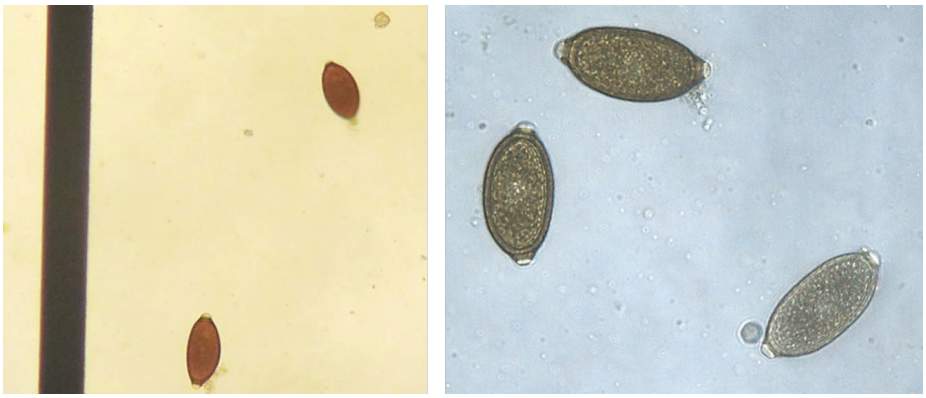


Fig. 14 Huevos de Trichuris spp.

2.3.6. Clasificación del género *Trichuris* spp.

Trichuris spp. son nematodos parásitos que pertenecen al phylum Nematoda, orden Trichurida, familia Trichuridae, y género *Trichuris* Gibbons (2010). Diferentes autores (Xie *et al*., 2018; Rivero *et al*., 2020) han informado previamente de la existencia de varios grupos de *T. trichiura*. Estos resultados enfatizan que la taxonomía y las variaciones genéticas de *Trichuris* son más complicadas de lo que se reconocía anteriormente (Xie *et al*., 2018). Ravasi *et al*. (2012) identificaron dos genotipos distintos de *Trichuris* que infectan tanto a humanos

USC UNIVERSIDADE DE COMPOSTELA

como a primates no humanos (PNH). Estos autores identificaron “heterocigotos”, confirmando la identificación de dos genotipos distintos de *Trichuris* en primates. Por otro lado, Nissen *et al*. (2012) identificaron parásitos "heterocigotos" aislados de humanos, sugiriendo que *T. trichiura* podría consistir en varias subespecies, algunas encontrándose principalmente en PNH. Ghai *et al*. (2014) sugirieron que el taxón *Trichuris* debería considerarse un patógeno multi-hospedador capaz de infectar tanto a primates salvajes como a humanos. Finalmente, Betson *et al*. (2015) informaron que el género *Trichuris* que infecta a primates representa un complejo de especies crípticas, algunas de ellas capaces de infectar tanto a humanos como a PNH.

2.3.7. Infección por *Trichuris* en los animales

La presencia de *Trichuris* spp. en primates no humanos es generalmente alta, y *Trichuris trichiura* infecta a todos los primates, incluidos los humanos (WHO, 2020). Las especies de primates no humanos que pueden ser infectadas incluyen macacos, monos verdes africanos, babuinos, monos ardilla y monos lanudos. Aunque una infección leve es asintomática, una infección severa produce signos clínicos como enteritis severa, anorexia, diarrea gris mucosa y, a veces, muerte (Mcdowell y Rafati, 2014). A nivel mundial, *T. trichiura* sigue siendo uno de los helmintos transmitidos por el suelo más importantes, además de *Ascaris lumbricoides* y los ancilostómidos (Wang *et al*., 2019).

En los rumiantes las especies de *Trichuris* son:

- *T. ovis* infecta principalmente a ovejas y cabras (Soulsby, 1982).
- *T. globulosa* es frecuente en bovinos, ovejas y cabras (Taylor *et al*., 2007).
- *T. skrjabini* se encuentra en ovejas y cabras (Urquhart *et al*., 1996).
- *T. discolor* afecta principalmente a bovinos y ocasionalmente a otros rumiantes (Georgi y Georgi, 1990).

En estos animales *T. ovis* es el más frecuentemente detectado, seguido por orden de *T. globulosa*, *T. skrjabini* y *T. discolor.*

La infección por este nematodo también se ha reportado en otros animales salvajes. Por ejemplo, se detectaron *Trichuris* spp. en muestras fecales (19,1%, 22/115) de babuinos sagrados árabes (*Pa. hamadryas arabicus*) que viven en áreas residenciales y no residenciales pobladas por humanos en la provincia de Asir, Arabia Saudita, en 1988 (Nasher, 1988) También se detectaron en heces de individuos de tres especies de monos colobos que vivían en libertad, incluyendo el colobo rojo en peligro de extinción (37,8%, 607/1.608, *Piliocolobus tephrosceles*), el colobo blanco y negro oriental (79,0%, 376/476, *C. guereza*) y el colobo blanco y negro de Angola (100%, 19/19, *C. angolensis*), en Uganda entre 1997 y 2003 (Cutillas *et al*., 2009). Además, se detectaron en muestras fecales (72,9%, 62/85) de babuinos en libertad (*Pa. cynocephalus* y *Pa. anubis*) en Kenia entre 1993 y 1995 (Knight, 1984). También se detectó *T. trichiura* en heces de primates no humanos en cautividad como babuinos olivos

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(71,9%, 120/167, *Pa. cynocephalus anubis*), grivets (50%, 25/50, *Cercopithecus aethiops*) y monos azules (56,1%, 55/98, *Ce. mitis*) en Kenia en 1998 (Nadler y De Leon, 2011).

La infección por *Trichuris* también se ha detectado en animales de zoológico. Por ejemplo, se detectaron *Trichuris* spp. en muestras fecales de babuinos (100%, 6/6, *Pa. cynocephalus*), lémures de cola anillada (100%, 6/6, *Lemur catta*) y camellos bactrianos (100%, 6/6, *Camelus bactrianus*) en dos jardines zoológicos italianos en 2007 (Betson *et al*., 2015). Además, se identificaron en heces de babuinos (75%, 3/4) y pavos reales (100%, 2/2) en el jardín zoológico de Nekede, Nigeria, en 2010 (Rivero *et al*., 2020). Igualmente se detectaron en muestras fecales de macacos crestados de Célebes (20%, 2/10, *Macaca nigra*), babuinos hamadryas (15,7%, 16/102, *Pa. hamadryas*), el mono de Hamlyn (2,9%, 1/35, *Ce. hamlyni*) y el gibón crestado negro (33,3%, 1/3, *Hylobates concolor*) en cuatro jardines zoológicos de Bélgica entre 2004 y 2006 (Liu *et al*., 2014). Asimismo, en 2013 en tres dromedarios (*Ca. dromedarius*) en el zoológico de Seúl (Corea) (Ghai *et al*., 2014).

2.3.8. Zoonosis causadas por *Trichuris*

La relación entre *Trichuris* presentes en humanos y primates no humanos (PNH) en términos de aspectos genéticos y evolutivos se entiende poco. En los últimos años, algunas publicaciones abordaron la cuestión de si las especies de *Trichuris* se comparten entre humanos y PNH o si existen diferentes especies. Es probable que el género *Trichuris* sea un candidato para albergar especies crípticas, ya que tiene una amplia distribución geográfica y afecta a varias especies de hospedadores (Nadler y De Leon, 2011). Como revelan estudios recientes, hay más de un taxón capaz de infectar a humanos y a otros primates, incluidos individuos en cautividad, lo que sugiere que *T. trichiura* debería considerarse una especie compleja que incluye diferentes unidades crípticas (Hawash *et al*., 2015; Rivero *et al*., 2020). Además, basándose en parámetros morfo-biométricos y moleculares, se han descrito nuevas especies de *Trichuris* en primates, como *Trichuris rhinopiptheroxella* (Wang *et al*., 2019) que se encontró en el mono dorado de nariz chata (*Rhinopithecus roxellana*), *Trichuris colobae* detectado en *Colobus guereza kikuyuensis* (Cutillas *et al*., 2014) y *Trichuris ursinus* en *Papio ursinus* (Callejón *et al*., 2017). Por lo tanto, estos estudios confirmaron que *T. trichiura* no es el único "gusano látigo" encontrado en primates.

Hasta la fecha, los tricúridos aislados de humanos y otros primates se han considerado tradicionalmente como *T. trichiura* (Ravasi *et al*., 2012; Betson *et al*., 2015), mientras que los recuperados de cerdos y jabalíes se conocen como *Trichuris suis* (Ooi *et al*., 1993; Cutillas *et al*., 2009). Es bien sabido que la diferenciación entre especies estrechamente relacionadas de *Trichuris* es muy difícil debido a la plasticidad fenotípica de los propios organismos; la variación inducida por el hospedador, la escasez de características morfológicas y las características morfológicas superpuestas que ocurren entre especies (Knight, 1984). Así, muchos estudios sobre *Trichuris* se han centrado en la diferenciación morfológica y molecular de *T. trichiura* y *T. suis*, que son molecularmente diferentes, pero morfológicamente similares (Cutillas *et al*., 2009; Liu *et al*., 2012; Nissen *et al*., 2012).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Actualmente, la sistemática del género *Trichuris* presenta brechas significativas. Esto se debe a dos razones principales: (i) la falta de datos morfo-biométricos comparativos mediante el uso de múltiples parámetros y pruebas estadísticas aplicadas al estudio taxonómico de estas especies y (ii) la escasez de investigaciones publicadas sobre la genética de las diferentes especies de *Trichuris* en humanos, PNH y cerdos. Hasta la fecha, los investigadores aún no han logrado establecer de manera definitiva el grado de divergencia entre las diferentes líneas genéticas que parecen existir en las especies de *Trichuris* que parasitan a estos hospedadores.

En concreto, la utilización de tratamientos antiparasitarios efectivos ha ayudado a mantener a los primates no humanos en parques zoológicos (Mcdowell y Rafati, 2014). Sin embargo, desde la perspectiva de las zoonosis, un estudio previo mostró que las muestras fecales de cuatro de los 54 cuidadores de animales encargados de PNH en cinco zoológicos de Bélgica eliminaban huevos de *T. trichiura* (Liu *et al*., 2014). El diseño de los recintos y las áreas de retención de los animales debe prevenir la transmisión de enfermedades entre humanos y PNH, mediante el uso de vidrio u otras separaciones físicas. Además, los protocolos de manejo y cuidado deben mejorarse para garantizar la salud y la seguridad tanto de los humanos como de los PNH (Mcdowell y Rafati, 2014).

2.3.9. Respuesta del hospedador frente al parásito

La mayor eliminación de huevos de T*richuris* ocurre en invierno más que en verano (Saha *et al.*, 1996; Gul y Tak, 2016). La alta incidencia de infecciones parasitarias durante el invierno se atribuye a las condiciones climáticas adecuadas y a la disponibilidad de alimentos, es decir, pastos, durante su desarrollo (Padwal *et al.* 2011). Umur (2005) informó que la elevada tasa de infección que ocurre en invierno se debe a los huevos eliminados por ovejas que pastaron a finales de octubre y septiembre. Además, diversos autores señalaron la mayor prevalencia en hembras en comparación con los machos (Asanji y Williams, 1984; Pal y Qayyum, 1992; Patel *et al.*, 2001; Raza *et al*., 2007; Saiful Islam y Taimur, 2008; Gul y Tak, 2016), debido a sus peculiaridades fisiológicas, como el periparto y la lactación. Estos factores constituyen factores de estrés, que actúan reduciendo la inmunidad frente a las infecciones, lo que las hace más susceptibles. (Blood y Radostits 2000; Kuchai *et al.* 2011). Infecciones previas y la edad del hospedador proporcionan protección eficaz contra la reinfección (Soulsby, 1986). Asimismo, Gul y Tak (2016) informaron que las cabras eran más propensas a la infección por *Trichuris* que las ovejas. Se podría asumir que las ovejas tienen una respuesta inmunitaria considerablemente mayor a los parásitos gastrointestinales en comparación con las cabras (Urquhart *et al*. 1996).

2.3.10. Resistencia del parásito frente a los antihelmínticos

Los benzimidazoles (BZ) constituyen un grupo de antihelmínticos de amplio espectro que son extensamente utilizados tanto en animales como en humanos contra infecciones parasitarias, entre ellas, los nematodos gastrointestinales. Desde la introducción de los BZ con el lanzamiento de tiabendazol (TBZ) en la década de 1960, se ha observado que las infecciones por *Trichuris* spp., localizadas en el intestino grueso, son notoriamente difíciles de tratar con este grupo de medicamentos (Hebden, 1961; Rossignol y Maisonneuve, 1984). Ensayos

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

controlados en rumiantes y animales monogástricos han mostrado baja eficacia tanto con pautas de dosis única como múltiples utilizando pro-BZ como netobimin y febantel y los BZ tiabendazol (TBZ), fenbendazol (FBZ) y mebendazol (MBD) (Hebden, 1961; Marti *et al*., 1978; Richards *et al*., 1987; Lyons *et al*., 1988; Miro *et al*., 2007). También en humanos la infección por *T. trichiura* es difícil de tratar. Se han observado bajas tasas de curación con una dosis única de MBD y albendazol (ALB) (Albonico *et al*., 2003; Belizario *et al*., 2003; Keiser y Utzinger, 2008; Olsen *et al*., 2009; Knopp *et al*., 2010; Vercruysse *et al*., 2011).

2.4. CONTROL BIOLÓGICO

El control biológico (CB) se define como un método ecológico creado por el ser humano para reducir una plaga o una población parasitaria hasta niveles subclínicos aceptables, o para mantener una población en un nivel no dañino utilizando antagonistas naturales (Grønvold *et al*., 1996). La utilización de estos antagonistas naturales para especies no deseadas ha desembocado en resultados positivos en el control de ciertas plagas agrícolas (Albajes y Alomar, 1999; Wratten *et al*., 2003). Este enfoque no es aplicable a las fases parasitarias que residen en el organismo del hospedador definitivo; sin embargo, es factible intervenir en vectores, ciertos hospedadores intermediarios y paraténicos, así como en estadios parasitarios presentes en el entorno. Las resistencias emergentes a antimicrobianos, antiprotozoarios y a los productos químicos utilizados para controlar plagas de artrópodos y helmintos nos alertan sobre la capacidad de adaptación de los organismos asociados a las enfermedades tanto en humanos como en animales. Dado que estas resistencias pueden surgir a través de mutaciones puntuales o, como ocurre en muchas especies de helmintos, como un fenómeno pre-adaptativo, la emergencia de poblaciones resistentes parece ser una consecuencia inevitable del intenso uso de fármacos (Jackson y Coop, 2000). En concordancia con las observaciones de Waller (1997), en las últimas décadas se han realizado investigaciones intensivas sobre métodos alternativos de control parasitario. Estos incluyen el control de pastizales, el desarrollo de vacunas, la selección genética de hospedadores definitivos con cierta resistencia a las formas parasitarias y el control biológico del entorno. Este último enfoque cobra relevancia en el control de zoonosis causadas por helmintos transmitidos a través del suelo, ya que en el entorno existen ciertas especies de hongos saprófitos con capacidad nematófaga.

Aunque sea posible administrar antihelmínticos a todos los animales y todos los helmintos sean susceptibles a ellos, el tratamiento puede no ser completamente eficaz, lo que puede dar lugar al desarrollo de resistencia. La resistencia se define según la Asociación Mundial para el Avance de la Parasitología Veterinaria (WAAVP) como la capacidad de una población de parásitos para sobrevivir a dosis de fármacos que normalmente eliminarían a todos los individuos de la misma especie y etapa, y transmitir esa capacidad a la descendencia (heredable) (EMA, 2013a,b). Además, la administración profiláctica de tratamiento antiparasitario puede prevenir el desarrollo de una respuesta inmunitaria efectiva por parte del hospedador frente a los parásitos con los que está en contacto de manera frecuente. Aunque hay pocas evidencias de resistencia a los antihelmínticos en animales de compañía, se ha demostrado la resistencia de *Ancylostoma caninum* al tratamiento con pirantel (Kopp, *et al*., 2007). Los tratamientos convencionales se enfocan en eliminar las formas parasitarias del

hospedador, pero las que quedan en el medio ambiente después de ser expulsadas en las heces del animal siguen siendo viables. Esto significa que los efectos deseables de estos tratamientos suelen ser temporales, especialmente cuando los animales están expuestos a las principales fuentes de infección, como el suelo, la vegetación o las heces de otros animales.

2.4.1. Control biológico mediante derivados de plantas

Ciertos extractos naturales de plantas se han administrado durante mucho tiempo como desparasitantes para el ganado, incluso cuando la base científica no es concluyente y la mayoría de los compuestos activos siguen siendo desconocidos (Githiori *et al*., 2005). A los taninos condensados (TC) se les atribuye la principal actividad antihelmíntica, probablemente desarrollada por alcaloides, terpenoides o polifenoles. Estos derivados de plantas pueden obtenerse de leguminosas forrajeras, árboles y arbustos recolectados en zonas templadas y tropicales, y algunos de ellos desarrollan otras actividades como propiedades antioxidantes o antiinflamatorias (Martínez-Micaelo *et al*., 2012). Entre las especies más comunes se encuentran el trébol de cuernos (*Lotus corniculatus*), la esparceta común (*Onobrychis viciifolia*), el quebracho colorado chaqueño (*Schinopsis balansae*) o la acacia dorada (*Acacia pycnantha*) (Ávila *et al*., 2020). Un enfoque interesante consiste en sembrar pastizales con plantas leguminosas como el jumbay (*Leucaena leucocephala*), la acacia negra (*Acacia mearnsii*) o el neem (*Azadirachta indica*) (Chandrawathani *et al*., 2006).

Se han asociado varios efectos nocivos sobre la ingesta de alimentos, los microorganismos del rumen, la utilización de nutrientes y el rendimiento productivo del ganado rumiante a la ingestión de concentraciones elevadas de taninos (Henke *et al*., 2017). Fidgett *et al*. (2003) señalaron que la inclusión de taninos es prohibitiva debido a su costo, e incluso a consideraciones ecológicas si se proporciona quebracho.

La familia Leguminosae se caracteriza por un notable contenido de saponinas, sustancias capaces de provocar cambios en la permeabilidad celular, lo que conduce a la formación de agregados tipo micela. En consecuencia, la membrana se rompe, lo que resulta en la muerte de nematodos (Doligalska *et al*., 2011). El género *Medicago* representa una importante fuente de saponinas bioactivas, involucrando varios cultivos forrajeros como la alfalfa (*Medicago sativa*) y el carretón (*M. polymorpha*) (Piano *et al*., 2010). Se ha demostrado que las saponinas de especies de *Medicago* pueden ejercer diferentes roles biológicos como hemolíticos, antimicrobianos, insecticidas o antihelmínticos contra algunos nematodos de plantas (Avato *et al*., 2006, 2017; D'Addabbo *et al*., 2011; Vo *et al*., 2017).

Se ha recomendado el uso de diferentes hierbas como el ajo (*Allium sativum*), la calabaza (*Cucurbita pepo*), el tomillo (*Thymus vulgaris*) o la artemisa (*Artemisia vulgaris*) contra nematodos que infectan al ganado en regímenes orgánicos (Costa *et al*., 2008; El Shenawy *et al*., 2008; Burke *et al*., 2009).

2.4.2. Control biológico mediante bacterias y virus

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

El uso de *Bacillus thuringiensis* para el control parasitario de nematodos gastrointestinales en animales en pastoreo ha sido estudiado durante algunos años, debido a su capacidad para eliminar las etapas juveniles y adultas, basado en la producción de una serie de cristales que se solubilizan cuando son digeridos por los nematodos y dan lugar a protoxinas, las cuales alteran su membrana intestinal (Hernández Linares *et al*., 2008; Jouzani *et al*., 2008). Los *Baculovirus* son el grupo de virus más utilizado para el control biológico, con características muy diferentes de las que infectan a los vertebrados, y también son muy seguros para su propagación (Myers y Cory, 2016).

2.4.3. Control biológico mediante hongos telúricos

Una opción que ha sido objeto de estudios en los últimos años es el uso de hongos nematófagos para combatir las formas parasitarias infectantes que se encuentran libres en el ambiente. Este enfoque forma parte de lo que se conoce como control biológico. Los hongos constituyen un grupo diverso de organismos con nutrición heterótrofa, lo que significa que no poseen un aparato digestivo interno. Por lo tanto, dependen de la digestión externa de nutrientes mediante la liberación de enzimas capaces de descomponer la materia orgánica en moléculas que luego son absorbidas. La mayoría de los hongos son saprófitos, lo que significa que se alimentan de restos de materia orgánica del entorno. Sin embargo, en el caso de los hongos nematófagos, también pueden actuar como depredadores de las formas parasitarias (Cazapal-Monteiro, 2016). Estas especies forman parte del microbiota normal del suelo, lo que demuestra su capacidad para sobrevivir en condiciones ambientales adversas. Su crecimiento y supervivencia están influenciados por factores externos como la humedad temperatura pH, disponibilidad de oxígeno y la exposición a la luz directa (Sagüés *et al*., 2011).

El hecho de poder aislar estos hongos directamente del suelo y de diferentes hábitats, así como de las heces, sugiere que en condiciones naturales son ingeridos y eliminados en las heces sin alteraciones. Esta capacidad es esencial para lograr beneficios prácticos en su uso como agentes de control biológico, ya que pueden sobrevivir al pasar por el tracto digestivo, desarrollarse en las heces y mantener su capacidad depredadora intacta (Larsen *et al*., 1995; Gómez Rincón, 2006). Para que estos organismos eucariotas sean adecuados para su uso en el control biológico, Baudena *et al*. (2000) identificaron una serie de características que deben poseer:

- Seguridad para el medio ambiente, seres humanos y animales.
- Capacidad de reproducción a nivel industrial.
- Viabilidad en formulaciones comerciales.
- Estabilidad durante largos periodos de tiempo.
- Eficacia en el control de parásitos.
- Costo accesible y fácil administración.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Se ha realizado poca investigación sobre la utilidad de los hongos depredadores (ovicidas) contra los huevos de trematodos, cestodos o ascáridos, siendo la mayoría de los estudios centrados en *Pochonia chlamydosporia* (Silva *et al*., 2010; Madeira de Carvalho *et al*., 2012). Investigaciones recientes han demostrado la capacidad de *Mucor circinelloides* para destruir los huevos de *Fasciola hepatica* y *Parascaris equorum* en las heces de animales infectados (Arroyo *et al*., 2016).

Se han probado diferentes formulaciones fúngicas que consisten en suspensiones orales y suplementos alimenticios (Terrill *et al*., 2004; Waller *et al*., 2006; Ojeda-Robertos *et al*., 2008; Sagüés *et al*., 2011). Bajo condiciones de laboratorio, se ha introducido micelio en pellets de alginato para facilitar la administración de esporas de *D. flagrans* o *M. thaumassium* al ganado en regiones tropicales y templadas (Braga *et al*., 2009; Tavela *et al*., 2013).

Se ha planteado la posibilidad de que la introducción de grandes cantidades de estos hongos en el ambiente pueda provocar un desplazamiento de la microflora y mesofauna del medio, lo que podría causar un desequilibrio en los ecosistemas. Sin embargo, en el caso específico de *D. flagrans*, se ha comprobado que no afecta a la población de hongos presentes en el suelo ni a los nematodos de vida libre o microartrópodos (Saumell *et al*., 2016). Además, su efecto desaparece o disminuye con el tiempo debido a factores ambientales y a la redistribución de las esporas en profundidad, provocada por la acción de la lluvia u otros microorganismos (Knox *et al*., 2002).

También se ha demostrado la falta de efectos adversos sobre los animales que consumen estos hongos. Un estudio realizado por Hernández *et al*. (2016) en caballos mostró que no desarrollaron una respuesta inmunitaria frente a las esporas de *M. circinelloides* y *D. flagrans*, las cuales se incorporaron durante la fabricación industrial de pellets nutricionales.

En su actividad, los hongos nematófagos combinan tanto una acción mecánica como química, mediante la intervención de diversos productos como toxinas o enzimas hidrolíticas. La acción mecánica se lleva a cabo a través de una red de hifas y trampas (larvicidas), así como mediante el apresorio o *appresorium* (ovicidas), una estructura desarrollada en el extremo de algunas hifas cuando intentan penetrar la cubierta de los huevos de ciertos parásitos. Según su mecanismo de acción frente a los nematodos, los hongos nematófagos se pueden clasificar como atrapa-nematodos, endoparásitos, ovicidas y productores de toxinas:

-**Hongos atrapa-nematodos**, también conocidos como depredadores, son hongos capaces de desarrollar una serie de trampas en sus hifas. Estas trampas, como anillos, terminaciones adherentes, redes y columnas de hifas adhesivas atrapan larvas de nematodos cuando la disponibilidad de nutrientes es limitada. Se pueden subdividir en dos categorías según su actividad parasítica:

1- Hongos no formadores espontáneos de trampas, que son principalmente saprófitos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2- Hongos formadores de trampas, que dependen en mayor medida de la presencia de nematodos para su supervivencia (Cazapal-Monteiro *et al*., 2015).

-**Hongos endoparásitos**, utilizan las esporas para infectar a los nematodos. Tienen una nutrición saprófita limitada, lo que significa que dependen en gran medida de la presencia de nematodos para sobrevivir (Li *et al*., 2015).

-**Hongos ovicidas** se caracterizan por desarrollar estructuras especializadas en la penetración del huevo, como el haustorio y el apresorio. Se pueden clasificar en tres grupos o grados según su modo de acción:

*Tipo I: los metabolitos del hongo inhiben el desarrollo embrionario sin afectar la morfología del huevo ni del embrión. Este proceso se conoce como ovistasis (Ciarmela *et al*., 2002).

*Tipo II: los metabolitos del hongo pueden destruir la cubierta externa del huevo, lo que afecta la supervivencia del embrión al modificar la permeabilidad del huevo. Si el embrión no resulta dañado directamente, puede ser destruido por sustancias del entorno externo que pueden difundirse libremente al interior del huevo tras el daño en la cubierta (Hernández *et al*., 2017).

*Tipo III: las hifas del hongo penetran en el interior del huevo y lo destruyen prácticamente por completo en una secuencia de cinco fases: contacto, adherencia, penetración, consumo del contenido y liberación del micelio fúngico al exterior (Flament Simon, 2015).

- **Hongos productores de toxinas**, emplean diferentes productos para inmovilizar las larvas de nematodos antes de penetrar con sus hifas la cutícula (Li *et al*., 2015).

Freiría (2020) destacó el efecto ovicida del hongo *M. circinelloides* frente a una variedad de parásitos, incluyendo *F. hepatica*, *Calicophoron daubneyi*, *Ascaris suum*, *Toxocara canis*, *Toxascaris leonina*, *Toxocara vitulorum*, *Trichuris* spp., *Ixodes scapularis* y *Rhipicephalus sanguineus*. Además, *Trichoderma* spp. exhibe un efecto antagonista frente a huevos de los nematodos ascáridos *Baylisascaris procyonis* y *T. canis* (Tabla 11).

En cuanto a los hongos con actividad antiparasitaria, se han identificado diversos mecanismos de acción. Específicamente, los hongos telúricos microscópicos como *M. circinelloides* y *Trichoderma atrobrunneum* ejercen una acción física significativa al adherirse a la cubierta del huevo del parásito mediante un órgano llamado apresorio, ubicado en el extremo de algunas de sus hifas, y luego penetran y destruyen el huevo (Hernández *et al*., 2018).

En un estudio realizado por Cruz *et al*. (2015), se utilizaron esporas de *M. circinelloides*, *D. flagrans* y *Pochonia* spp. contra ooquistes del género *Eimeria* spp. (en ungulados silvestres), huevos de *Toxocara canis* (en perros) y larvas (L3) de *Oesophagostomum* spp. (en jabalíes), lo que resultó en una reducción de la viabilidad del 52-66% de los ooquistes, del 37% de los huevos y del 53-83% de las L3.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Por otro lado, Arroyo *et al*. (2016) señalaron que las esporas de *M. circinelloides* pueden distribuirse mediante pulverización sobre pastos o en mezcla con el concentrado de los animales. Posteriormente, Arroyo (2017) demostró la resistencia de estas esporas a diferentes condiciones de temperatura y tiempo, concluyendo que podrían sobrevivir al proceso de fabricación industrial de piensos peletizados y seguir conservando sus propiedades biológicas y antiparasitarias.

Autores	Helminto	Muestra	Hongo	% Eficacia
Gortari *et al*. (2008)	*T. canis*	Análisis en placa	*Paecylomyces lilacinus*	63-66
Araujo *et al.* (2009)	*D. caninum*		*P. chlamydosporia*	19,6-49,2
Silva *et al*. (2010)	*T. vulpis*			29,5-94,8
Ferreira *et al*. (2010)	*A. suum*			58
Dias *et al*. (2012)	*F. hepatica*			28-43
Araujo *et al.* (2012)	*T. canis*	Heces de perro		28,6-37,2
Arias *et al*. (2013)			*M. circinelloides*	66
Dias *et al*. (2013)	*F. hepatica*	Heces de terneras	*P. chlamydosporia*	67
Cazapal-Monteiro *et al*. (2015)	*B. procyonis*	Heces de mapache y coatí	*M. circinelloides* *Paecilomyces* sp.	53-69 45-62
Cortiñas *et al*. (2015)	*A. suum* *F. hepatica*	Heces de cerdo y terneras	*M. circinelloides*	67-74

Tabla 11 Porcentajes de eficacia frente a huevos de helmintos obtenidos en diferentes estudios realizados con hongos ovicidas.

Además, según Mesa-Vanegas *et al*. (2019), el género *Trichoderma* representa un recurso con múltiples aplicaciones biotecnológicas agrícolas. La más importante es su capacidad para inhibir el crecimiento, la esporulación y la germinación de esporas de hongos patógenos. Esto lo convierte en un enfoque prometedor para el descubrimiento de nuevos agentes de control basados en alternativas agroecológicas en el manejo integrado de hongos, bacterias, parásitos e insectos.

La capacidad de combinar especies de hongos nematófagos con diferentes actividades permite abordar la diversidad de formas parasitarias infectivas en el ambiente. En el caso de *D. flagrans* y *M. circinelloides*, Arias *et al*. (2013b) demostraron que pueden crecer juntos en el mismo medio de cultivo sin afectar su capacidad de crecimiento y su actividad parasiticida,

larvicida y ovicida respectivamente. Además, se han observado ventajas al combinar diferentes especies de hongos en el control biológico, ya sea enfrentando larvas y huevos, o utilizando diferentes especies con el mismo propósito (Tavela *et al*., 2012; Hernández *et al*., 2016, 2018; Fernandes *et al*., 2017; Silveira *et al*., 2017a, b).

Una cuestión importante se refiere al modo de distribución de estos hongos en el medio. Dado que se reproducen principalmente en medios líquidos, por el tipo de ventajas que ofrecen sobre los sólidos (homogeneidad de la distribución de nutrientes en el medio), la administración directa en el medio por aspersión o pulverización sería fácil de implementar; sin embargo, se pierden una gran cantidad de esporas por escurrimiento además de no conseguir una distribución uniforme, lo cual reduce su precisión. El descubrimiento de la capacidad de *D. flagrans* y *M. circinelloides* de sobrevivir al paso por el tracto gastrointestinal de diferentes especies abrió la posibilidad de incorporar sus esporas en el alimento, garantizando la presencia del hongo directamente en las heces, y por lo tanto el contacto directo con las formas parasitarias eliminadas por los animales infectados.

Entre las diversas formas de administración de hongos nematófagos se incluye la incorporación de medio líquido directamente sobre el alimento, conocida como premezcla alimentaria (Carvalho *et al*., 2009a; Carvalho *et al*., 2009b; Arias *et al*., 2013a; Cortiñas *et al*., 2015; Arroyo *et al*., 2016), así como la utilización de preparados comerciales como concentrados alimentarios (Hernández *et al*., 2016; Silveira *et al*., 2017a; Arroyo Balán, 2017; Fernandes *et al*., 2017; Vilela *et al*., 2018) o liofilizados (Carvalho *et al*., 2011), entre otros métodos. Estos estudios demuestran la capacidad de resistencia de las esporas a procesos como la peletización o la liofilización. Tales procedimientos son altamente beneficiosos para la aplicación de hongos como método de control alternativo, ya que facilitan su administración a los animales (Arroyo *et al*., 2016; Hernández *et al*., 2016). Una ventaja adicional es la capacidad de producir esporas a gran escala y almacenarlas durante períodos prolongados sin afectar su viabilidad, lo que facilita su manipulación, transporte y almacenamiento (Berny y Hennebert, 1991; Carvalho *et al*., 2011).

2.4.3.1. Duddingtonia flagrans

Esta especie presenta actividad larvicida y se caracteriza por la producción de formas de latencia conocidas como clamidosporas. Estas clamidosporas tienen paredes gruesas que las hacen altamente resistentes y capaces de sobrevivir al paso por el tracto gastrointestinal de diversas especies, incluyendo caballos (Tavela *et al*., 2012; Arias *et al*., 2013a; Hernández *et al*., 2016; Buzatti *et al*., 2017), cerdos (Cortiñas *et al*., 2015), rumiantes (Mendoza de Gives *et al*., 2006; Ojeda-Robertos *et al*., 2008; Fernandes *et al*., 2017), y también perros (Carvalho *et al*., 2009a). *D. flagrans* puede ser identificado con relativa facilidad gracias a la producción de diversos conidios en los extremos de los conidióforos, así como numerosas clamidosporas intercaladas en las hifas vegetativas (Van Oorschot, 1985; Scholler *et al*., 1999). Estas clamidosporas son esporas con paredes gruesas y una morfología ovoide o elíptica, con un tamaño aproximado de 25-50 µm de largo por 10-15 µm de ancho (Fig. 14). Las hifas se desarrollan y se fusionan, formando redes tridimensionales que atrapan las larvas de los

nematodos y finalmente las digieren (Fig. 15) (Larsen y Roepstorff, 1999; Gómez-Rincón *et al*., 2006; Mendoza de Gives *et al*., 2006).

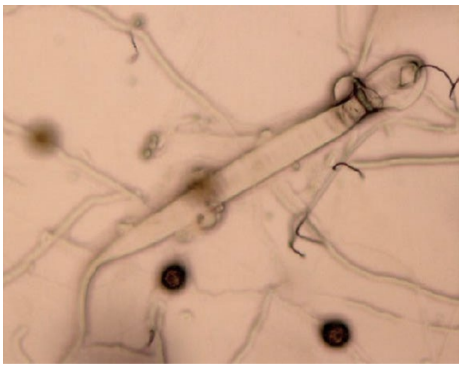


Fig. 16 Larva de nematodo atrapada por *D. flagrans*

El mecanismo de acción de *D. flagrans* implica la formación de una red tridimensional de hifas en respuesta a estímulos ambientales, químicos y físicos (López-Llorca *et al*., 2008). En esta red, las larvas quedan retenidas e inmovilizadas para luego ser destruidas mediante una combinación de efectos mecánicos y químicos. Las hifas de *D. flagrans* ejercen presión sobre la cutícula de L3 (Fig. 16) y mediante la acción de diversas enzimas, son capaces de degradarla hasta penetrar en el interior del nematodo y digerir su contenido. Estas enzimas tienen la capacidad de degradar péptidos, proteínas, almidón, pectinas, lecitina, lípidos y otros compuestos (Meyer y Wiebe, 2003).

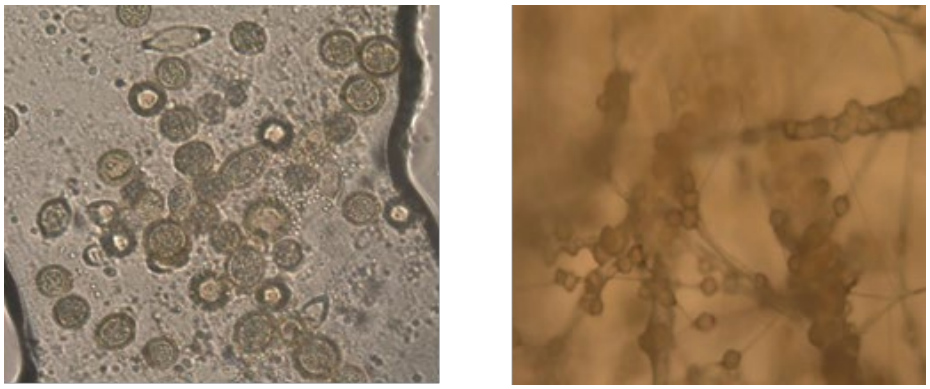


Fig. 15 Clamidosporas e hifas de D. flagrans

Uno de los principales factores que afecta al crecimiento de *D. flagrans* en el medio es la temperatura. Según Grønvold *et al.* (1996) y Paz-Silva *et al*. (2011), su desarrollo óptimo se produce en un rango de temperatura entre 10°C y 30°C, mientras que la formación de esporas ocurre en torno a los 25-28°C. Además de la temperatura, el crecimiento de *D. flagrans* también está influenciado por la disponibilidad de nutrientes, especialmente nitrógeno y carbono. Se ha observado que el crecimiento y la formación de trampas por parte de *D. flagrans* se estimulan cuando hay una limitación de estos nutrientes o después de un período de inanición. En estas condiciones, se establece una relación entre la cantidad de larvas capturadas y la cantidad de

clamidosporas formadas (Anan'ko y Teplyakova, 2011). Sin embargo, algunos investigadores argumentan que el crecimiento en un medio rico en nutrientes facilita el desarrollo de las hifas y el micelio del hongo, así como la formación de clamidosporas, hasta alcanzar una concentración máxima de nutrientes a partir de la cual el efecto es contrario (Araujo *et al*., 2013). En cualquier caso, la formación de trampas y nuevas clamidosporas responde a la presencia del nematodo o sus metabolitos en el ambiente. Aunque también se puede lograr el mismo efecto con trematodos, la cantidad de clamidosporas formadas en estos casos suele ser menor (Arias *et al*., 2013a).

El efecto larvicida de este hongo ha sido objeto de estudio en varios trabajos. Por ejemplo, Arias *et al.* (2013b) observaron una reducción del 96% en el recuento de L3 de ciatostominos expuestas a clamidosporas de *D. flagrans*. Fernandes *et al*. (2017) evaluaron la eficacia de la combinación de *D. flagrans* con *Arthrobotrys robusta* y *P. chlamydosporia* en rumiantes, logrando una reducción del 94% en las larvas L3 de nematodos gastrointestinales. Además, Maciel *et al.*, (2010) y Kramer de Mello *et al*. (2014) demostraron una reducción del 63% y 73,2%, respectivamente, en larvas L3 de ancilostómidos al añadir clamidosporas de *D. flagrans* a 1000 huevos de *Ancylostoma* spp. Otra forma de evaluar la actividad de *D. flagrans* es mediante la FECR (Fecal Egg Count Reduction), que refleja el grado de parasitación del animal. Hernández *et al*. (2016) observaron una reducción en el recuento de huevos después de la administración oral de pellets con esporas de *M. circinelloides* y *D. flagrans*, pasando de 773 a 247 HPG en comparación con el grupo tratado solo con antihelmínticos.

Por otro lado, Vilela *et al*. (2018) demostraron una reducción en los recuentos fecales de huevos de 2500 a 480 HGP con *D. flagrans* en ovejas. Fernandes *et al*. (2017) lograron una reducción del 91,8% en la eliminación de huevos de nematodos gastrointestinales en rumiantes al administrar oralmente una mezcla de los hongos *D. flagrans*, *A. robusta* y *P. chlamydosporia*.

2.4.3.2. Mucor circinelloides

Este hongo exhibe actividad ovicida mediante la formación de una estructura especializada conocida como apresorio, que se desarrolla después del reconocimiento y la unión de las hifas a la superficie del huevo, lo que sugiere una respuesta a estímulos sensoriales (López-Llorca *et al*., 2002). El apresorio facilita la penetración del huevo a través de un mecanismo dual que implica fuerza mecánica y actividad enzimática (Fig. 17)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La cubierta de los huevos de nematodos, compuesta principalmente por proteína y quitina, es el principal objetivo de la actividad enzimática fúngica, llevada a cabo

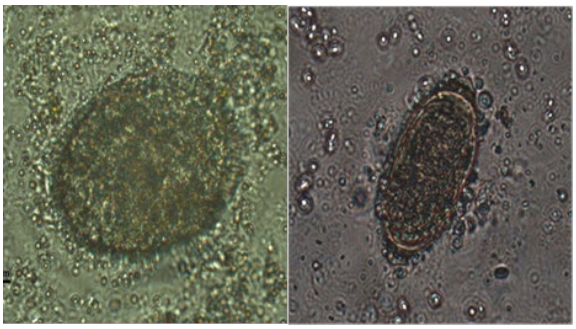


Fig. 18 *M.circinelloides* colonizando las cubiertas de huevos.

principalmente por proteasas y quitinasas (Blaszkowska *et al*., 2013; Li *et al*., 2015). Al concentrar la actividad del apresorio en el área de contacto con el huevo, se maximiza tanto la fuerza mecánica como la degradación enzimática, facilitando la penetración del hongo (Fig. 18).

En el mecanismo de acción de los hongos ovicidas, como *M. circinelloides*, se pueden identificar cuatro fases distintas: contacto, adhesión, penetración y liberación. Cuando las esporas del hongo detectan la presencia de huevos de nematodos cercanos, comienzan a desarrollarse y forman una red densa alrededor de los huevos (Irving y Kerry, 1986). En el extremo de algunas hifas laterales, se forma una modificación corta que da origen a un órgano de fijación específico llamado apresorio, mediante el cual el hongo se adhiere a la superficie más perpendicular de la cubierta del huevo (Brunori *et al.*, 1985). Una vez que ha penetrado, el hongo continúa su crecimiento y comienza a ramificarse dentro del huevo, absorbiendo su contenido interno. El hongo rodea al embrión con una densa red de hifas y finalmente lo destruyen. Cuando ya no quedan nutrientes, el hongo consume los restos de las cubiertas, lo que da lugar a la liberación. Durante esta fase, el hongo regresa al espacio externo entre los huevos y las hifas individuales pueden colonizar otros huevos nuevamente (Lýsek y Stërba, 1991).

Los hongos con alta actividad ovicida, especialmente aquellos clasificados como tipo III, tienen la capacidad de modificar morfológicamente tanto el huevo como el embrión, además de penetrar con sus hifas y colonizar el interior del huevo. Esto los convierte en candidatos prometedores para destruir los huevos de parásitos en el ambiente, ya que su eficacia se extiende no solo a los huevos de nematodos, sino también a los de trematodos o garrapatas (Arroyo *et al*., 2017; Habeeb *et al*., 2017).

La eficacia de *M. circinelloides* puede evaluarse mediante el estudio de las alteraciones que provoca en los huevos de los parásitos, lo que resulta en la pérdida de su viabilidad,

USC
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

conocido como efecto lítico de tipo III. Hernández *et al*. (2018) observaron una reducción del 58% en la viabilidad de *T. leonina* y del 50% en *Trichuris* sp. al pulverizar directamente las esporas del hongo sobre las heces de animales parasitados. Resultados similares se obtuvieron en estudios realizados por Rodríguez Gascón *et al*. (2017) y Saavedra López (2017) , quienes reportaron una reducción del 50% en la viabilidad de *Trichuris* sp. al pulverizar las esporas del hongo sobre heces de gacelas y dromedarios mantenidos en cautiverio. Arias *et al*. (2013b) demostraron una reducción del 51% en huevos viables de *T. canis*. Al igual que con *D. flagrans*, el FECR también podría ser empleado para determinar el efecto ovicida de *M. circinelloides*, ya que implica una disminución en el riesgo de reinfección al actuar sobre las formas parasitarias presentes en el medio, aunque existen pocas referencias al respecto.

Prácticamente no hay información disponible sobre cómo distribuir hongos parasiticidas para controlar enfermedades parasitarias que afectan a mascotas, especialmente aquellas transmitidas por el suelo. Investigadores del grupo COPAR (GI-2120; USC) han desarrollado un método para vehicular esporas de una mezcla de hongos parasiticidas, incluyendo *M. circinelloides* (cepa CECT 208024) y *D. flagrans* (CECT 208023), en gelatina de origen animal. Este enfoque tiene como objetivo asegurar la presencia de los hongos en las heces de cachorros, reduciendo así las posibilidades de supervivencia de los parásitos y limitando el riesgo de infección (Martín, 2017). La elección de una mezcla de hongos con diferentes actividades parasiticidas se debe a la necesidad de adaptarse a las condiciones naturales, donde algunos helmintos se transmiten por la ingestión de huevos larvados y otros por larvas infectantes. Además, las infecciones mixtas son comunes, especialmente en cachorros criados en caniles.

La vulnerabilidad de los huevos de ascáridos frente a *M. circinelloides* se comprobó en diversos estudios mediante la pulverización de heces de diferentes animales infectados de forma natural (Arias *et al*., 2013b; Blaszkowska *et al*., 2014; Hernández, 2014; Cazapal-Monteiro *et al*., 2015). En estos estudios, se pudo demostrar la eficacia de *M. circinelloides* para reducir la viabilidad de los huevos de ascáridos.

2.4.3.3 Utilidad de Duddingtonia flagrans y Mucor circinelloides

Flament Simon (2015) llevó a cabo un estudio en el que pulverizó esporas de *M. circinelloides* y *D. flagrans* sobre heces de perros parasitados por ascáridos y ancilostómidos observando que la viabilidad de los huevos de *T. canis* y de las L3 de ancilostómidos se reducía (79% y 56%, respectivamente) considerando a estos hongos útiles para prevenir la transmisión de toxocariosis y ancilostomosis.

Una vez demostrada la inocuidad de las esporas de estos hongos para los animales y su capacidad para sobrevivir al paso por el tracto gastrointestinal saliendo viables con las heces de los animales (Paz-Silva *et al*., 2011), se añadieron al alimento de rumiantes y équidos con éxito. La mayoría de las formulaciones se han elaborado manualmente en el laboratorio, y son limitados los ensayos con productos elaborados en fábrica (Cortiñas *et al*., 2015; Arroyo *et al*., 2016; Hernández *et al*., 2016, 2018).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

Además, Rodríguez-Salgueiro (2017) observó que las esporas del hongo ovicida *M. circinelloides* podían crecer en gelatina comestible. Posteriormente, Martín (2017) administró

estas gelatinas con hongos por vía oral a cachorros naturalmente infectados con ascáridos y ancilostómidos, observando las esporas en heces al día siguiente. El 75% de los perros consumieron las gelatinas de colágeno con esporas de hongos en menos de 10 segundos.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Diferentes parásitos, incluidos protozoos, helmintos o ectoparásitos, han sido descritos entre los animales silvestres en cautiverio, pero los helmintos son los más frecuentemente detectados. Esto ocurre porque los animales están separados, alojados en parques que normalmente previenen la entrada de otros animales y en condiciones más o menos estables en cuanto al estado de sus parcelas Los grupos o familias más frecuentes de helmintos son los ascáridos, estróngilos, tricúridos y nematodos broncopulmonares (*Protostrongylidae* y *Dictyocaulidae*). Además, hay una amplia gama de parásitos que afectan a las mascotas que tienen potencial zoonósico, principalmente protozoos, helmintos y artrópodos. Los helmintos, incluidos los nematodos, cestodos y trematodos, infectan comúnmente a perros y gatos en Europa Los parásitos intestinales prevalentes con un potencial zoonósico significativo son *Toxocara* spp., *Ancylostoma* spp., *Dipylidium caninum* y especies de la familia Taenidae (géneros *Taenia* y *Echinococcus*).

El control de parásitos en animales criados en cautiverio se lleva a cabo mediante la administración de medicamentos antiparasitarios de amplio espectro, normalmente dos veces al año, contra las etapas dentro de los hospedadores. En España, y según ESCAPP, existe un programa de desparasitación de perros que depende principalmente de los antihelmínticos.

Resulta necesario adoptar un enfoque alternativo para el control de estos parásitos transmitidos por el suelo, dada la alta resistencia que presentan los huevos de algunos helmintos e incluso las larvas infectantes bajo ciertas condiciones. Algunos hongos son antagonistas de diferentes parásitos, proporcionando así un método de control ecológico que es inocuo para las personas, los animales y las plantas. Esta estrategia no busca eliminar todas las formas de parásitos, como ocurre con los medicamentos antihelmínticos, sino más bien lograr un equilibrio entre los animales y los parásitos que no afecte negativamente su salud o productividad.

Para establecer la utilidad del control biológico en la prevención del desarrollo de parásitos en las heces hasta sus etapas infectantes, parece muy plausible que pueda desarrollarse una estrategia sostenible y respetuosa con el medio ambiente, no solo en zoológicos, sino también para animales mantenidos en espacios públicos. Esta estrategia propuesta constituye un procedimiento seguro.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Con este propósito, se han diseñado formulaciones adecuadas que permiten la administración oral de esporas micóticas o micelio en forma de harina de cereales, pellets nutricionales o bloques energéticos. Sin embargo, cabe destacar que ciertas especies animales (como las mascotas) no reciben estas formulaciones debido a la falta de productos comercialmente disponibles (hasta el momento) o porque no forman parte de su dieta habitual.

Se realizó el estudio actual con los siguientes objetivos:

1. Analizar el conocimiento, hasta la fecha, de las posibilidades de distribución de hongos saprófitos con actividad parasiticida en parques zoológicos (**Artículo 1**).

2. Desarrollar una nueva formulación comestible con una mezcla de dos hongos con actividad ovicida (*Mucor circinelloides*) y larvicida (*Duddingtonia flagrans*). (**Artículo 2**).

3. Evaluar la actividad parasiticida de una formulación a base de gelatinas enriquecidas con una mezcla de esporas de *M. circinelloides* y *D. flagrans* (**Artículos 2 y 3**).

4. Diseñar un plan para el control integrado de los parásitos que afectan a los criaderos de cachorros y animales mantenidos en parques zoológicos como una forma de contribuir a la gestión sostenible de las parasitosis digestivas en centros caninos e instituciones dedicadas a la conservación de la vida silvestre.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. MATERIAL Y MÉTODOS UTILIZADOS EN EL ARTÍCULO 1.

Este primer trabajo fue de revisión bibliográfica.

- Las palabras claves utilizadas fueron: Saprophytic Filamentous Fungi; Helminths; captive wild animals; deworming; chemical parasiticides; *Mucor circinelloides*; *Duddingtonia flagrans*; *Verticillium; Paecilomyces;* prevention; parasites; zoological park; zoos; anthelmintics; gastrointestinal nematodes; resistant strains; Parasites Affecting Captive-Bred Animals; Control of Parasites in Captive Animals; Biological Control; Chlamydospores; Ovicidal activity; larvicidal activity; nutritional pellets; Helmintophagous Fungi; Nematode-trapping fungi; Predatory fungi or egg parasites; Endoparasitic fungi; mycelium; spores; *Helmintophagous Fungi*.
- Se emplearon los siguientes buscadores de internet: PubMed y Google Scholar.

4.2. MATERIAL Y MÉTODOS UTILIZADOS EN EL ARTÍCULO 2.

4.2.1. Hongos telúricos

En esta investigación se utilizaron dos cepas, CECT 20824 de *M. circinelloides* con actividad ovicida y CECT 20823 de *D. flagrans* larvicida, aisladas a partir de heces de animales silvestres en cautividad provenientes del Parque Zoológico "Marcelle Natureza" (43º4′14.71″N,7º37′53.50″O; Outeiro de Rei, Lugo, NO de España) (Hernández *et al*., 2017). La identificación se realizó mediante cultivo en medios específicos y fue confirmada por la Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia, España) (Fig. 19).

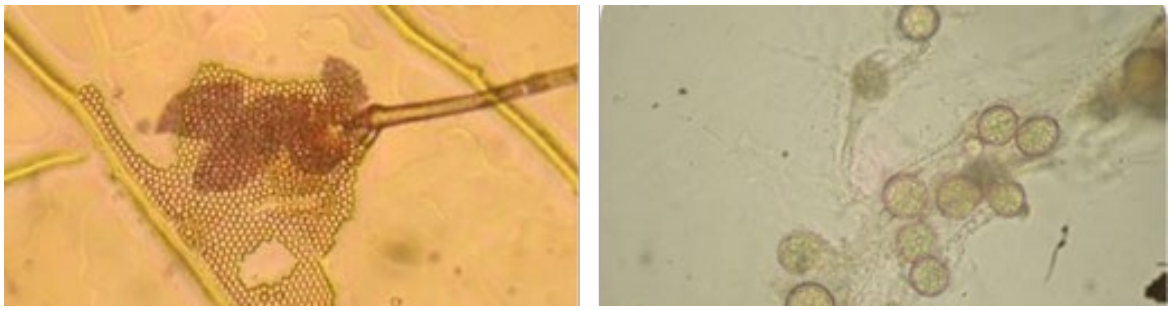


Fig. 19 Clamidosporas de *M. circinelloides* (izquierda) y de *D. flagrans*. (derecha)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.2.2. Preparación del medio de cultivo sólido y siembra de los hongos en placas.

Con el fin de propagar *D. flagrans* y *M. circinelloides* y obtener esporas se elaboró un medio de cultivo sólido en placas de Petri en las que después se colocaron los insertos fúngicos para promover el crecimiento de estas especies. En un matraz de Erlenmeyer de 2 L se preparó un litro de medio de cultivo sólido (Tabla 12). Previamente, se colocaron las placas de Petri nuevas y los guantes de látex a utilizar en la cabina de flujo laminar, dejándolos al menos media hora para que la luz ultravioleta (UV) incidiera sobre ellos, con el fin de minimizar el grado de contaminación. Una vez finalizado el paso anterior, se esperó a que el recipiente alcanzase una temperatura segura para su manipulación y depositamos el medio en las placas de Petri, dentro de la cabina de flujo laminar y utilizando un mechero Bunsen. Media hora después, sobre el medio solidificado se colocó el inserto del hongo correspondiente en el centro de la placa, de forma que la superficie de crecimiento de este contactara con el agar. El proceso se llevó a cabo con una espátula estéril. A medida que se iban sembrando los hongos, se iban cerrando e identificando (especie, fecha). El fragmento de cultivo fúngico procedía de una placa madre no contaminada.

Componentes	**Cantidad**	
	Sólido	**Líquido**
Agua destilada	450 mL	1 L
Caldo de pollo	50 mL	100 mL (10%)
Trigo	10 g	3,4 g
Agar	5 g	-

Tabla 12 Composición del medio de cultivo sólido (por 500 mL) y del medio de cultivo líquido (por 1 L) empleado para el crecimiento de los hongos filamentosos.

Tras el sellado de las placas con Parafilm®, se incubaron en la estufa a 22-24ºC. El tiempo de crecimiento de cada uno de los hongos era diferente. Las placas sembradas con *M. circinelloides* se desarrollaban más rápido (Fig. 20) mientras que las placas con *D. flagrans* tardaron entre 3 y 4 semanas. Resultó de utilidad comprobar cada cierto tiempo que el hongo se desarrollaba correctamente y que no se apreciaba contaminación por bacterias u otros hongos.

El material empleado en este estudio fue el siguiente: matraces Erlenmeyer de diferentes volúmenes, autoclave (P Selecta-Presoclave 75), cabina de flujo laminar (Faster BHA 48), placas Petri, espátulas, estufa, tiras de cinta Parafilm® para cerrar las placas y guantes de látex.

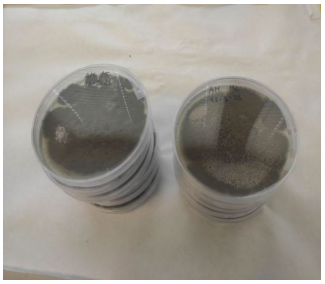


Fig. 20 Placas sembradas con *M. circinelloides.*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.2.3. Elaboración de medio de cultivo líquido y siembra de los hongos.

Para la propagación de los hongos también se preparó un medio de cultivo líquido. Se mezclaron los componentes mencionados en la Tabla 1 en un matraz de Erlenmeyer de 1 L y se esterilizó en autoclave a 121ºC durante 16 min. A continuación, se dejó enfriar a temperatura ambiente, y se distribuyeron 100 mL del medio en botellas de plástico (recicladas) de 500 mL. A continuación, se siembra cada una con un inserto de aproximadamente 2x2 cm que proviene de una placa madre. Las botellas se taparon con algodón que favorece la oxigenación para permitir el correcto crecimiento. Finalmente se etiquetaron y se mantuvieron a temperatura ambiente (25ºC) hasta su utilización posterior. Todo el material se esterilizó previamente en autoclave o con luz UV durante 30 min (Fig. 21).



Fig. 21 Medio de cultivo líquido sembrado con *M. circinelloides.*

4.2.4. Preparación de gelatina comestible con hongos parasiticidas.

En el laboratorio se prepararon dos formulaciones a base de gelatina. Una de ellas se obtuvo mezclando gelatina (Juncà Gelatines S.L., España), miel y un medio líquido que contenía ≈ 3-5x10^6 clamidosporas de ambos hongos/mL, *M. circinelloides* y *D. flagrans*. La concentración fue estimada mediante una cámara de Neubauer (Ojeda-Robertos *et al*., 2008), analizando un total de 10 alícuotas de 25 µL/L de medio. La mezcla se homogeneizó completamente, se calentó brevemente en microondas, se colocó en moldes de silicona y finalmente se enfrió a 4-6°C para mejorar la gelificación. Esta formulación permitió que cada alimento proporcionara una dosis de 3-6x10^7 clamidosporas de cada hongo parasiticida. (No se puede proporcionar información adicional ya que está pendiente de registro).

Para evaluar si el recuento de clamidosporas fúngicas variaba significativamente durante el proceso de gelificación, mensualmente durante un período de seis meses se sumergieron 30 gelatinas en 10 mL de agua a 37°C y se agitaron hasta que se derritieron completamente. Se examinaron cinco alícuotas de 25 µL de cada mezcla con un microscopio óptico a 20X utilizando una cámara de Neubauer. El recuento se expresó como número de clamidosporas/mL.

La reducción del número de clamidosporas tras la gelificación se calculó según la siguiente fórmula:

Reducción por gelificación (%) = [1 - (Recuentos GELATINA / Recuentos CULTIVO SUMERGIDO)] × 100 (Fig. 22).



Fig. 22 Gelatinas frescas con esporas de *M. circinelloides* y *D. flagrans.*

Con la finalidad de aumentar la vida útil de las gelatinas comestibles preparadas anteriormente se preparó otra formulación en seco, a base de gelatinas que se congelaron a -35°C y luego se procedió a su liofilización (Christ Alpha 1-2). Los productos finales se empaquetaron en bolsas de plástico reutilizables y se almacenaron a temperatura ambiente (RT) hasta su administración.

Se realizó un análisis del alimento seco para verificar si el procedimiento sufrido podría reducir el número de clamidosporas. Mensualmente, durante seis meses, 30 gelatinas fueron liofilizadas y luego rehidratadas sumergiendo cada una en 10 mL de agua a 37°C y agitadas hasta que se derritieran por completo. Finalmente, se tomaron cinco alícuotas de 25 µL de cada solución, y las esporas se contaron en una cámara de Neubauer con un microscopio óptico a 20X y se expresaron como número de clamidosporas/mL.

La reducción del número de clamidosporas durante el proceso de secado se estimó de la siguiente manera:
Reducción por secado (%) = [1 - (Recuentos ALIMENTO SECO/Recuentos GELATINA)] × 100 (Fig. 23).



Fig. 23 Formulaciones comestibles en seco.

Finalmente, para determinar si el almacenamiento podía influir en el número total de clamidosporas en el alimento seco, se analizaron un total de 160 piezas. En concreto 20 cada mes durante ocho meses. El recuento se llevó a cabo como se indicó anteriormente.

4.3. LOS ESTUDIOS REALIZADOS SE LLEVARON A CABO EN LAS SIGUIENTES UBICACIONES

Una parte del estudio publicado en **Artículo 2** y todo el **Artículo 3** se desarrollaron en el Parque Zoológico "Marcelle Natureza" (Fig. 24), se trata de un parque privado ubicado en el noroeste de España (Outeiro de Rei, Lugo; 43°4′14.71″N,7°37′53.50″O), donde se mantienen alrededor de 2000 animales pertenecientes a 200 especies silvestres de mamíferos, aves y reptiles en diferentes áreas (Arias *et al*., 2013). Hay parcelas valladas provistas de hierba donde los herbívoros pueden ejercitarse y alimentarse durante casi todo el año; los visitantes pueden disfrutar del zoológico diariamente de marzo a noviembre, y hay programas específicos disponibles para estudiantes. No se reciben fondos públicos, y actualmente se llevan a cabo colaboraciones activas para la preservación del lobo ibérico (*Canis lupus signatus*), el lince euroasiático (*Lynx lynx lynx*), la gacela de Cuvier (*Gazella cuvieri*), la gacela de Dama (*Nanger dama*), el oso pardo *(Ursus arctos*) y el antílope de pantano (*Tragelaphus spekii gratus*). A continuación, se recoge el mapa de los recintos de este parque.



Fig. 24 Animales del Parque Zoológico "*Marcelle Natureza*".

Los cachorros utilizados para el estudio publicado en **Artículo 2** eran del criadero comercial ''Soñar'', ubicado en Bacurín, Lugo, noroeste de España (42º57′32.689″N, 7º40′40.78″O). Es una instalación también especializada en el adiestramiento de perros. Ofrece servicios profesionales de obediencia, socialización y corrección de comportamiento para cachorros y perros adultos. El centro se preocupa por el bienestar y desarrollo de las mascotas, brindando atención personalizada según las necesidades de cada perro (Fig. 25).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



Fig. 25 Centro canino ''*Soñar*''.

4.4. ANIMALES EMPLEADOS EN EL ARTÍCULO 2.

En este estudio se utilizaron 18 **cachorros** de la raza de perro francesa **Griffon Bleu de Gascogne**, reconocida por sus excepcionales habilidades de caza y su distintivo pelaje azul-gris con moteado negro y marcas leonadas. Criada principalmente para cazar jabalíes y ciervos, esta raza es conocida por su fuerte sentido del olfato, resistencia y determinación. Los cachorros heredan muchas de estas características desde una edad temprana, lo que los hace atractivos tanto para cazadores como para entusiastas de los perros (Alderton, 2014) (Fig. 26). Forma parte de la familia de sabuesos de Gascuña, originaria de la región de Gascuña en el suroeste de Francia. Esta raza ha existido durante siglos, con ancestros que probablemente se remontan a la Edad Media. Se desarrolló a partir de una mezcla de sabuesos Bleu de Gascogne y griffons de pelo áspero, combinando las capacidades de caza de ambas razas. Estos perros fueron criados para rastrear y cazar en terrenos accidentados y boscosos, lo que explica su agilidad y resistencia. Aunque sigue siendo una raza poco común, se valora mucho por sus habilidades de caza y ha ganado reconocimiento en varias organizaciones caninas (Fogle, 2000).



Fig. 26 Cachorros de *Griffon Bleu de Gascogne* y *Gascón Saintongeois*.

También se emplearon 6 **babuinos (*Papio hamadryas*)** conocidos también como babuinos sagrados, son una especie de monos del Viejo Mundo que se encuentran principalmente en el Cuerno de África (Etiopía, Eritrea, Somalia) y en partes de la Península

USC SANTIAGO DE COMPOSTELA

Arábiga (particularmente en Yemen y Arabia Saudita). Estos babuinos son famosos por sus estructuras sociales altamente complejas, su apariencia física distintiva y comportamientos fascinantes. Como uno de los primates más estudiados, sus características únicas y sus antiguos orígenes los convierten en una especie notable en el mundo de los primates (Swedell, 2002). El babuino sagrado es una de las cinco especies del género *Papio*. Evidencias fósiles sugieren que los babuinos han existido durante millones de años, adaptándose a una variedad de entornos, desde sabanas hasta desiertos, El babuino sagrado también fue venerado en la cultura del antiguo Egipto, donde se consideraba sagrado y se asociaba con el dios Thot. Se han descubierto babuinos momificados y representaciones de la especie en tumbas egipcias, lo que refleja su importancia histórica (Swedell, 2011) (Fig. 27).



Fig. 27 Babuino (*Papio hamadryas*) en el Parque Zoológico "*Marcelle Natureza*".

4.5. ANIMALES EMPLEADOS EN EL ARTÍCULO 3.

En el último estudio se utilizaron siete **bisontes europeos (*Bison bonasus*)** (Fig. 28). Se trata del mamífero terrestre más grande de Europa y ha tenido una historia tumultuosa. En un momento, en 1919, la especie se extinguió en la naturaleza y tuvo que ser restaurada a partir de solo 12 ejemplares (Krasińska y Krasiński, 2007). Debido a este cuello de botella extremo, la especie experimentó una disminución dramática en la variabilidad genética (Olech y Perzanowski, 2002), lo que resultó en su inclusión en la Lista Roja de Especies Amenazadas de la UICN (UICN, 2021). El estatus del bisonte europeo ha mejorado desde entonces de vulnerable a casi amenazado; sin embargo, la especie aún requiere esfuerzos concertados de conservación (Olech *et al*., 2019).

La salud de la fauna silvestre es un estado dinámico que depende de las características del individuo y de su entorno. El enfoque integral es crucial para determinar el estado de salud, el cual depende de varios factores interrelacionados, entre otros: biológicos, sociales y ambientales (Stephen, 2014). Por lo tanto, los proyectos de conservación llevan a cabo el monitoreo de la población en aspectos veterinarios, genéticos, espaciales y ecológicos para asegurar la estabilidad de las perspectivas de desarrollo de la población de bisontes europeos (Sobczuk *et al.*, 2023). Debido a la baja variabilidad genética de la especie, las poblaciones de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

bisontes europeos enfrentan una serie de amenazas biológicas y ambientales, incluidas enfermedades infecciosas e invasivas (Olech *et al*., 2019).



Fig. 28 Bisonte europeo (*Bison bonasus*) en el Parque Zoológico "*Marcelle Natureza*".

4.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En el **Artículo 2** se utiliza el paquete estadístico SPSS, versión 20 (IBM SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU.), a un nivel de significación de P< 0,05.

En el **Artículo 3** se utiliza el paquete estadístico IBM® SPSS® Statistics para Windows, versión 21 (IBM Corporation, Armonk, NY, EE. UU.) a un nivel de significación de P< 0,05.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5. PUBLICACIONES

5.1. ARTÍCULO NÚMERO 1

Salmo R, Viña C, Lozano J, Palomero AM, Hernández JÁ, Bonilla R, Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A, Madeira de Carvalho LM, Arias MS, Cazapal-Monteiro C. (2024). Saprophytic Filamentous Fungi against Helminths Affecting Captive Wild Animals. *Encyclopedia*; *4(1)*: 91-100.

https://doi.org/10.3390/encyclopedia4010008

Publisher: MDPI, Basel, Switzerland.
ISSN: 2673-8392

Journal quality indexes

Copernicus Index (2024): 95.02
Academic Search Ultimate (EBSCO)
Directory of Open Access Journals (DOAJ)
Citations: 6

Contribution of the PhD student

RS performed conceptualization, methodology, data curation, resources, writing original draft preparation, supervision, funding acquisition, project administration, investigation, validation, conceptualization, writing, review and editing.

Journal/publisher permission: Not Needed.


encyclopedia

MDPI

Entry

Saprophytic Filamentous Fungi against Helminths Affecting Captive Wild Animals

Rami Salmo [1], Cándido Viña [1], João Lozano [2,3], Antonio M. Palomero [1], José Ángel Hernández [1], Rodrigo Bonilla [4], Rita Sánchez-Andrade [1], Adolfo Paz-Silva [1], Luis M. Madeira de Carvalho [2,3], María Sol Arias [1] and Cristiana Cazapal-Monteiro [1,*]

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Citation: Salmo, R.; Viña, C.; Lozano, J.; Palomero, A.M.; Hernández, J.Á.; Bonilla, R.; Sánchez-Andrade, R.; Paz-Silva, A.; Madeira de Carvalho, L.M.; Arias, M.S.; et al. Saprophytic Filamentous Fungi against Helminths Affecting Captive Wild Animals. *Encyclopedia* **2024**, *4*, 91–100. https://doi.org/10.3390/encyclopedia4010008

Academic Editors: Łukasz Stępień and Milva Pepi

Received: 2 November 2023
Revised: 20 December 2023
Accepted: 2 January 2024
Published: 5 January 2024

No special permission is required to reuse all or part of article published by MDPI, including figures and tables. For articles published under an open access Creative Common CC BY license, any part of the article may be reused without permission provided that the original article is clearly cited. Reuse of an article does not imply endorsement by the authors or MDPI. Furthermore, no special permission is required for authors to submit their work to external repositories. This policy extends to all versions of a paper: submitted, accepted, and published.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

encyclopedia

MDPI

Entry

Saprophytic Filamentous Fungi against Helminths Affecting Captive Wild Animals

Rami Salmo [1], Cándido Viña [1], João Lozano [2,3], Antonio M. Palomero [1], José Ángel Hernández [1], Rodrigo Bonilla [4], Rita Sánchez-Andrade [1], Adolfo Paz-Silva [1], Luis M. Madeira de Carvalho [2,3], María Sol Arias [1] and Cristiana Cazapal-Monteiro [1,*]

1 Control of Parasites Group (COPAR, GI-2120), Department of Animal Pathology, Faculty of Veterinary, University of Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain; rami.salmo22@gmail.com (R.S.); candidovina@hotmail.es (C.V.); dim772@hotmail.es (A.M.P.); joseangelher@gmail.com (J.Á.H.); rita.sanchez-andrade@usc.es (R.S.-A.); adolfo.paz@usc.es (A.P.-S.); mariasol.arias@usc.es (M.S.A.)
2 CIISA—Centre for Interdisciplinary Research in Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Lisbon, Avenida da Universidade Técnica, 1300-477 Lisbon, Portugal; jlozano@fmv.ulisboa.pt (J.L.); madeiradecarvalho@fmv.ulisboa.pt (L.M.M.d.C.)
3 Associate Laboratory for Animal and Veterinary Sciences (AL4AnimalS), 1300-477 Lisbon, Portugal
4 CARVAL Pharmaceuticals, Bogotá 110211, Colombia; rodrigo.bonilla@carval.com.co
* Correspondence: cristiana.cazapal@usc.es

Definition: In recent decades, important modifications have been introduced in zoos in order to guarantee the welfare of captive wild animals. Thus, many of these species are housed in enclosures with access to vegetation, where they can enjoy habitats close to those in their natural surroundings, interact with the environment, etc. These habitats present beneficial conditions for some species of parasites to survive and spread. This is a very similar problem to that affecting livestock, and the same solution, based on deworming, is currently being applied. However, the free-living stages of certain parasites that develop in the soil are responsible for high rates of ground contamination throughout the year, so that animals become infected soon after successful deworming, resulting in chemical parasiticides being frequently administered. Preventive measures are seldom considered, which worsens the situation. This entry summarizes the usefulness of the dissemination of certain saprophytic filamentous fungi with proven antagonism against some of the parasites.

Keywords: *Mucor circinelloides*; *Duddingtonia flagrans*; prevention; parasites; zoological park

check for updates

Citation: Salmo, R.; Viña, C.; Lozano, J.; Palomero, A.M.; Hernández, J.Á.; Bonilla, R.; Sánchez-Andrade, R.; Paz-Silva, A.; Madeira de Carvalho, L.M.; Arias, M.S.; et al. Saprophytic Filamentous Fungi against Helminths Affecting Captive Wild Animals. *Encyclopedia* **2024**, *4*, 91–100. https://doi.org/10.3390/encyclopedia4010008

Academic Editors: Łukasz Stępień and Milva Pepi

Received: 2 November 2023
Revised: 20 December 2023
Accepted: 2 January 2024
Published: 5 January 2024

Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Wild animals bred in captivity in zoos are often found permanently in the same plot of land, a circumstance that favors high concentrations of parasites in the environment [1]. This situation can be worsened by problems of stress, feeding, hygienic conditions in the plots, and confined spaces, which increase the possibility of parasitic infections [2]. Accordingly, control is primarily focused on deworming the animals, and it has been stated that individuals that receive these treatments regularly do not exhibit clinical signs of infection [3], and this could be interpreted to mean that the infection has fully disappeared. Nevertheless, the periodic administration of anthelmintics does not prevent challenge infections among captive species; it is suggested that a lack of quarantining newly entered animals as well as free-ranging stray animals could be possible sources of infection [4]. Other issues that need attention are the frequent use of parasiticide drugs in combination with inappropriate dosage and administration methods, which may lead to the development of resistant strains of some species of gastrointestinal nematodes [5]. Reports have noted the existence of trichostrongylids resistant to both levamisole and fenbendazole in captive Armenian red sheep, in wapitis to levamisole, and in giraffe to macrocyclic lactones and imidazothiazoles [6,7]. As can be easily understood, this problem is identical to the

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

problems reported for decades in farm animals, which remain unsolved to date. More attention should be paid to prevention with the aim of limiting the risk of infection and, thus, decreasing the need for deworming.

1.1. Main Parasites Affecting Captive-Bred Animals

Different parasites involving protozoa, helminths, or ectoparasites have been described among wild captive animals, but helminths are the most frequently detected. These are organisms with a direct life cycle, with part of their development occurring in the environment for days to weeks, and they are frequently detected in the feces of animals kept in captivity [8]. This happens because the animals are separated, housed in parks that normally prevent the entry of other animals and in more or less stable conditions in terms of the condition of their plots. All of this hinders the development of parasites with an indirect life cycle, in which the collaboration of intermediate hosts is necessary [9]. The most frequent groups or families of helminths are ascarids, strongylids, and trichurids.

1.1.1. Ascarids

Ascarids, also known as roundworms, belong to the class Nematoda. The adult stages usually occur inside the small intestine, where females shed unembryonated eggs, which reach the environment through the feces [10,11]. After several weeks under optimal temperature and humidity conditions, one larva 2 (L2) develops inside [12], and the egg become infective. Infection in wild captive species occurs through the accidental ingestion of an infective egg while grazing [13,14], and the species more commonly described in carnivores and omnivores are *Toxocara* spp., *Toxascaris leonina*, and *Baylisascaris* spp. [3,15,16]. In herbivores (cow, buffalo, bison, eland), infection with *Toxocara vitulorum*, a roundworm without zoonotic characteristics (they cannot parasitize humans), is described with some frequency, while in monogastric herbivores, *Parascaris equorum* is the most commonly diagnosed ascarid species [15].

1.1.2. Strongylids

Strongylids also belong to the class Nematoda, and usually cause mixed infections involving more than one species. These infections cause a chronic process with low mortality, but, although they do not cause serious health changes, they do cause alterations in growth, poor coat, gastrointestinal disorders, etc. Most grazing animal species are affected depending on the conditions in which they are kept (overcrowding, hygiene, etc.). These parasites are frequently found in temperate areas (9–27 °C) and high relative humidity (≥70%) conditions [17]. The most frequently identified species belong to the genera *Ostertagia* (cattle), *Teladorsagia* (sheep, goats, and deer) and *Trichostrongylus*, although there are others such as *Haemonchus*, *Cooperia*, *Bunostomum*, *Nematodirus*, and *Oesophagostomum*. Infected animals excrete the eggs into the environment when defecating, which emerge already embryonated, and in a few days, the larva 1 (L1) forms inside, hatches, and the leaves the egg, transforming into an L2 that feeds on organic matter present in the feces. Depending on the temperature and humidity conditions, L2 larvae molt into L3 larvae (the infective stage), which leave the feces and move towards the apical portion of plant species, especially grasses, and are ingested by herbivores while pasturing.

1.1.3. Trichurids

These nematodes (also called whipworms) constitute a genus of gastrointestinal parasites belonging to the roundworm family Trichuridae, characterized by a direct life cycle involving unembryonated eggs that are passed in the feces of infected animals [18]. The eggs develop outside until a first-stage larva, or L1, is formed inside and turns into the infective stage. Infection occurs when embryonated eggs are ingested, and the L1 hatches in the gut and moves to the large intestine, where the adult stage is attained and the larva feeds on blood.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Infection with *Trichuris* spp. is commonly detected among captive wild animals [18,19], enhanced by eggs shed in the feces. The feces provide a sticky cover that ensures they can remain not only in soil, but on different structures that exist in animal refuges such as hangers, perches, or swings. Accordingly, the prevention of infection is very difficult.

1.1.4. Bronchopulmonary Nematodes

Bronchopulmonary nematodes of the families *Protostrongylidae* and *Dictyocaulidae*, also known as lungworms, are parasites characterized by the location of adults in the lower respiratory tract of domestic and wild mammals [20]. Most infections are asymptomatic, but eventually they can cause respiratory problems such as bronchopneumonia and parasitic bronchitis that could evolve into severe disease. Adults lay their eggs in the lung tissues, where the first-stage larvae hatch and climb up to the throat to be swallowed and finally expelled with the feces. Soil contamination occurs through the spread of L1 larvae in the feces of parasitized animals. There are some differences in the way animals become infected, as *Dictyocaulidae* has a direct life cycle with a free-living stage, while in *Protostrongylidae*, a terrestrial mollusk acts as an intermediate host [21]. Animals become infected when grazing through the ingestion of the L3 free-living stage for *Dictyocaulidae* or the intermediate host carrying the L3 for *Protostrongylidae*.

Adults of *Dictyocaulus* spp. produce embryonated eggs in the airways that hatch briefly after oviposition, while the eggs of lungworms are unembryonated. When they both hatch, the first-stage larvae reach the trachea and are passed in the feces. Once in the soil, *Dictyocaulus* spp. molt to L2 and L3, the infective stage, while the larvae of pulmonary nematodes need to penetrate mollusks to reach the infective L3 stage. After release in the abomasum, the L3 of *Dictyocaulus* spp. must penetrate the intestine and migrate via lymph nodes to reach the lungs as L4s. The third-stage larvae of *Protostrongylidae* leave the intermediate host from the stomach and penetrate the intestine, reaching the lungs, and form nodes with L4s within the lungs after thoracic duct–heart–pulmonary artery migration [22].

1.2. Clinical Importance and Detection

Even though parasites are one of the leading causes of death in captive wild animals, especially on those with a heavy parasitic burden, the great majority of these infections are subclinical and so clinical signs are hardly noticeable by veterinarians and zookeepers [9]. As ascarids, strongylids, and trichurids are mainly localized in the gastrointestinal tract, if a clinical syndrome is observed, the clinical signs will be mostly digestive or due to the parasite's hematophagy. Hence, it is possible to observe anemia, edema, lethargy, malnutrition, and diarrhea. In severe infections, there will also be extreme weight loss and worsening of body condition, and death can also occur [7]. Unless there is a heavy infection, the clinical signs of *Trichuris* are rare and consist of minor cecitis and diarrhea with mucus and blood.

Therefore, it is crucial to have adequate tools for the diagnosis of parasitic infections. Routine diagnostics consist of the visualization of parasite eggs in feces, confirming the existence of adult worms inside the host. There are also serological probes such as ELISA, although a positive result is not enough to confirm the parasitism, only previous exposure [23].

1.3. Control of Parasites in Captive Animals

Wild animals seem to have a natural resistance to parasitic infections, but when kept in captivity, their sensitivity to parasites appears to be reduced, possibly due to the disruption of their ecosystem [24].

The control of parasites in captive-bred animals is carried out by administering broad-spectrum antiparasitic drugs, normally twice a year, against the stages inside the hosts. For the control of nematodes, benzimidazoles like albendazole or fenbendazole and macrocyclic lactones such as ivermectin are the most utilized families, while praziquantel is used

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

for the control of cestodes. The use of these drugs in wild species involves a series of additional difficulties:

- In a large number of cases, deworming is carried out without a prior coprological examination.
- The antiparasitic drugs used for livestock are often not specific for the target species, so they are underdosed to avoid intoxication problems.
- Animal handling problems can cause most treatments to be administered orally due to the impossibility of giving them parenterally. This oral administration does not ensure an adequate ingestion of antiparasitic drugs, so there will be animals that ingest a higher dose than recommended and others in which the dosage is practically nil.
- One of the main limiting factors regarding the implementation of preventive measures against parasites is the place where these animals are located, which is usually limited and permanent. The effectiveness of any antiparasitic treatment is reduced as a consequence of numerous reinfections when they are continuously located in the same plot.
- The residues produced by the metabolism of pesticides can be toxic to some species of microorganisms that are very useful for soil enrichment, such as some coprophagous beetles [25,26].

For the purpose of limiting the risk of infection from certain parasites, regular monitoring for sanitation and cleaning is necessary to minimize the risk, and the frequent cleaning of animal refuges and facilities, as well as the removal of feces to avoid infectious stages from being reached, are also important [4]. It is noteworthy to state that preventing environmental contamination by the eggs and larvae of parasites represents one of the key steps to stopping the transmission of parasites to wildlife.

Despite proper deworming and good hygiene practices, animals living in captivity will still suffer from diseases caused by parasites. This occurs due to the presence of the animals in the same place for prolonged periods of time, favoring their exposure to infective forms, so that reinfection occurs [15,27].

With all of the above in mind, together with the high resistance presented by the eggs of some helminths and even infective larvae under certain conditions, it appears necessary to adopt an alternative approach for the control of these soil-transmitted parasites [16,23,28,29].

2. Application of Helmintophagous Fungi against Parasites Affecting Wild Captive Animals

The use of natural antagonists against pathogens is known as biological control. Some fungi are antagonists of different parasites, thus providing an ecological method of control that is harmless to people, animals, and plants. This strategy is not intended to eliminate all forms of parasites, as is the case with anthelmintic drugs, but rather to seek a balance between animals and parasites that does not cause a decline in their health or productivity [30].

Depending on their activity, parasiticidal fungi can be divided into three main groups: nematode-trapping, predatory, and endoparasitic fungi.

- Nematode-trapping fungi: These are characterized by producing an extensive system of hyphae or mycelium where, at certain intervals of development, they present specialized structures such as hyphal nets, knobs, branches, or rings to trap and sustain live nematodes (larval stages); therefore, they are ideal for the control of parasites such as strongyles [31]. Examples of this group are *Duddingtonia flagrans*, *Arthrobotrys* spp., and *Monacrosporium thaumasium* [32–35], which can develop different types of traps in which the mobile parasitic stages become caught, absorbed, and finally destroyed.
- Predatory fungi or egg parasites: The hyphae of these fungi adhere to and penetrate the egg through small pores in the vitelline layer, causing permeability alterations. These fungi continue their development until they colonize the contents of the egg (embryo or larva). Good examples of this type of fungus are *Pochonia chlamydosporia* and *Mucor circinelloides* [36–38]. The parasiticide activity of these fungi is classified

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

into three types, depending on how the egg morphology and viability are affected. Predatory fungi exhibit parasiticide activity type 1 when the hyphae surround the eggshell without penetrating it and where no embryo alterations are observed, but parasite development is stopped; activity type 2 occurs when the eggshell and embryo show morphological alterations without hyphae penetration; and, finally, type 3 activity takes place when the hyphae penetrate the eggshell and destroy the embryo so that the eggs become completely unviable, being unable to infect animals. If no damage or alterations are observable in the eggs, they remain viable, and this is considered activity type 0 [38].

- Endoparasitic fungi: These fungi can infect nematodes through their spores. The fungi do not develop outside the host's body and are not able to penetrate unless they are ingested, which makes their culture and maintenance in laboratory conditions very difficult and is the main reason for them not being used in current investigations.

It is important to emphasize that depending on the target (the infective stage of the parasitic species), a different fungal mechanism of action must be employed. In ascarids or trichurids, the infective phase is immobile, and, therefore, predatory fungi are useful. On the other hand, strongyles have a mobile infective phase and can be controlled by means of nematode-trapping fungi (Figure 1).

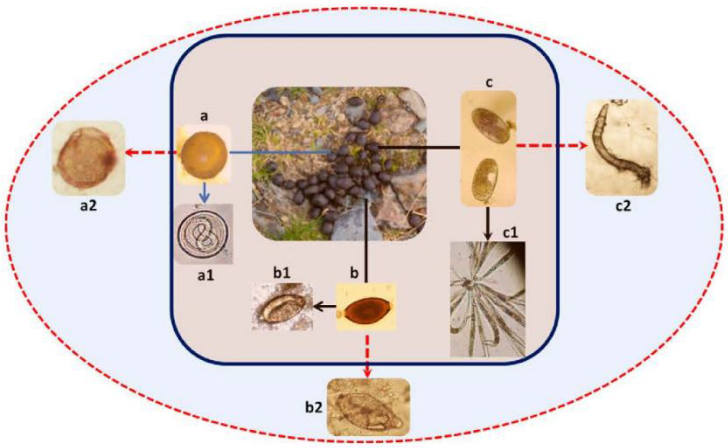


Figure 1. Eggs of ascarids (**a**), trichurids (**b**), and strongylids (**c**) are frequently observed in the feces of wild captive animals. Despite the animals being successfully dewormed, the eggs evolve to the infective phases (**a1**,**b1**,**c1**) in the soil/feces. The saprophytic fungus *Mucor circinelloides* is able to interfere with the development of the eggs of ascarids (**a2**) or trichurids (**b2**), avoiding the infective stage. *Duddingtonia flagrans* is a nematode-trapping fungus capable of catching the third-stage larvae of strongylids (**c2**) and taking their nutrients. In both cases, the parasites become nonviable and noninfective.

2.1. Biological Control of Helminths Affecting Captive Animals: Analysis in Feces

For the purpose of establishing the usefulness of biological control to prevent the development of parasites in feces until their infective stages, some tests consisting of adding chlamydospores of *D. flagrans*, *M. circinelloides*, *Verticillium*, and *Paecilomyces* were conducted. Some of these studies took place in a zoological park located in Galicia (northwest Spain) where these filamentous fungi were isolated and tested over several gastrointestinal nematodes from carnivores, equids, ruminants, and monogastric herbivores kept in captivity. Chlamydospores of *Mucor circinelloides*, *Paecilomyces*, and *Verticillium* were sprayed

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

into racoon (*Procyon lotor*) feces positive for *B. procyonis*, and reductions of 53–69%, 45–62%, and 52–67%, respectively, were obtained, indicating type 3 activity for all three fungi [38]. Similar results were recorded when *M. circinelloides* was tested in *T. leonina* and *Parascaris equorum* eggs, with 58% and 61–67% of reduction, respectively [39,40]. Ovicidal activity type 3 was identified for all fungal species in each experiment. Moreover, the addition of spores of *M. circinelloides* or *Trichoderma atrobrunneum* to the feces of captive dromedaries (*Camelus dromedarius*) resulted in a 50% reduction in the viability of eggs from *Trichuris* sp. [18].

For evaluating the larvicidal activity of the nematode-trapping fungi *Duddingtonia flagrans* over larvae 3 of strongylids from equids, chlamydospores were added to the feedstuff twice a week, reaching a reduction varying between 84 and 89% [41]. The results showed that the viability of the eggs or larvae of gastrointestinal nematodes was reduced by ≥45%. It should be taken into account that, so far, few trials have been conducted on the efficacy of fungi on parasites affecting animals, and most of the tests have been carried out in vitro in Petri dishes. Table 1 shows a resume of all of these studies.

Table 1. Effect of soil saprophytic fungi on parasites in feces of captive animals.

Helminth	Fungal Species	% Viability Reduction	Reference
Baylisascaris procyonis	*Mucor circinelloides*	53–69%	[38]
	Paecilomyces	45–62%	
	Verticillium	53–69%	
Toxascaris leonina	*Mucor circinelloides*	58%	[39]
Equine strongyle larvae	*Duddingtonia flagrans*	84–89%	[41]
Parascaris equorum	*Mucor circinelloides*	61–67%	[40]
Trichuris sp.	*Mucor circinelloides*	11–50%	[18]
	Trichoderma atrobrunnenum	13–50%	

The data from Table 1 demonstrate that the presence of parasiticide fungi in the feces of animals passing eggs provides a very helpful and eco-friendly measure to limit the possibility of parasites attaining infectivity, decreasing the risk of further challenge infections. In this way, an interesting question arises regarding ways to ensure that the fungal stages (mycelium, spores) can reach the feces, interact with different phases of the parasites, and develop their antagonistic roles. There are several possibilities, and the most effective are those involving oral administration to the animals.

There are few trials concerning the antagonism of *D. flagrans* against the larvae of *M. capillaris* prior their penetration on the snail, and the results seem to indicate little or no effect [42,43].

2.2. *Administration of Helmintophagous Fungi to Captive Animals*

Due to the resistance of chlamydospores to high temperatures and pH conditions, these organisms can survive the passage across the digestive tract, and, once excreted, germinate in the feces and form traps, making them ideal candidates for oral administration [44]. In recent decades, different formulations have been tried for the administration of fungi to animals. One of them consisted of mixing the spores with the feed manually, before giving it to the animals. The fungi solution, which could have one or two fungi species, must be mixed with the feed concentrate immediately before the administration to avoid any fungal development that could alter their organoleptic characteristics, making it unappetizing for the animals. Another option was to incorporate these chlamydospores into a supplement feed with grains and sweet feed for improving its consumption by the animals. This strategy was used successfully with giraffes, antelopes, and gerenuks in EEUU [40], but also in Spain with European donkeys, African asses, and zebras [41], achieving excellent percentages of larval reduction. Other options used to provide the spores orally was by means of a powdered product resulting from mashing the fungi, and its utilization was able

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

to reduce the presence of third-stage larvae from gastrointestinal nematodes in reticulated giraffe, scimitar-horned oryx, and roan antelope by mixing it with their feed [45].

To further facilitate the task of giving spores to the animals, some experiments were carried out with nutritional pellets to which the chlamydospores were added during the mixing phase of the manufacturing process. Thus, the ability of *M. circinelloides* and *Duddingtonia flagrans* to reduce the infective phases of *Trichostrongylus*, *Nematodirus*, *Chabertia*, and *Haemonchus* in the soil was demonstrated, reducing the probability of reinfection in all species that were studied, since it was not necessary to deworm them again throughout the 24 months that the study lasted. All of these experiments carried out with domestic or wild living animals required individual deworming before starting the fungal administration, since nematophagous fungi have no effect on the parasites harbored within the animal and only destroy those in the free-living parasitic stages. It is important to underline the absence of side effects when fungal chlamydospores were given to horses, cattle, and sheep, as well as captive wild animals [45–47]. Table 2 summarizes all of the studies mentioned above.

Table 2. Edible formulations for the administration of fungal spores to captive animals in zoos.

Fungal Species	Formulation	Animal Species	Reference
Duddingtonia flagrans	Pellets top-dressed with a solution of chlamydospores	Giraffe Antelope Gerenuk	[45]
		European donkey African ass Zebra	[46]
	Powdered chlamydospores	Reticulated giraffe Scimitar-horned oryx Roan antelope	[48]
M. circinelloides + *D. flagrans*	Nutritional pellets manufactured with fungal spores	Blackbuck Gazelle Mouflon Bison Marshbuck Kob	[47]

These investigations corroborated the findings of those previously performed on livestock species showing that the oral administration of fungal spores is possible by means of different formulated foods. Finally, the existence of collections of wild animals in public places such as parks, gardens of historic buildings, etc., should also be taken into account, as they are at risk of infection from different parasites. Recent investigations have demonstrated that very promising results are possible by supplementing peacocks with chlamydospores of a strain of the saprophytic filamentous fungus *M. circinelloides* isolated in Lisbon (Portugal) [34].

3. Conclusions and Prospects

According to data collected in recent decades, saprophytic filamentous fungi are able to destroy or interfere with the development of certain parasites in feces and/or soil, which has become of great importance in contributing to the control of different parasites affecting wild animals maintained in zoological parks where the administration of chemical parasiticide compounds often utilized in livestock appears to be the only solution. Nevertheless, despite many effective formulations being commercially available, wild animal species are soon infected again, possibly due to the fact that the animals are always kept in the same location, which increases their exposure to the infective stages of different parasites developing in the soil. This emphasizes the need for preventive measures to avoid large numbers of parasites evolving into their respective infective stages in the environment

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(enclosure, box) where the animals are sheltered, thus increasing their risk of infection and the need for additional deworming.

A program for the control of parasites affecting wild captive animals that integrates the analysis of feces prior to deworming through the administration of adequate anthelmintics (benzimidazoles or macrocyclic lactones), together with the periodical administration of chlamydospores from soil saprophytic fungi, appears a novel and helpful contribution to the sustainable management of digestive infections from parasites in zoological parks. It seems very plausible that a sustainable and eco-friendly strategy could be developed not only among zoological gardens, but also involving animals maintained in public areas. This suggested strategy constitutes a safe procedure.

Author Contributions: Conceptualization, methodology, data curation, resources, writing—original draft preparation, supervision, funding acquisition, and project administration: R.S.-A., A.P.-S., M.S.A. and C.C.-M.; formal analysis, software, writing, and visualization: R.B. and J.Á.H.; investigation, validation, and conceptualization: R.S., C.V., A.M.P. and J.L.; resources, A.P.-S.; writing—review and editing: R.S.-A., A.P.-S., M.S.A., C.C.-M. and L.M.M.d.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Ministry for Science and Innovation (MCINN, Spain) and the European Regional Development Fund (ERDF) (Project PID2020-120208RB-I00), AGACAL (Consellería de Cultura, Educación e Universidades, Xunta de Galicia, Spain) (Projects FEADER 2022/017B and ED431B 2021/07). The APC was funded by the University of Santiago de Compostela (USC, Spain).

Conflicts of Interest: R.B. is research director for Carval pharmaceuticals, and the authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Wolfe, B.A. Bovidae (except sheep and goats) and Antilocapridae. In *Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine*, 1st ed.; Miller, R.E., Fowler, M.E., Eds.; Elsevier: St. Louis, MO, USA, 2015; Volume 8, pp. 626–645, ISBN 978-1-4557-7397-8. [CrossRef]
2. Palomero, A.M.; Cazapal-Monteiro, C.F.; Valderrábano, E.; Paz-Silva, A.; Sánchez-Andrade, R.; Arias, M.S. Soil fungi enable the control of gastrointestinal nematodes in wild bovidae captive in a zoological park: A 4-year trial. *Parasitology* **2020**, *147*, 791–798. [CrossRef] [PubMed]
3. Schieber, M.-C.; Štrkolcová, G. Prevalence of endoparasites in carnivores in a zoo and a wolves park in Germany. *Folia Vet.* **2019**, *63*, 54–59. [CrossRef]
4. Nath, T.C.; Eom, K.S.; Choe, S.; Hm, S.; Islam, S.; Ndosi, B.A.; Kang, Y.; Bia, M.M.; Kim, S.; Eamudomkarn, C.; et al. Insight into One Health approach: Endoparasite infections in captive wildlife in Bangladesh. *Pathogens* **2021**, *10*, 250. [CrossRef] [PubMed]
5. Shalaby, H.A. Anthelmintics resistance; how to overcome it? *Iran. J. Parasitol.* **2013**, *8*, 18–32.
6. Young, K.E.; Jensen, J.M.; Craig, T.M. Evaluation of an anthelmintic activity in captive wild ruminants by fecal egg reduction tests and a larval development assay. *J. Zoo Wildl. Med.* **2000**, *31*, 348–352. [CrossRef]
7. Garretson, P.D.; Hammond, E.E.; Craig, T.M.; Holman, P.J. Anthelmintic resistant *Haemonchus contortus* in a giraffe (*Giraffa camelopardalis*) in Florida. *J. Zoo Wildl. Med.* **2009**, *40*, 131–139. [CrossRef]
8. Sengar, A.; Shrivastav, A.B.; Singh, K.P.; Rokde, A. Noninvasive assessment of gastrointestinal parasites infection in free-ranging wild herbivores and adjoining livestock of Panna Tiger Reserve, Madhya Pradesh, India. *Vet. World* **2017**, *10*, 748–751. [CrossRef]
9. Atanaskova, E.; Kochevski, Z.; Stefanovska, J.; Nikolovski, G. Endoparasites in wild animals at the zoological garden in Skopje, Macedonia. *JoTT Note* **2011**, *3*, 1955–1958. [CrossRef]
10. Mateus, T.L.; Castro, A.; Ribeiro, J.N.; Vieira-Pinto, M. Multiple zoonotic parasites identified in dog feces collected in Ponte de Lima, Portugal—A potential threat to human health. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2014**, *11*, 9050–9067. [CrossRef]
11. Hoopes, J.; Hill, J.E.; Polley, L.; Fernando, C.; Wagner, B.; Schurer, J.; Jenkins, E. Enteric parasites of free-roaming, owned, and rural cats in prairie regions of Canada. *Can. Vet. J.* **2015**, *56*, 495–501.
12. Côtes, E. *Clinic and Veterinary Advisor. Dogs and Cats*, 3rd ed.; Elsevier: Toronto, ON, Canada, 2014.
13. Vandemark, L.M.; Jia, T.-W.; Zhou, X.-N. Social science implications for control of helminth infections in southeast Asia. *Adv. Parasitol.* **2010**, *73*, 137–170. [CrossRef] [PubMed]
14. Elsheikha, H.M. Major cestodes infections. In *Essentials of Veterinary Parasitology*, 1st ed.; Elsheikha, H.M., Khan, N.A., Eds.; Caister Academic Press: Poole, UK, 2011; pp. 71–79, ISBN 978-1-904455-80-6.
15. Maesano, G.; Capasso, M.; Ianniello, D.; Cringoli, G.; Rinaldi, L. Parasitic infections detected by FLOTAC in zoo mammals from Warsaw, Poland. *Acta Parasitol.* **2014**, *59*, 343–353. [CrossRef] [PubMed]

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

16. Gałęcki, R.; Sokół, R.; Koziatek, S. Parasites of wild animals as a potential source of hazard to humans. *Ann. Parasitol.* **2015**, *61*, 105–108. [PubMed]
17. Voinot, M.; Bonilla, R.; Sousa, S.; Sanchís, J.; Canhão-Dias, M.; Romero Delgado, J.; Lozano, J.; Sánchez-Andrade, R.; Sol Arias, M.; Madeira de Carvalho, L. Control of Strongyles in First-Season Grazing Ewe Lambs by Integrating Deworming and Thrice-Weekly Administration of Parasiticidal Fungal Spores. *Pathogens* **2021**, *10*, 1338. [CrossRef] [PubMed]
18. Hernández, J.A.; Cazapal-Monteiro, C.F.; Arroyo, F.L.; Silva, M.I.; Palomero, A.M.; Paz-Silva, A.; Sanchez-Andrade, R.; Arias, M.S. Biological control of soil transmitted helminths (STHs) in a zoological park by using saprophytic fungi. *Biol. Control* **2018**, *122*, 24–30. [CrossRef]
19. Barbosa, A.D.S.; Pinheiro, J.L.; Dos Santos, C.R.; de Lima, C.S.C.C.; Dib, L.V.; Echarte, G.V.; Augusto, A.M.; Bastos, A.C.M.P.; Antunes Uchôa, C.M.; Bastos, O.M.P.; et al. Gastrointestinal Parasites in Captive Animals at the Rio de Janeiro Zoo. *Acta Parasitol.* **2020**, *6*, 237–249. [CrossRef] [PubMed]
20. Saidi, A.; Mimouni, R.; Hamadi, F.; Oubrou, W. Coprological survey of protostrongylid infections in antelopes from Souss-Massa National Park (Morocco). *Helminthologia* **2020**, *57*, 306–313. [CrossRef]
21. Panayotova-Pencheva, M.S. Species composition and morphology of protostrongylids (Nematoda: Protostrongylidae) in ruminants from Bulgaria. *Parasitol. Res.* **2011**, *109*, 1015–1020. [CrossRef]
22. Panuska, C. Lungworms of ruminants. *Vet. Clin. Food Anim.* **2006**, *22*, 583–593. [CrossRef]
23. Overgaauw, P.A.M.; van Knapen, F. Veterinary and public health aspects of *Toxocara* spp. *Vet. Parasitol.* **2013**, *193*, 398–403. [CrossRef]
24. Goossens, E.; Dorny, P.; Boomker, J.; Vercammen, F.; Vercruysse, J. A 12-month survey of the gastro-intestinal helminths of antelopes, gazelles and giraffids kept at two zoos in Belgium. *Vet. Parasitol.* **2005**, *127*, 303–312. [CrossRef]
25. Martínez, I.M.; Lumaret, J.-P.; Ortiz, R.Z.; Kadiri, N. The effects of sublethal and lethal doses of ivermectin on the reproductive physiology and larval development of the dung beetle *Euoniticellus intermedius* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Can. Entomol.* **2017**, *149*, 461–472. [CrossRef]
26. Verdú, J.R.; Cortez, V.; Ortiz, A.J.; Lumaret, J.-P.; Lobo, J.M.; Sánchez-Piñeiro, F. Biomagnification and body distribution of ivermectin in dung beetles. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 9073. [CrossRef] [PubMed]
27. Fagiolini, M.; Lia, R.P.; Laricchiuta, P.; Cavicchio, P.; Mannella, R.; Cafarchia, C.; Otranto, D.; Finotello, R.; Perrucci, S. Gastrointestinal parasites in mammals of two Italian zoological gardens. *J. Zoo Wildl. Med.* **2010**, *41*, 662–670. [CrossRef] [PubMed]
28. Gavin, P.J.; Kazacos, K.R.; Shulman, S.T. Baylisascariasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **2005**, *18*, 703–718. [CrossRef] [PubMed]
29. Gawor, J.; Borecka, A. Quantifying the risk of zoonotic geohelminth infections for rural household inhabitants in Central Poland. *Ann. Agric. Environ. Med.* **2017**, *24*, 44–48. [CrossRef]
30. Grønvold, J.; Henriksen, S.A.; Larsen, M.; Nansen, P.; Wolstrup, J. Biological control aspects of biological control—With special reference to arthropods, protozoans and helminths of domesticated animals. *Vet. Parasitol.* **1996**, *64*, 47–64. [CrossRef]
31. Sagüés, M.F.; Purslow, P.; Fernández, S.; Fusé, L.; Iglesias, L.; Saumell, C. Nematophagous fungi used for the biological control of gastrointestinal nematodes in livestock and administration routes. *Rev. Iberoam. Micol.* **2011**, *28*, 143–147. [CrossRef]
32. Maciel, A.S.; Freitas, L.G.; Figueiredo, L.D.; Campos, A.K.; Mello, I.N. Antagonistic activity of the fungus *Pochonia clamydosporia* on mature and immature *Toxocara canis* eggs. *Parasitology* **2012**, *139*, 1074–1085. [CrossRef]
33. Arias, M.S.; Cazapal-Monteiro, C.F.; Suárez, J.; Miguélez, S.; Francisco, I.; Arroyo, F.L.; Suárez, J.L.; Paz-Silva, A.; Sánchez-Andrade, R.; Mendoza de Gives, P. Mixed production of filamentous fungal spores for preventing soil-transmitted helminth zoonoses: A preliminary analysis. *Biomed. Res. Int.* **2013**, *2013*, 567876. [CrossRef]
34. Lozano, J.; Almeida, C.; Oliveira, M.; Paz-Silva, A.; Madeira de Carvalho, L. Biocontrol of avian gastrointestinal parasites using predatory fungi: Current status, challenges and opportunities. *Parasitologia* **2022**, *2*, 37–44. [CrossRef]
35. Pérez-Anzúrez, G.; Olmedo-Juárez, A.; von-Son de Fernex, E.; Alonso-Díaz, M.A.; Delgado-Nuñez, E.J.; López-Arellano, M.E.; González-Cortázar, M.; Zamilpa, A.; Ocampo-Gutierrez, A.Y.; Paz-Silva, A.; et al. *Arthrobotrys musiformis* (Orbiliales) kills *Haemonchus contortus* infective larvae (Trichostrongylidae) through its predatory activity and its fungal culture infiltrates. *Pathogens* **2023**, *11*, 1068. [CrossRef] [PubMed]
36. Lýsek, H.; Fassatiová, O.; Cuervo, N.P.; Lorenzo, N.H. Ovicidal fungi in soils of Cuba. *Folia Parasitol.* **1982**, *29*, 265–270. [PubMed]
37. Carvalho, R.O.; Araújo, J.V.; Braga, F.R.; Araujo, J.M.; Alves, C.D. Ovicidal activity of *Pochonia chlamydosporia* and *Paecilomyces lilacinus* on *Toxocara canis* eggs. *Vet. Parasitol.* **2010**, *169*, 123–127. [CrossRef] [PubMed]
38. Cazapal-Monteiro, C.F.; Hernández, J.A.; Arroyo, F.L.; Miguélez, S.; Romasanta, Á.; Paz-Silva, A.; Sánchez-Andrade, R.; Arias, M.S. Analysis of the effect of soil saprophytic fungi on the eggs of *Baylisascaris procyonis*. *Parasitol. Res.* **2015**, *114*, 2443–2450. [CrossRef] [PubMed]
39. Hernández, J.Á.; Cazapal-Monteiro, C.F.; Sanchís, J.; Sánchez-Andrade, R.; Paz-Silva, A.; Arias, M.S. Potential usefulness of filamentous fungi to prevent zoonotic soil-transmitted helminths. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2018**, *18*, 690–696. [CrossRef]
40. Arroyo, F.L.; Arias, M.S.; Cazapal-Monteiro, C.F.; Hernández, J.A.; Suárez, J.; Miguélez, S.; Romasanta, A.; Sánchez-Andrade, R.; Paz-Silva, A. The capability of the fungus *Mucor circinelloides* to maintain parasiticidal activity after the industrial feed pelleting enhances the possibilities of biological control to livestock parasites. *Biol. Control* **2016**, *92*, 38–44. [CrossRef]
41. Arias, M.S.; Arroyo, F.L.; Cazapal-Monteiro, C.F.; Hernández, J.A.; Suárez, J.; Francisco, I.; López-Arellano, M.E.; Sánchez-Andrade, R.; Mendoza de Gives, P.; Paz-Silva, A. Formulating *Duddingtonia flagrans* in nutritional pellets for the sustainable control of equine strongyles. *J. Sci. Technol. Environ.* **2015**, *5*, 3000249.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

42. Paraud, C.; Chartier, C. Biological control of infective larvae of a gastro-intestinal nematode (*Teladorsagia circumcincta*) and a small lungworm (*Muellerius capillaris*) by *Duddingtonia flagrans* in goat faeces. *Parasitol. Res.* **2003**, *89*, 102–106. [CrossRef]
43. Paraud, C.; Cabaret, J.; Pors, I.; Chartier, C. Impact of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* on *Muellerius capillaris* larvae in goat faeces. *Vet. Parasitol.* **2005**, *131*, 71–78. [CrossRef]
44. Canhão-Dias, M.; Paz-Silva, A.; Madeira de Carvalho, L.M. The efficacy of predatory fungi on the control of gastrointestinal parasites in domestic and wild animals-A systematic review. *Vet. Parasitol.* **2020**, *283*, 109173. [CrossRef] [PubMed]
45. Terry, J.A. The Use of Duddingtonia flagrans for Gastrointestinal Parasitic Nematode Control in Feces of Exotic Artiodactylids at Disney's Animal Kingdom. Master's Thesis, Louisiana State University (LSU), Baton Rouge, LA, USA, 2013.
46. Arias, M.; Cazapal-Monteiro, C.; Valderrábano, E.; Miguélez, S.; Rois, J.L.; López-Arellano, M.E.; Madeira de Carvalho, L.; Mendoza de Givez, P.; Sánchez-Andrade, R.; Paz-Silva, A. A preliminary study of biological control of strongyles affecting equids in a zoological park. *J. Equine Vet. Sci.* **2013**, *33*, 115–1120. [CrossRef]
47. Palomero, A.M.; Hernández, J.A.; Cazapal-Monteiro, C.F.; Arroyo, F.B.; Silva, M.I.; Paz-Silva, A.; Sánchez-Andrade, R.; Arias, M.S. Implementation of biological control to the integrated control of strongyle infection among wild captive equids in a zoological park. *Biomed. Res. Int.* **2018**, *2018*, 4267683. [CrossRef] [PubMed]
48. Young, K.R. The Effect of the Nematode Trapping Fungus Duddingtonia flagrans against Gastronintestinal Nematodes of Exotic Ruminant Hoofstock at Disney's ®Animal Kingdom Lodge. Master's Thesis, Louisiana State University (LSU), Baton Rouge, LA, USA, 2018.

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.2. ARTÍCULO NÚMERO 2

Paz-Silva A, Salmo R,Viña C, Palomero AM, Hernández JÁ, Sánchez-Andrade R, Cazapal-Monteiro C, Arias MS. (2023). Gelatin treats containing filamentous fungi to promote sustainable control of helminths among pets and zoo animals. *Biological Control*,*179*,105184.

https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2023.105184.

Publisher: ACADEMIC PRESS INC ELSEVIER SCIENCE.

ISSN 1049-9644

Journal quality indexes

Journal Impact Factor (2023): 3.7

5-year Impact Factor: 4

Rank (2023): 10/109 (Q1) (ENTOMOLOGY)

Contribution of the PhD student

R S performed the Data curation, Investigation.

Journal/publisher permission: Not Needed.



USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Biological Control 179 (2023) 105184

Contents lists available at ScienceDirect

Biological Control

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

Gelatin treats containing filamentous fungi to promote sustainable control of helminths among pets and zoo animals

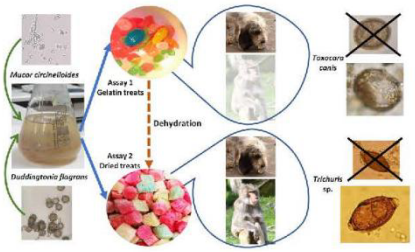
Adolfo Paz-Silva [*], Rami Salmo, Cándido Viña, Antonio Miguel Palomero, José Ángel Hernández, Rita Sánchez-Andrade, Cristiana Cazapal-Monteiro [1], María Sol Arias [1]

Control of Parasites Group (COPAR, GI-2120), Department of Animal Pathology, Faculty of Veterinary, University of Santiago de Compostela, Lugo, Spain

HIGHLIGHTS

- Helminths can affect almost all grazing animals, and up to 80% pets.
- Ingestion of certain fungi helps in reducing the risk of infection by helminths.
- Gelatins with fungi are easily prepared and dehydration guarantees long durability.
- Gelatins and dry gelatins are useful in halving the risk of helminthoses.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Keywords:
Edible
Prevention
Nematodes
Mucor circinelloides
Duddingtonia flagrans

ABSTRACT

The appropriateness of edible formulations of the parasiticide fungi *Mucor circinelloides* (ovicide) and *Duddingtonia flagrans* (larvicide) for the control of helminths affecting animals has been tested in two assays. Firstly, gelatin-based treats were manufactured with a blend of $3 - 6{\cdot}10^7$ chlamydospores each fungus and provided to three groups of six puppies each passing eggs of *Toxocara canis*, thrice a week for eight weeks. Feces collected at the end of this period were analyzed during four weeks to estimate the egg viability, the counts of infective eggs and the soil contamination index. The usefulness of the edible formulation comprised checking for the easiness of preparation and administration, the level of acceptance by the targeted animals and the expiration interval. A similar assay was conducted on a group of six captive baboons, but some refused to ingest the gelatins and others did it with difficulty. The second assay consisted of drying the gelatin treats and administering (thrice a week for eight weeks) to other two groups of six pups each infected by *T. canis* (different from those in assay I), and to six baboons captive in a zoo and passing eggs of *Trichuris* sp. (this probe on baboons was performed in triplicate at a four-month interval). Feces collected after eight weeks were examined for four weeks as mentioned previously.

Viability of eggs of *T. canis* was significantly halved with the two edible formulations, and 44% reached the infective stage. In the feces of baboons taking dry gelatins, 50% eggs of *Trichuris* sp. remained viable, and 14% attained infectivity. Soil contamination by these nematodes was 20 and 5%, respectively. It was concluded that gelatin treats containing chlamydospores of a blend of *M. circinelloides* and *D. flagrans* offer a highly effective and

* Corresponding author.
E-mail address: adolfo.paz@usc.es (A. Paz-Silva).
[1] Joint senior author.

https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2023.105184
Received 13 December 2022; Received in revised form 30 January 2023; Accepted 2 February 2023
Available online 6 February 2023
1049-9644/© 2023 Elsevier Inc. All rights reserved.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

practical formulation to develop strategies for the biological control of helminths affecting pets. In addition to retaining the high helminthicidal activity, the dehydration of the gelatins provides a very safe edible formulation, easy to store at room temperature and to give to companion animals and captive wild species, thus its administration is strongly advised to reduce the risk of infection by soil-transmitted helminths.

1. Introduction

An important number of parasites develop in the soil until attaining the stages that can infect animal species and even humans. Nearly all grazing animals are exposed to helminths, gastrointestinal nematodes and trematodes mainly (Charlier et al., 2016), while more than 50 % pets are infected (D'ambroso et al., 2022; Safarov et al., 2022), thus a great economic effort is made to minimize the damage through the administration of effective treatments. It has been estimated that more than 400 million € are spent yearly on anthelmintics in the European Union (Morgan et al., 2013), but this strategy reveals to be insufficient to prevent new frequent infections, so that regular deworming is necessary, which can result in increased environmental contamination by chemical residues or the appearance of strains resistant to anthelmintics (anthelmintic resistance) (Vercruysse et al., 2018).

Among the alternatives investigated to helminth control practices based on anthelmintics only, application of saprophytic filamentous fungi (SFF) as biological control agents against plant-parasitic nematodes and insect pests has been successfully carried out for decades (Baron et al., 2019; Poveda et al., 2020; Poveda, 2021). Some fungal species, in particular *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare & W. Gams (2001) and *Mucor circinelloides* Van Thiegem (1875), are antagonists of eggs of trematodes or gastrointestinal nematodes, whereas *Duddingtonia flagrans* (Dudd.) R.C. Cooke (1969) or *Monacrosporium thaumasium* (Drechsler) de Hoog & Oorschot (1985) develop traps in their mycelium to catch larvae of strongyles parasitizing animals (Canhão-Dias et al., 2020; Araújo et al., 2021). Moreover, it has been demonstrated the lack of adverse effects of *D. flagrans* on soil nematodes (Saumell et al., 2016), together with the innocuousness of daily administration of nutritional pellets containing chlamydospores of *M. circinelloides* and *D. flagrans* to heifers for two years (Voinot et al., 2021b).

Nevertheless, the use of SFF has slowed down in domestic, sylvatic, or captive wild species. In addition to regulatory issues, an important concern relies on proper ways to ensure that spores are correctly given to the animals. Most recent efforts have been focused on formulations that improve their oral administration to livestock, and a significant part of the trials consisted of providing them in grain seeds (Chandrawathani et al., 2002; Paraud et al., 2005), cereal flour (Healey et al., 2018; Braga et al., 2020; de Oliveira et al., 2021), and in a lesser extent, nutritional pellets (Aguilar-Marcelino et al., 2017; Hernández et al., 2018c; Voinot et al., 2020), energy blocks (Sagüés et al., 2011) or milled cereal soaked with aqueous solutions (Palomero et al., 2020; Voinot et al., 2021a). So far, only two commercial formulations containing chlamydospores of *D. flagrans* are available, Bioworma® and Bioverm® (Healey et al., 2018; Fausto et al., 2021).

According to the management of the animals, notable differences exist especially regarding their nutrition. Whereas livestock species are provided regularly (daily) with feed supplementation, this is not the case for others as horses or certain wild individuals captive in zoological parks. For the purpose to improve the potential for biological control of animal parasites through orally delivery of SFF, edible gelatin-based treats were elaborated with chlamydospores of a blend of *M. circinelloides* and *D. flagrans*, then tested on puppies, and baboons captive in a zoological garden. A second trial consisted of investigating the helpfulness of freeze-drying the gelatin foods.

2. Material and methods

2.1. Parasiticide fungi

Different strains of soil saprophytic fungi (SSF) were isolated from feces of livestock and captive animals, and soil samples also, then deposited at the Spanish Type Culture Collection (CECT, Valencia, Spain) (Arias et al., 2013; Hernández et al., 2017). In the present study, the ovicidal species *M. circinelloides* (CECT 20824) and the larvicidal *D. flagrans* (CECT 20823) were co-cultured in a submerged medium (COPFr) at RT with the aim to get elevated numbers of chlamydospores (Hernández et al., 2018a). The medium was composed by water, wheat and mineral salts (Arias et al., 2013).

2.2. Formulation of parasiticidal fungi as edible gelatin

2.2.1. Gelatin

Two types of gelatin-based foods were prepared in the Lab, one was obtained by mixing gelatin (Juncá Gelatines S.L., Spain), honey and liquid medium containing ≈ 3 – 5·10^6 chlamydospores of both fungi / mL, *M. circinelloides* and *D. flagrans*. The concentration was estimated by means of a Neubauer chamber (Ojeda-Robertos et al., 2008), using a total of 10 25-μL aliquots / L medium.

The blend was completely homogenized, heated under microwave for a brief period, placed into silicone molds and finally quenched at 4–6 °C to enhance gelling. This formulation enabled that each food provided a dosage of 3 – 6·10^7 chlamydospores of each parasiticide fungus. (Additional information can not be provided due to it is pending of registration).

To assess if the numbers of fungal chlamydospores did vary significantly through the gelification process, each month for a six-month period a quantity of 30 gelatins were each soaked into 10 mL water at 37 °C and stirred until completely melted. A total of five 25 μL of each blend was examined under an optical microscope at 20X by using a Neubauer chamber and counts indicated as numbers of chlamydospores / mL.

The reduction of the numbers of chlamydospores during the gelification was estimated according to the formula:

Reduction gelification (%) = [1 - ($Counts_{GELATIN}$ / $Counts_{SUBMERGED\ CULTURE}$)] × 100.

2.2.2. Dry gelatins

In order to increase the gelatin shelf life, part of the pieces was frozen at −35 °C and then water was removed by freeze-drying. The final products were packed into reusable plastic bags and stored at RT until administrated.

Examination of the dried gelatins was conducted to ascertain if the procedure might decrease the numbers of chlamydospores. Every month for six months, 30 gelatins were freeze-dried, then rehydrated by submerging each one into 10 mL water at 37 °C and stirred until complete melted. Finally, five 25 μL-aliquots of each solution were taken, and spores counted in a Neubauer chamber under an optical microscope at 20X and expressed as numbers per mL.

The reduction of the numbers of chlamydospores during the drying process was estimated as follows:

Reduction drying (%) = [1 - ($Counts_{DRY\ GELATIN}$ / $Counts_{GELATIN}$)] × 100.

Finally, for the purpose to determine if storage might influence the numbers of chlamydospores, a total of 160 gelatins were freeze-dried,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

then 20 analyzed monthly for eight months as pointed above, and results shown as numbers of chlamydospores / mL.

2.3. Animals

Evaluation of the two edible foods prepared with a blend of chlamydospores of *M. circinelloides* and *D. flagrans* was carried out in 3-month old Griffon bleu de Gascogne puppies ("Soñar'' commercial breeding kennel, 42°57′32.689′' N, 7°40′40.78′' W; Lugo, NW Spain), and adult baboons (*Papio hamadryas*) captive in the "Marcelle Zoological Park" (43°4′14.71″ N, 7°37′53.50″ W; Outeiro de Rei, NW Spain) (Palomero et al., 2020). First, infection by helminths was analyzed by means of the McMaster coprological technique with saturated saline solution (ρ = 1.2 g / dL), which makes possible the identification of protozoan cysts / oocysts and eggs of cestodes and nematodes (Hernández et al., 2018a; Voinot et al., 2021a). Briefly, three grams of each sample were weighed and placed in one bottle, then emulsified in 42 mL of water and shaken vigorously until completely broken down. This emulsion was filtered through a 150 μm pore diameter sieve and passed to two 15 mL glass tubes. After centrifuging at 1500 rpm for 10 min, the supernatant was discarded and the sediment homogenized in saturated saline solution, then aliquots taken carefully from the superior part of the tubes to fill a McMaster chamber, and finally observed under a light microscope at 10X (Viña et al., 2020). This procedure was repeated two times for each sample, and results expressed as eggs per gram of feces (EPG).

2.4. Design of study

2.4.1. Control groups

Because of the impossibility of keeping captive animals in control and treated groups at the same time, at the starting of the study-three fecal samples were collected per each individual directly from the soil and homogenized by mixing vigorously (Fig. 1). Feces of puppies were labelled as CP (control puppies), and those belonging to baboons as CB (control baboons). Three grams of each mixture were placed into eight plastic containers provided with four holes in the side walls for allowing proper aeration, then covered with a plastic lid and finally brought to a meadow for a 4-week period (Hernández et al., 2018b). The contents of two containers per animal were examined weekly by means of a modified McMaster technique (Hernández et al., 2018b; Voinot et al., 2021a). This modification consisted of that after centrifuging at 1500 rpm for 10 min, the sediment was homogenized in saturated saline solution, then aliquots of 100 μL were taken carefully from the top of the tubes, placed between glass slides and coverslips, and examined under a light microscope at 10X and 20X until a minimum of 100 eggs was analyzed (Viña et al., 2020). This procedure was repeated two times for each sample. It is important to note that identical numbers of *control* and *treated* groups were observed in each assay.

2.4.2. Assay I: Testing edible gelatin foods

Three groups of six 3-month old Griffon bleu de Gascogne puppies were given one gelatin with fungal spores thrice a week for eight weeks (PRG, puppies receiving gelatins). After this period, three fecal samples were collected per each animal directly from the soil, homogenized by mixing vigorously and proceeded as mentioned above (2.4.1.).

The same designing was performed on baboons, but two of them refused to ingest these treats, and irregular and infrequent intake was recorded among the others. Accordingly, the assay was abandoned.

2.4.3. Assay II: Testing edible dried gelatin foods

Two groups of six Griffon bleu de Gascogne puppies (3-month old) (different to those in Assay I), and one group of six adult baboons were used in the second assay for testing edible dried gelatins. As mentioned in 2.4.1., control fecal samples were prepared at the starting of the assay. Later, all animals were given one dry gelatin treat, thrice a week for an interval of eight weeks, and at the end of this period three fecal samples were collected (per each animal) directly from the soil and homogenized by mixing vigorously. Next step consisted of placing three grams of each mixture into eight plastic containers and labelling them as PRDG (puppies receiving dried gelatins) or BRDG (baboons receiving dried gelatins), then continuing as stated prior (2.4.1.). Given the impossibility of having a greater number of baboons, this assay was performed

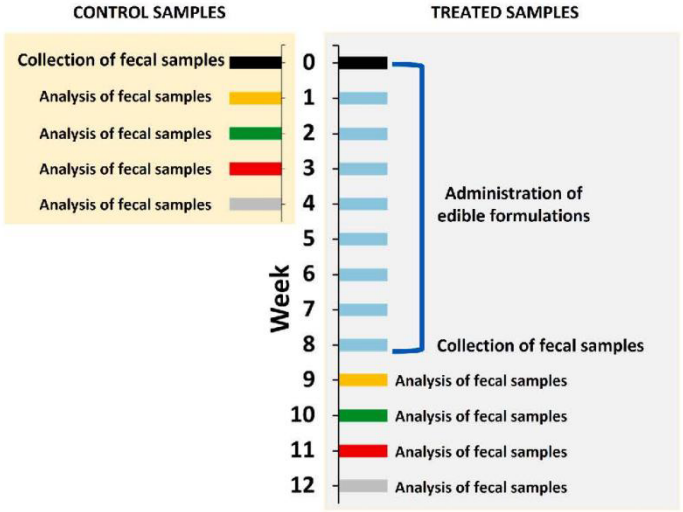


Fig. 1. Design of the study for testing the appropriateness of edible formulations of *M. circinelloides* (ovicide) and *D. flagrans* (larvicide) for the control of helminths affecting pups and captive baboons.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

two more times, at intervals of 4 months.

The experimental design was approved by the Ethical committee of the University of Santiago de Compostela (Spain; protocol number CTM2015-65954b) and complied with the Directive 2010 / 63 / EU.

2.5. Evaluation of the parasiticide effect

Eggs of helminths observed by means of the modified McMaster test were classified as enduringly unviable when presenting loss of shell continuity, contraction or rupture, cytoplasmic vacuolization, and abnormal morphology of inner larvae (Cazapal-Monteiro et al., 2015; Hernández et al., 2018b). Likewise, the viable eggs were classified into infective when presenting a L2 larva inside for the ascarids, and a L1 for the trichurids.

The reduction of the viability (VR) and the Soil Contamination Index (SCI) were calculated according to Viña et al. (2020):

VR (%) = [(100 − % Viable EPG_{WeekX})/% Viable EPG_{Week0}] × 100.

SCI (%) = (% Viable Eggs × % Eggs with L2) / 100.

2.6. Evaluation of the usefulness of edible products containing chlamydospores of parasiticidal fungi

The criteria considered for the evaluation of the appropriateness of edible formulations with chlamydospores of *M. circinelloides* and *D. flagrans* for the control of helminths among animals consisted of:

- Easiness of manufacturing:

0: No problems - Reading and interpreting the protocol is very easy and, together with the elaboration, takes < 5 min.

1: Easy - Reading and interpreting the protocol is easy and, together with the elaboration, requires 5–10 min.

2: Medium difficulty - Reading and interpreting the protocol is somewhat difficult, and together with the elaboration takes 10–20 min.

3: Difficult - Reading and interpreting the protocol is difficult, and together with the elaboration it requires > 20 min.

- Easiness of administration:

0: No problems - Treats are placed in the feeder along with cereal or feed.

1: Easy - The treats are chopped up and placed in the feeder.

2: Medium difficulty - It is necessary to tempt the animals with cereals or feed to get them to approach the feeders, and at this time treats are provided.

3: Difficult - It is needed to physically separate or even immobilize the animals.

- Acceptance level by the target animals:

0: Immediate (<5 s).
1: High (5–20 s).
2: Moderate (21 – 60 s).
3: Rejected.

- Expiration interval:

0: < 7 days.
1: < 15 days.
2: < 30 days.
3: >30 days.

2.7. Statistical analysis

Distribution of data collected in the current research was analyzed first for their normal distribution, by means of the Kolmogorov-Smirnov and the Levene's tests. Most data were not normally distributed, hence the Mann-Whitney U and Kruskal-Wallis non-parametric probes were run.

All tests were carried out by using the statistical package SPSS, version 20 (IBM SPSS Inc., Chicago, IL, USA), at a significance level of $P < 0.05$.

Due to differences between the replicates of each assay were not observed, these data were pooled and analyzed as a single set.

3. Results

3.1. Identification of parasites in coprological analyses

Eggs of the gastrointestinal nematodes *T. canis* and of *Trichuris* sp. were identified in the feces of puppies and baboons, respectively.

3.2. Analysis of edible formulations with chlamydospores of M. Circinelloides and D. Flagrans

3.2.1. Appropriateness of edible formulations

Preparation of gelatins with chlamydospores of parasiticidal fungi resulted very simple (Table 1), the administration was very easy and these foods well accepted (puppies took them in less than five seconds) for treats<15 days old. After 21 days, many of the gelatins had lost their consistency, making it difficult to administer. In contrast, baboons did not accept the gelatins as willingly, as some refused, and others did so with difficulty and after a period (more than 10 min).

Dry gelatins were very easy to prepare also (Table 1) and preserved at RT for more than 8 months, without any sign of alteration. Administration was very simple and well accepted by pups (took them in less than five seconds), but occasionally it was needed to break them into short pieces and mix with fruit, cereal grains or seeds for baboons.

3.2.2. Counts of chlamydospores in edible foods

After the elaboration of gelatins, non-significant variations were recorded in the numbers of chlamydospores of *M. circinelloides* or *D. flagrans* with respect to the initial quantities in the submerged culture (Table 2), and an average reduction of 1.78 ± 0.83 % (Z = -1.239, $P = 0.215$) and 1.89 ± 0.73 % (Z = -1.214, $P = 0.225$) was respectively obtained.

Changes in the counts of chlamydospores of both parasiticide fungi after the gelatins were dried are summarized in Table 2. A significant reduction in the numbers was achieved, with average values of 8.87 ± 2.81 % (Z = -5.608, $P = 0.001$) for *M. circinelloides* and 9.99 ± 2.69 % (Z

Table 1
Appropriateness of edible formulations for the administration of chlamydospores of the parasiticide fungi *Mucor circinelloides* and *Duddingtonia flagrans*.

	Qualification	Interpretation	Gelatin	Dry gelatin
Manufacturing	0	No problems	X	X
	1	Easy		
	2	Medium difficulty		
	3	Difficult		
Administration	0	No problems	X	X
	1	Easy		
	2	Medium difficulty		
	3	Difficult		
Acceptance level	0	Immediate (<5 s)	X	X
	1	High (5–20 s)		
	2	Moderate (21 – 60 s)		
	3	Rejected		
Expiration interval	0	< 7 days		
	1	< 15 days	X	
	2	< 30 days		
	3	greater than 30 days		X

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Table 2
Counts of chlamydospores of *M. circinelloides* and *D. flagrans* in gelatins and dried gelatins.

		Mucor circinelloides (chlamydospores / mL)				*Duddingtonia flagrans* (chlamydospores / mL)			
Month		Average (CI 95 %)	SD	% Reduction gelification	% Reduction drying	Average (CI 95 %)	SD	% Reduction gelification	% Reduction drying
1	Submerged culture	$4.2{\cdot}10^6$((2.9 – 5.6) $\cdot10^6$)	$1.5{\cdot}10^5$	1.7 ± 1.3 (0 – 13) U = -0.503		$4.1{\cdot}10^6$((2.8 – 5.4) $\cdot10^6$)	$1.5{\cdot}10^5$	1.7 ± 0.7 (1.5 – 2) U = -0.510	
	Gelatin	$4.2{\cdot}10^6$((3.3 – 5) $\cdot10^6$)	$9.1{\cdot}10^4$	$P = 0.615$	8.5 ± 2.6 (7.5 – 9.5) U = -2.122 $P = 0.034$	$4{\cdot}10^6$((2.5 – 5.5) $\cdot10^6$)	$1.7{\cdot}10^5$	$P = 0.610$	9.1 ± 2.7 (8.1 – 10.1) U = -1.804 $P = 0.071$
	Dry gelatin	$3.7{\cdot}10^6$((0.9 – 6.5) $\cdot10^6$)	$3.2{\cdot}10^5$			$3.6{\cdot}10^6$((3.2 – 4) $\cdot10^6$)	$0.4{\cdot}10^5$		
2	Liquid culture	$4{\cdot}10^6$((2.9 – 5.6) $\cdot10^6$)	$5{\cdot}10^5$	1.4 ± 0.9 (0 – 9) U = -0.636		$4.8{\cdot}10^6$((3.2 – 6.5) $\cdot10^6$)	$1.8{\cdot}10^5$	1.9 ± 0.9 (1.6 – 2.7) U = -0.554	
	Gelatin	$3.9{\cdot}10^6$((3.6 – 4.2) $\cdot10^6$)	$0.3{\cdot}10^5$	$P = 0.525$	9.1 ± 3.3 (7.8 – 10.3) U = -2.499	$4.7{\cdot}10^6$((3.3 – 6.1) $\cdot10^6$)	$1.6{\cdot}10^5$	$P = 0.579$	11.1 ± 2.9 (10 – 12.2) U = -2.669
	Dry gelatin	$3.5{\cdot}10^6$((2.8 – 4.2) $\cdot10^6$)	$0.8{\cdot}10^5$		$P = 0.012$	$4.3{\cdot}10^6$((1.9 – 6.6) $\cdot10^6$)	$2.6{\cdot}10^5$		$P = 0.008$
3	Liquid culture	$4.4{\cdot}10^6$((3.2 – 5.6) $\cdot10^6$)	$1.4{\cdot}10^5$	1.1 ± 0.5 (0 – 5.5) U = -0.717		$4.7{\cdot}10^6$((3.9 – 5.5) $\cdot10^6$)	$0.9{\cdot}10^5$	1.8 ± 0.6 (1.6 – 2) U = -0.547	
	Gelatin	$4.4{\cdot}10^6$((3.4 – 5.4) $\cdot10^6$)	$1.1{\cdot}10^5$	$P = 0.473$	8.1 ± 2.6 (7.1 – 9.1) U = -2.469	$4.6{\cdot}10^6$((3.7 – 5.5) $\cdot10^6$)	$1{\cdot}10^5$	$P = 0.584$	9.4 ± 2.7 (8.4 – 10.4) U = -1.982
	Dry gelatin	$4.1{\cdot}10^6$((1.7 – 6.4) $\cdot10^6$)	$2.6{\cdot}10^5$		$P = 0.014$	$4.3{\cdot}10^6$((2.1 – 6.4) $\cdot10^6$)	$2.4{\cdot}10^5$		$P = 0.048$
4	Liquid culture	$4.4{\cdot}10^6$((0.15 – 1) $\cdot10^7$)	$6.6{\cdot}10^5$	1.8 ± 1.3 (0 – 14) U = -0.747		$4.4{\cdot}10^6$((1.6 – 7.3) $\cdot10^6$)	$3.2{\cdot}10^5$	1.9 ± 0.7 (1.7 – 2.2) U = -0.591	
	Gelatin	$4.3{\cdot}10^6$((1 – 9.6) $\cdot10^6$)	$5.9{\cdot}10^5$	$P = 0.455$	9.5 ± 1.9 (8.7 – 10.2) Z = -2.610	$4.4{\cdot}10^6$((1.1 – 7.6) $\cdot10^6$)	$3.6{\cdot}10^5$	$P = 0.554$	9.7 ± 2.5 (8.7 – 10.6) U = -2.189
	Dry gelatin	$3.9{\cdot}10^6$((0.97 – 8.5) $\cdot10^6$)	$5.1{\cdot}10^5$		$P = 0.009$	$3.9{\cdot}10^6$((1.8 – 7.7) $\cdot10^6$)	$4.2{\cdot}10^5$		$P = 0.029$
5	Liquid culture	$4.3{\cdot}10^6$((0.41 – 1.3) $\cdot10^7$)	$9.4{\cdot}10^5$	0.95 ± 0.07 (0.3 – 1.6) U = -0.569		$4.3{\cdot}10^6$((0.07 – 8.6) $\cdot10^6$)	$4.8{\cdot}10^5$	1.8 ± 0.8 (1.5 – 2.1) U = -0.673	
	Gelatin	$4.3{\cdot}10^6$((0.41 – 1.3) $\cdot10^7$)	$9.3{\cdot}10^5$	$P = 0.569$	8.9 ± 2.8 (7.8 – 9.9) U = -2.395	$4.3{\cdot}10^6$((0.1 – 8.4) $\cdot10^6$)	$4.6{\cdot}10^5$	$P = 0.501$	10.2 ± 2.2 (9.4 – 11.1) U = -2.625
	Dry gelatin	$3.8{\cdot}10^6$ ($0.5 – 1.3{\cdot}10^7$)	$1{\cdot}10^6$		$P = 0.017$	$3.8{\cdot}10^6$ ($1.2 – 8.8{\cdot}10^6$)	$5.5{\cdot}10^5$		$P = 0.009$
6	Liquid culture	$5.4{\cdot}10^6$((1.7 – 9.1) $\cdot10^6$)	$4.1{\cdot}10^5$	0.9 ± 0.4 (0 – 4.7) U = -0.673		$3.8{\cdot}10^6$((3 – 4.6) $\cdot10^6$)	$0.9{\cdot}10^5$	2.1 ± 0.6 (1.8 – 2.3) U = -0.532	
	Gelatin	$5.4{\cdot}10^6$((1.5 – 9.1) $\cdot10^6$)	$4.3{\cdot}10^5$	$P = 0.501$	9.2 ± 3.4 (8 – 10.5) U = -2.418	$3.7{\cdot}10^6$((2.9 – 4.5) $\cdot10^6$)	$0.1{\cdot}10^5$	$P = 0.595$	10.5 ± 2.7 (9.5 – 11.5) U = -2.203
	Dry gelatin	$4.9{\cdot}10^6$((0.05 – 1) $\cdot10^7$)	$6.1{\cdot}10^5$		$P = 0.016$	$3.2{\cdot}10^6$((2.6 – 3.8) $\cdot10^7$)	$0.7{\cdot}10^5$		$P = 0.028$

= -5.387, $P = 0.001$) for *D. flagrans*.

Table 3 contains data on the numbers of chlamydospores during an 8-month storage period. Non-significant variations were observed with the time elapsed since drying (P greater than 0.05).

3.3. Assay I: gelatin-based foods given to puppies

As drawn in Table 4, viability of eggs of *T. canis* was 96 ± 2 % at the beginning of the study, and four weeks later was reduced to 90 ± 4 % in the control samples (CP), by 48 ± 9 % in the PRG (puppies receiving gelatins), which represents a VR of 7 % and 50 %, respectively. Statistical differences between the two groups were demonstrated (Z = -6.363, $P = 0.001$).

Infective eggs of *T. canis* (containing a L2) appeared from the 1st week (wk) (Fig. 2a) in CP, and values around 80 % were obtained at the end of the study. In PRG, eggs with L2 were first observed since the 3rd wk, with the highest percentages (44 %) by the end of the assay (Fig. 2a) (Z = -3.447, $P = 0.001$).

The values of the Soil Contamination Index (SCI) increased along the study until 70 % (4th wk) in CP, by 20 % in PRG (Table 4).

3.4. Assay II: Evaluation of dehydrated gelatin-based pieces

3.4.1. In puppies

The viability of eggs of *T. canis* in the control puppies (CP) decreased slightly (2 – 7 %) for one month, with values near to 90 % (Table 4). In the puppies receiving dehydrated gelatins containing chlamydospores of *M. circinelloides* and *D. flagrans* (PRDG), a significant reduction between the 2nd wk (VR = 13 %) and the 4th wk (VR = 48 %) was recorded (Z = -5.666, $P = 0.001$).

The presence of infective eggs (with L2) in the controls (CP) was recorded since the 2nd wk, the values increased fast and the highest

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Table 3
Variations on counts of chlamydospores of *M. circinelloides* and *D. flagrans* in dried gelatins during an 8-month storage period.

Month	*Mucor circinelloides* (chlamydospores / mL) Average CI 95 %	SD	*Duddingtonia flagrans* (chlamydospores / mL) Average CI 95 %	SD
1	$4.01{\cdot}10^6$ ($3.7–4.32){\cdot}10^6$	$6.62{\cdot}10^5$	$3.82{\cdot}10^6$(3.41 – 4.24)$\cdot10^6$	$8.87{\cdot}10^5$
2	$3.83{\cdot}10^6$ ($3.65–4.01){\cdot}10^6$	$3.85{\cdot}10^5$	$3.9{\cdot}10^6$(3.56 – 4.24)$\cdot10^6$	$7.32{\cdot}10^5$
3	$4.29{\cdot}10^6$ ($4.08–4.50){\cdot}10^6$	$4.44{\cdot}10^5$	$3.56{\cdot}10^6$(3.31 – 3.81)$\cdot10^6$	$5.36{\cdot}10^5$
4	$3.99{\cdot}10^6$ ($3.84–4.14){\cdot}10^6$	$3.18{\cdot}10^5$	$3.64{\cdot}10^6$(3.43 – 3.85)$\cdot10^6$	$4.57{\cdot}10^5$
5	$3.99{\cdot}10^6$ ($3.76–4.23){\cdot}10^6$	$5.08{\cdot}10^5$	$3.88{\cdot}10^6$(3.71 – 4.04)$\cdot10^6$	$3.46{\cdot}10^5$
6	$4.1{\cdot}10^6$ ($3.86–4.35){\cdot}10^6$	$5.24{\cdot}10^5$	$3.62{\cdot}10^6$(3.39 – 3.85)$\cdot10^6$	$4.9{\cdot}10^5$
7	$4.13{\cdot}10^6$ ($3.94–4.33){\cdot}10^6$	$4.1{\cdot}10^5$	$4.06{\cdot}10^6$(3.88 – 4.24)$\cdot10^6$	$3.84{\cdot}10^5$
8	$4.18{\cdot}10^6$ ($3.97–4.39){\cdot}10^6$	$5.19{\cdot}10^5$	$3.85{\cdot}10^6$(3.51 – 4.2)$\cdot10^6$	$8.5{\cdot}10^5$
Kruskal-Wallis test	$\chi^2 = 12.607$ $P = 0.082$		$\chi^2 = 12.756$ $P = 0.078$	

percentages were obtained at the end of the study (81 %) (Fig. 2b). In the PRDG, eggs with a L2 were observed after three weeks, and found in 44 % at the end of the assay (Z = -2.595, $P = 0.009$).

Concerning the SCI, values around 73 % and 20 % were obtained at the end of the study in CP and PRDG, respectively (Table 4).

Comparison between the parasiticide effect reached by providing puppies gelatins or dry gelatins is summarized in Table 4. Viable eggs of *T. canis* oscillated between 96 and 48 % and 95 – 49 % in puppies receiving gelatins or dried gelatins, respectively, with reduction values about 50 % (Z = -0.092, $P = 0.927$). Regarding the infective eggs, percentages of 50 % were obtained in CRG, by 48 % in CRDG, with a SCI of 20 % in both groups (Z = -0.455, $P = 0.649$). Differences between results obtained in the respective control groups (CP1 and CP2) were not significant (Z = -0.083, $P = 0.934$) and (Z = -0.753, $P = 0.451$).

3.4.2. *In baboons*

Viability of eggs of *Trichuris* sp. in the control feces of baboons (CB) maintained at 89 – 97 % (Table 4), while in BRDG reduced to 44 % after four weeks of exposure to the parasiticide fungi. After one month, the values of VR were 8 % in CB and 54 % in BRDG (Z = -6.667, $P = 0.001$).

Infective eggs (containing a L1 inside) were first observed since the 3rd wk in the controls (CB), and percentages close to 30 % attained at the 4th wk (Fig. 3). In the feces exposed to the chlamydospores (BRDG), 14 % of the eggs had a L1 at the end of the study (Z = -3.777, $P = 0.001$).

After four weeks, the SCI values for the control baboons (CB) were 26 %, and 5 % in those receiving dry gelatins (BRDG) (Table 4).

4. Discussion

The main advantages of using certain saprophytic filamentous fungi for the control of helminths affecting animal species are centered on the possibility of reducing the risk of infection to prevent damage to hosts and minimize the need for frequent application of chemical dewormers (Ortiz Pérez et al., 2017; Mendoza et al., 2018). In the current investigation, a new way of administration of SFF consisting of gelatin-based treats enriched with chlamydospores of *M. circinelloides* and *D. flagrans* given to pups infected by *T. canis* and baboons by *Trichuris* sp., has been tried. These foods were easy to prepare and puppies took them quickly (in less than five minutes). Four weeks later, viability of eggs of the gastrointestinal nematode *T. canis* in fecal samples was halved, in agreement with previous investigations involving puppies given nutritional pellets pre-blended with the fungal chlamydospores (Hernández et al., 2018a). Some *in vitro* studies pointed out that filamentous fungi such as *P. chlamydosporia* or *Purpureocillium lilacinum* (Thom) Luangsaard, Houbraken, Hywel-Jones & Samson (2011) have a notable antagonistic activity on eggs of *T. canis* (Carvalho et al., 2010; Maciel et al., 2012; Araujo et al., 2013). By spraying spores of *Trichoderma atrobrunneum* F.B. Rocha, Chaverri & Jaklitsch (2015) or *Clonostachys rosea* Schroers, Samuels, Seifert & W. Gams (1999) directly on feces of pigs, Viña et al. (2020) reported an ovicidal effect on 50 % and 66 % (respectively) on the eggs of the ascarid *Ascaris suum*, similar to that attained on eggs of other ascarid, *Toxascaris leonina*, in feces of captive lynxes exposed to *M. circinelloides* (Hernández et al., 2018b). By opposite, some baboons refused to take the gelatins and others did so with

Table 4
Analysis of viability of eggs of *T. canis* and *Trichuris* sp. in feces of puppies and captive baboons. STH: soil-transmitted helminths; VE: viable eggs; VR: viability reduction; PRG: feces taken after an interval of eight weeks providing the gelatins to the puppies; CP: fecal samples collected prior to the administration of the fungi (untreated controls); PRDG: feces taken after an interval of eight weeks giving dry gelatins to the puppies; BRDG: feces taken after an interval of eight weeks giving dry gelatins with chlamydospores of *M. circinelloides* and *D. flagrans* to captive baboons; CB: fecal samples collected prior to the administration of the fungi (untreated controls).

Formulation	Animal species	Groups	STH	Week	Nr Eggs analyzed		% VE (x ± SD)		% VR		% SCI	
					CP1	PRG	CP1	PRG	CP1	PRG	CP1	PRG
Gelatin	Puppies *Canis familiaris* Linnaeus, 1758	3	*Toxocara canis*	0	2043	2066	97 ± 3	96 ± 2	–	–	–	–
				1	1946	1958	95 ± 2	92 ± 3	2	4	–	–
				2	1919	1923	93 ± 3	81 ± 5	4	15	4	–
				3	1932	1874	91 ± 3	66 ± 9	6	31	59	21
				4	1882	1854	90 ± 4	48 ± 9	7	50	70	20
				Week	CP2	PRDG	CP2	PRDG	CP1	PRDG	CP2	PRDG
Dry gelatin	Puppies *Canis familiaris* Linnaeus, 1758	2	*Toxocara canis*	0	1322	1320	97 ± 2	95 ± 2	–	–	–	–
				1	1354	1268	95 ± 3	91 ± 2	2	5	–	–
				2	1276	1265	93 ± 5	83 ± 4	4	13	4	–
				3	1292	1259	92 ± 2	67 ± 8	4	30	63	18
				4	1270	1254	90 ± 5	49 ± 8	7	48	73	20
				Week	CB	BRDG	CB	BRDG	CB	BRDG	CB	BRDG
	Baboons *Papio hamadryas* Linnaeus, 1758	3	*Trichuris* sp.	0	2008	2079	97 ± 2	96 ± 3	–	–	–	–
				1	1970	1931	95 ± 3	89 ± 4	2	7	–	–
				2	1930	1935	92 ± 4	83 ± 3	5	13	–	–
				3	1894	1866	90 ± 3	69 ± 5	6	27	18	–
				4	1864	1851	89 ± 5	44 ± 6	8	54	26	5

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

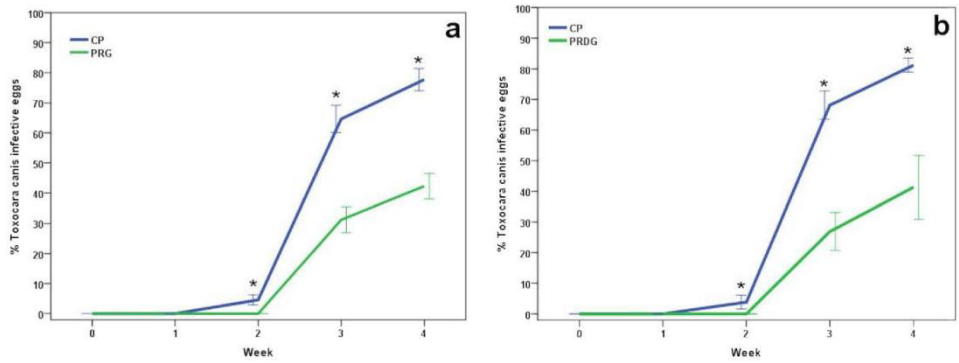


Fig. 2. Infective eggs of *T. canis* in feces of puppies. a) Effect of the administration of gelatin-treats containing chlamydospores of *M. circinelloides* and *D. flagrans*. b) Effect of the administration of dry gelatin-treats containing chlamydospores of *M. circinelloides* and *D. flagrans*. PRG: feces taken after an interval of eight weeks providing the gelatins to the puppies; CP: fecal samples collected prior to the administration of the fungi (untreated controls); PRDG: feces taken after an interval of eight weeks giving dry gelatins to the puppies. Results are means ± 2SD. (*): significant differences between the two groups.

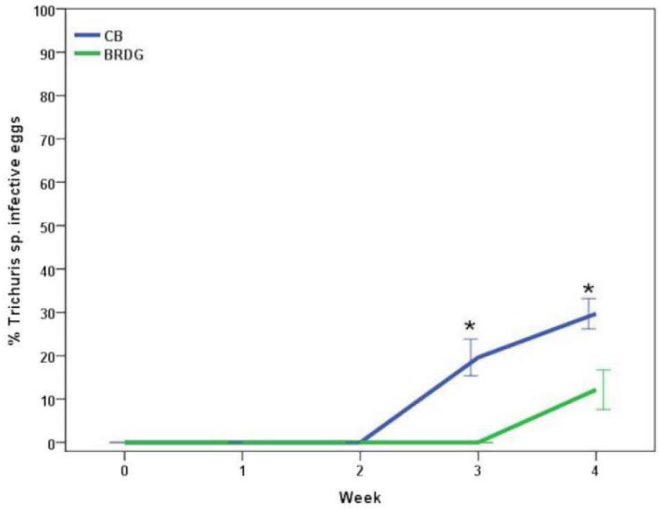


Fig. 3. Infective eggs of *Trichuris* sp. in feces of captive baboons. BRDG: feces taken after an interval of eight weeks giving dry gelatins with chlamydospores of *M. circinelloides* and *D. flagrans* to captive baboons; CB: fecal samples collected prior to the administration of the fungi (untreated controls). Results are means ± 2SD. (*): significant differences between the two groups.

difficulty. Another issue was the need for keeping gelatins refrigerated to maintain their consistency, but melting after 15–20 days complicated their handling and administration beyond this interval. In an attempt to prolong their shelf-life, the gelatin-based treats were dehydrated and tested on other groups of puppies infected by *T. canis*, as well as on baboons passing eggs of *Trichuris* sp. Similar results to those described in the first assay (with gelatin treats) were attained among the puppies, in agreement also with a previous study involving pups receiving nutritional pellets sprayed the same blend of parasiticide chlamydospores (Hernández et al., 2018a). Viability of eggs of *Trichuris* sp. in baboon feces was halved, but dried gelatins were occasionally chopped and mixed with fruit, cereals, or seeds to facilitate intake. Decreasing water activity to almost zero avoids the disintegration of treats, which can be easily handled and transported, besides being preserved at room temperature for months. When stored taking care to avoid humidity and direct exposure to sunlight, the external appearance is not modified and fungal growth does not occur, which is relevant for animal owners or keepers.

Much of the research conducted so far involving the use of certain strains of SFF against different helminths capable of infecting animals has been focused on livestock, mainly ruminants (Vilela et al., 2016; Canhão-Dias et al., 2020; Rodrigues et al., 2020; Araújo et al., 2021). For

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

this purpose, suitable formulations have been targeted that allow oral administration of fungal spores/mycelium as cereal meal, nutritional pellets or energy blocks (Sagüés et al, 2011; Healey et al., 2018; Voinot et al., 2021a). However, it should be noted that certain animal species (as pets) do not receive these formulations due to the absence of commercially available products (so far), or because they are not part of their nutrition. In many areas, horses are kept under grazing regimes and rarely (if ever) receive supplementation (Hernández et al., 2018c). In the case of captive animal species in zoos, certain aspects related to economic profit can complicate the situation. There is a high number of species with particular nutritional requirements, resulting in the quantities of feedstuff regularly produced being far lower than those for livestock. All these concerns seem to severely interfere with the possibilities of considering strategies based on biological agents for the control of helminths, so new ones should be designed to help enhance the implementation of this sustainable solution.

Regarding the preparation of the two edible formulations, a crucial issue relies on that the concentration of chlamydospores might be reduced. As expected, minor and non-significant variations were obtained in the preparation of the gelatin treatments. However, the fungal chlamydospores counts were found to decrease significantly by about 10 % after freeze-drying the gelatins, though it is noticeable to point that a similar parasiticidal activity was found among puppies receiving the gelatin-treats or those given the dried gelatins. Moreover, in the present investigation, slight and non-significant variations were observed during an 8-month storage period, which underlines the beneficial effect that can be achieved by drying the gelatins.

Unlike helminths that affect plants, which are always found in the soil, in those that infect animals or even people only some stages will be found in the environment and others inside the hosts. For decades, deworming of animals has often been considered the only measure for helminth control, and overusing or underdosing identified as dosage errors which can lead to efficacy percentages lower than expected, and even to the development of nematode resistance to anthelmintics (Vercruysse et al., 2011; Moudgil & Singla, 2018; Lahat et al., 2021). This emphasizes the need for additional preventive strategies to improve and extend the success of treatment, and to evade the development of resistance to anthelmintics (Goossens et al., 2005). By considering that animals become infected by their exposure to infective stages developing in the soil (environment), the ability to permanently damage the eggs of certain helminths, or to stop or delay egg-development reveals essential to prevent it. In the present research, administration of gelatins or dried gelatins with chlamydospores of *M. circinelloides* and *D. flagrans* to puppies resulted in percentages of infective eggs of *T. canis* half of those developing in the absence of chlamydospores; data collected in baboons given dried gelatins showed that eggs of *Trichuris* sp. with a first-stage larva inside (the infective stage) dropped to one third. It appears very conceivable that success of any program for the control of these parasites depends on decreasing the risk of animals can infect again, which is directly related to the level of soil contamination by infective stages (Maesano et al., 2014; Palomero et al., 2020). In the present research, estimation of the Soil Contamination Index (based on the percentages of viable eggs which developed to the infective stage) showed values in control feces (without exposure to the fungi) of puppies were threefold higher than in the treated samples (collected after two months taking chlamydospores), and fivefold higher in baboons, confirming that the risk of infection can be decreased threefold in the presence of SFF, as demonstrated by Viña et al. (2020).

5. Conclusions

Elaboration of edible gelatins with chlamydospores of *M. circinelloides* and *D. flagrans* affords a very interesting and practical formulation for the administration of these saprophytic filamentous fungi to pets, though it is necessary to keep them under refrigeration to maintain their consistency. Dehydration of these gelatins does not affect their helminthicidal activity, provides very safe foods easy to preserve at room temperature, and to administer to pets and wild captive animals as treats, with the aim to reach a notable beneficial effect in reducing their risk of infection by soil-transmitted helminths. These formulations appear highly interesting and attractive to develop successful strategies for the control of helminths among pets (private houses, dog kennels or shelters), and animals captive in zoological parks.

CRediT authorship contribution statement

Adolfo Paz-Silva: Project administration, Conceptualization, Writing – review & editing, Funding acquisition. **Rami Salmo:** Data curation, Investigation. **Cándido Viña:** Data curation, Investigation, Resources. **Antonio Miguel Palomero:** Conceptualization, Methodology, Validation. **José Ángel Hernández:** Validation, Visualization. **Rita Sánchez-Andrade:** Conceptualization, Writing – review & editing, Funding acquisition. **Cristiana Cazapal-Monteiro:** Data curation, Investigation, Writing – original draft. **María Sol Arias:** Formal analysis, Conceptualization, Methodology, Supervision, Validation.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

We would like to express our profound gratitude to the Head of the "Granja Gayoso Castro" (Deputación Provincial de Lugo, Spain) for the valuable collaboration in producing fungal spores, and to "Marcelle Natureza" Zoological Park for helping us with the fecal sampling.

*Competing **interests***

All authors declare the absence of any financial or personal interests that could inappropriately influence the present investigation. The final article has been approved by all authors.

Funding

This trial was partly supported by the Research Projects CTM2015-65954-R and RYC-2016- 21407 (Ministerio de Economía y Competitividad, Spain; FEDER), and ED431F 2018/03 (Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria, Xunta de Galicia, Spain).

References

Aguilar-Marcelino, L., Mendoza-de-Gives, P., Torres-Hernández, G., López-Arellano, M. E., Becerril-Pérez, C.M., Orihuela-Trujillo, A., Torres-Acosta, J., Olmedo-Juárez, A., 2017. Consumption of nutritional pellets with *Duddingtonia flagrans* fungal chlamydospores reduces infective nematode larvae of *Haemonchus contortus* in faeces of Saint Croix lambs. J. Helminthol. 91, 665–671. https://doi.org/10.1017/S0022149X1600081X.

Araujo, J.M., Araújo, J.V., Braga, F.R., Ferreira, S.R., Tavela, A.O., 2013. Predatory activity of chlamydospores of the fungus *Pochonia chlamydosporia* on *Toxocara canis* eggs under laboratory conditions. Rev Bras Parasitol Vet. 22, 171–174. https://doi.org/10.1590/s1984-29612013000100033.

Araújo, J.V., Braga, F.R., Mendoza-de-Gives, P., Paz-Silva, A., Vilela, V.L.R., 2021. Recent Advances in the Control of Helminths of Domestic Animals by Helminthophagous Fungi. Parasitologia 1, 168–176. https://doi.org/10.3390/parasitologia1030018.

Arias, M.S., Cazapal-Monteiro, C.F., Suárez, J., Miguélez, S., Francisco, I., Arroyo, F.L., Suárez, J.L., 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. 2013, 1–8.

Baron, N.C., Rigobelo, E.C., Zied, D.G., 2019. Filamentous fungi in biological control: current status and future perspectives. Chil. J. Agric. Res. 79, 307–315.

Braga, F.R., Ferraz, C.M., Silva, E.M., Araújo, J.V., 2020. Efficiency of the Bioverm® (*Duddingtonia flagrans*) fungal formulation to control *in vivo* and *in vitro* of

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Haemonchus contortus and *Strongyloides papillosus* in sheep. 3. Biotech 10, 62. https://doi.org/10.1007/s13205-019-2042-8.
Canhão-Dias, M., Paz-Silva, A., Madeira de Carvalho, L.M., 2020. The efficacy of predatory fungi on the control of gastrointestinal parasites in domestic and wild animals-A systematic review. Vet Parasitol. 283, 109173 https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109173.
Carvalho, R.O., Araújo, J.V., Braga, F.R., Araujo, J.M., Alves, C.D., 2010. Ovicidal activity of *Pochonia chlamydosporia* and *Paecilomyces lilacinus* on *Toxocara canis* eggs. Vet Parasitol. 169, 123–127. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.12.037.
Cazapal-Monteiro, C.F., Hernández, J.A., Arroyo, F.L., Miguélez, S., Romasanta, Á., Paz-Silva, A., Sánchez-Andrade, R., Arias, M.S., 2015. Analysis of the effect of soil saprophytic fungi on the eggs of *Baylisascaris procyonis*. Parasitol Res. 114, 2443–2450. https://doi.org/10.1007/s00436-015-4440-0.
Chandrawathani, P., Jamnah, O., Waller, P.J., Höglund, J., Larsen, M., Zahari, W.M., 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. https://doi.org/10.1051/vetres:2002049.
Charlier, J., De Waele, V., Ducheyne, E., van der Voort, M., Vande Velde, F., Claerebout, E., 2016. Decision making on helminths in cattle: diagnostics, economics and human behaviour. Ir Vet J. 69, 14. https://doi.org/10.1186/s13620-016-0073-6.
Chaverri, P., Rocha, F.B., Jaklitsch, W., Gazis, R., Degenkolb, T., Samuels, G.J., 2015. Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. Mycologia 107, 558–590. https://doi.org/10.3852/14-147.
Cooke, R.C., 1969. Two nematode-trapping hyphomycetes, *Duddingtonia flagrans* gen. et comb.nov. and *Monacrosporium mutabilis* sp.nov. Trans. Br. Mycol. Soc. 53, 305–319. https://doi.org/10.1016/S0007-1536(69)80070-7.
D'ambroso Fernandes, F., Rojas Guerra, R., Segabinazzi Ries, A., Felipetto Cargnelutti, J., Sangioni, L.A., Vogel, S.F., F.,, 2022. Gastrointestinal helminths in dogs: occurrence, risk factors, and multiple antiparasitic drug resistance. Parasitol Res. 121, 2579–2586. https://doi.org/10.1007/s00436-022-07599-0.
Hoog, G.S. de, Oorschot, C.A.N. van, 1985. Taxonomy of the Dactylaria complex, VI. Key to the genera and check-list of epithets. Stud. Mycol. 26, 97-122. https://www.studiesinmycology.org/sim/Sim26/full%20text.htm.
de Oliveira, L., Dias, F., Melo, A., de Carvalho, L.M., Silva, E.N., Araújo, J.V., 2021. Bioverm® in the Control of Nematodes in Beef Cattle Raised in the Central-West Region of Brazil. Pathogens 10, 548. https://doi.org/10.3390/pathogens10050548.
Fausto, G.C., Fausto, M.C., Vieira, Í.S., Freitas, S.G., Carvalho, L.M., Oliveira, I.C., Silva, E.N., Campos, A.K., Araújo, J.V., 2021. Formulation of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in the control of equine gastrointestinal parasitic nematodes. Vet Parasitol. 295, 109458 https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2021.109458.
Gams, W., Zare, R., 2001. A revision of *Verticillium* sect. Prostrata. III. Generic classification. Nova Hedwigia 72 (3-4), 329–337.
Goossens, E., Dorny, P., Boomker, J., Vercammen, F., Vercruysse, J., 2005. A 12-month survey of the gastro-intestinal helminths of antelopes, gazelles and giraffids kept at two zoos in Belgium. Vet Parasitol. 127, 303–312. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.10.013.
Healey, K., Lawlor, C., Knox, M.R., Chambers, M., Lamb, J., 2018. Field evaluation of *Duddingtonia flagrans* IAH 1297 for the reduction of worm burden in grazing animals: Tracer studies in sheep. Vet Parasitol. 253, 48–54. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.02.010.
Hernández, J.A., Vázquez-Ruiz, R.A., Cazapal-Monteiro, C.F., Valderrábano, E., Arroyo, F.L., Francisco, I., Miguélez, S., Sánchez-Andrade, R., Paz-Silva, A., Arias, M. S., 2017. Isolation of Ovicidal Fungi from Fecal Samples of Captive Animals Maintained in a Zoological Park. J. Fungi 3, 29. https://doi.org/10.3390/jof3020029.
Hernández, J.A., Cazapal-Monteiro, C.F., Arroyo, F.L., Silva, M.I., Palomero, A.M., Paz-Silva, A., Sánchez-Andrade, R., Arias, M.S., 2018a. Biological control of soil transmitted helminths (STHs) in a zoological park by using saprophytic fungi. Biol. Control 122, 24–30. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.04.005.
Hernández, J.A., Cazapal-Monteiro, C.F., Sanchís, J., Sánchez-Andrade, R., Paz-Silva, A., Arias, M.S., 2018b. Potential usefulness of filamentous fungi to prevent zoonotic soil-transmitted helminths (STHs). Vector Borne Zoonotic Dis. 18, 690–696. https://doi.org/10.1089/vbz.2018.2296.
Hernández, J.Á., Sánchez-Andrade, R., Cazapal-Monteiro, C.F., Arroyo, F.L., Sanchís, J. M., Paz-Silva, A., Arias, M.S., 2018c. A combined effort to avoid strongyle infection in horses in an oceanic climate region: rotational grazing and parasiticidal fungi. Parasit. Vectors 11, 240. https://doi.org/10.1186/s13071-018-2827-3.
Lahat, L., Ortiz, J.M., Tizzani, P., Ibáñez, B., Valera, F., Moreno, E., Espeso, G., Ruiz de Ybáñez, R., 2021. Are Anthelminthic Treatments of Captive Ruminants Necessary? Vet Sci. 8, 240. https://doi.org/10.3390/vetsci8100240.
Luangsa-ard, J.J., Houbraken, J., van Doorn, T., Hong, S.B., Borman, A.M., Hywel-Jones, N.L., Samson, R.A., 2011. *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus*. FEMS Microbiol. Lett. 321, 141–149. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02322.x.
Maciel, A.S., Freitas, L.G., Figueiredo, L.D., Campos, A.K., Mello, I.N., 2012. Antagonistic activity of the fungus *Pochonia chlamydosporia* on mature and immature *Toxocara canis* eggs. Parasitology 139, 1074–1085. https://doi.org/10.1017/S0031182012000418.
Maesano, G., Capasso, M., Iannello, D., Cringoli, G., Rinaldi, L., 2014. Parasitic infections detected by FLOTAC in zoo mammals from Warsaw. Poland. Acta Parasitol. 59, 343–353. https://doi.org/10.2478/s11686-014-0249-8.
Mendoza de Gives, P., López-Arellano, M.E., Aguilar-Marcelino, L., Olazarán-Jenkins, S., Reyes-Guerrero, D., Ramírez-Várgas, G., Vega-Murillo, V.E., 2018. The nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* reduces the gastrointestinal parasitic nematode larvae population in faeces of orally treated calves maintained under tropical conditions. Dose/Response assessment. Vet Parasitol. S0304–4017 (18), 30037–130032. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.01.025.
Morgan, E.R., Charlier, J., Hendrickx, G., Biggeri, A., Catalan, D., von Samson-Himmelstjerna, G., Demeler, J., Müller, E., van Dijk, J., Kenyon, F., Skuce, P., Höglund, J., O'Kiely, P., van Ranst, B., de Waal, T., Rinaldi, L., Cringoli, G., Hertzberg, H., Torgerson, P.R., Wolstenholme, A., Vercruysse, J., 2013. Global change and helminth infections in grazing ruminants in europe: impacts, trends and sustainable solutions. Agriculture 3, 484–502. https://doi.org/10.3390/agriculture3030484.
Moudgil, A.D., Singla, L.D., 2018. Molecular confirmation and anthelmintic efficacy assessment against natural trichurid infections in zoo-housed non-human primates. J. Med. Primatol. 47, 388–392. https://doi.org/10.1111/jmp.12358.
Ojeda-Robertos, N.F., Torres-Acosta, J.F., Ayala-Burgos, A., Aguilar-Caballero, A.J., Cob-Galera, L.A., Mendoza-de-Gives, P., 2008. A technique for the quantification of Duddingtonia flagrans chlamydospores in sheep faeces. Vet Parasitol. 152, 339–343. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.12.023.
Ortiz Pérez, D.O., Sánchez Muñoz, B., Nahed Toral, J., Orantes Zebadúa, M.Á., Cruz López, J.L., Reyes García, M.E., Mendoza de Gives, P., 2017. Using *Duddingtonia flagrans* in calves under an organic milk farm production system in the Mexican tropics. Exp Parasitol. 175, 74–78. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.02.009.
Palomero, A.M., Cazapal-Monteiro, C.F., Valderrábano, E., Paz-Silva, A., Sánchez-Andrade, R., Arias, M.S., 2020. Soil fungi enable the control of gastrointestinal nematodes in wild bovidae captive in a zoological park: a 4-year trial. Parasitology 147, 791–798. https://doi.org/10.1017/S0031182020000414.
Paraud, C., Hoste, H., Lefrileux, Y., Pommaret, A., Paolini, V., Pors, I., Chartier, C., 2005. Administration of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores to goats to control gastro-intestinal nematodes: dose trials. Vet Res. 36, 157–166. https://doi.org/10.1051/vetres:2004060.
Poveda, J., 2021. Insect frass in the development of sustainable agriculture. A review. Agron. Sustain. Dev. 41, 5. https://doi.org/10.1007/s13593-020-00656-x.
Poveda, J., Abril-Urias, P., Escobar, C., 2020. Biological Control of Plant-Parasitic Nematodes by Filamentous Fungi Inducers of Resistance: *Trichoderma*. Mycorrhizal and Endophytic Fungi. Front. Microbiol. 11, 992. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00992.
Rodrigues, J.A., Alvares, F.B.V., Silva, J.T., Ferreira, L.C., Costa, P.W.L., Sarmento, W.F., Ferreira Feitosa, T., Araújo, J.V., Braga, F.R., Vilela, L.R., V.,, 2020. Predatory effects of the fungus *Arthrobotrys cladodes* on sheep gastrointestinal nematodes. Biocontrol Sci. Technol. 30, 830–839. https://doi.org/10.1080/09583157.2020.1775176.
Safarov, A., Mihalca, A.D., Park, G.M., Akramova, F., Ionică, A.M., Abdinabiev, O., Deak, G., Azimov, D., 2022. A Survey of Helminths of Dogs in Rural and Urban Areas of Uzbekistan and the Zoonotic Risk to Human Population. Pathogens 11, 1085. https://doi.org/10.3390/pathogens11101085.
Sagüés, M.F., Fusé, L.A., Fernández, A.S., Iglesias, L.E., Moreno, F.C., Saumell, C.A., 2011. Efficacy of an energy block containing *Duddingtonia flagrans* in the control of gastrointestinal nematodes of sheep. Parasitol Res. 109, 707–713. https://doi.org/10.1007/s00436-011-2302-y.
Saumell, C.A., Fernández, A.S., Echevarria, F., Gonçalves, I., Iglesias, L., Sagüés, M.F., Rodríguez, E.M., 2016. Lack of negative effects of the biological control agent *Duddingtonia flagrans* on soil nematodes and other nematophagous fungi. J Helminthol. 90, 706–711. https://doi.org/10.1017/S002214950X15000098X.
Schroers, H.-J., Samuels, G.J., Seifert, K.A., Gams, W., 1999. Classification of the mycoparasite *Gliocladium roseum* in *Clonostachys* as *C. rosea*, its relationship to *Bionectria ochroleuca*, and notes on other *Gliocladium*-like fungi. Mycologia 91, 365–385. https://doi.org/10.1080/00275514.1999.12061028.
Van Thiegem, P., 1875. Mucor circinelloides. Annls Sci. Nat., Bot. ser. 6 (1), 94.
Vercruysse, J., Albonico, M., Behnke, J.M., Kotze, A.C., Prichard, R.K., McCarthy, J.S., Montresor, A., Levecke, B., 2011. Is anthelmintic resistance a concern for the control of human soil-transmitted helminths? Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist. 1, 14–27. https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2011.09.002.
Vercruysse, J., Charlier, J., Van Dijk, J., Morgan, E.R., Geary, T., von Samson-Himmelstjerna, G., Claerebout, E., 2018. Control of helminth ruminant infections by 2030. Parasitology 145, 1655–1664. https://doi.org/10.1017/S003118201700227X.
Vilela, V.L.R., Feitosa, T.F., Braga, F.R., De Araújo, J.V., Dos Santos, A., De Morais, D.F., Souto, D.V.D.O., Athayde, A.C.R., 2016. Coadministration of nematophagous fungi for biological control over gastrointestinal helminths in sheep in the semiarid region of northeastern Brazil. Vet Parasitol. 221, 139–143. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.03.027.
Viña, C., Silva, M.I., Palomero, A.M., Voinot, M., Vilá, M., Hernández, J.Á., Paz-Silva, A., Sánchez-Andrade, R., Cazapal-Monteiro, C.F., Arias, M.S., 2020. The control of zoonotic soil-transmitted helminthoses using saprophytic fungi. Pathogens 9, 1071. https://doi.org/10.3390/pathogens9121071.
Voinot, M., Cazapal-Monteiro, C., Hernández, J.Á., Palomero, A.M., Arroyo, F.L., Sanchís, J., Pedreira, J., Sánchez-Andrade, R., Paz-Silva, A., Arias, M.S., 2020. Integrating the control of helminths in dairy cattle: Deworming, rotational grazing and nutritional pellets with parasiticide fungi. Vet Parasitol. 278, 109038 https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109038.
Voinot, M., Bonilla, R., Sousa, S., Sanchís, J., Canhão-Dias, M., Romero Delgado, J., Lozano, J., Sánchez-Andrade, R., Sol Arias, M., Madeira de Carvalho, L., 2021. Control of Strongyles in First-Season Grazing Ewe Lambs by Integrating Deworming and Thrice-Weekly Administration of Parasiticidal Fungal Spores. Pathogens 10, 1338. https://doi.org/10.3390/pathogens10101338.
Voinot, M., Arroyo, F., Hernández, J.Á., Paz-Silva, A., Sánchez-Andrade, R., Bermúdez, R., Guillot, J., Madeira de Carvalho, L.M., Arias, M.S., Cazapal-

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Monteiro, C.F., 2022. Safety of daily administration of pellets containing parasiticidal fungal spores over a long period of time in heifers. Biocontrol. Sci. Technol. 32 (11), 1249–1259.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.3. ARTÍCULO NÚMERO 3

Salmo R, Viña C, Zubiria I, Malagón JÁH, Sanchís JM, Cazapal-Monteiro C, Arias MS, Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A. (2024). Formulating Parasiticidal Fungi in Dried Edible Gelatins to Reduce the Risk of Infection by *Trichuris* sp. among Continuous Grazing Bison. *Pathogens*. *13(1)*:82.

https://doi.org/10.3390/pathogens13010082

Publisher: MDPI, Basel, Switzerland.

EISSN: 2076-0817

Journal quality indexes

Journal Impact Factor (2023): 3.3

5 Year Impact Factor: 3.5

Rank (2024): 70/161; Q2 (MICROBIOLOGY)

Contribution of the PhD student

RS performed conceptualization, methodology, data curation, writing original draft preparation, supervision, funding acquisition, investigation, validation, conceptualization.

Journal/publisher permission: Not Needed.

pathogens

MDPI

Article

Formulating Parasiticidal Fungi in Dried Edible Gelatins to Reduce the Risk of Infection by *Trichuris* sp. among Continuous Grazing Bison

Rami Salmo [1], Cándido Viña [1], Izaro Zubiria [1], José Ángel Hernández Malagón [1], Jaime M. Sanchís [2], Cristiana Cazapal [1], María Sol Arias [1,*], Rita Sánchez-Andrade [1] and Adolfo Paz-Silva [1,*]

Citation: Salmo, R.; Viña, C.; Zubiria, I.; Malagón, J.Á.H.; Sanchís, J.M.; Cazapal, C.; Arias, M.S.; Sánchez-Andrade, R.; Paz-Silva, A. Formulating Parasiticidal Fungi in Dried Edible Gelatins to Reduce the Risk of Infection by *Trichuris* sp. among Continuous Grazing Bison. *Pathogens* **2024**, *13*, 82. https://doi.org/10.3390/pathogens13010082

Academic Editors: Hans-Peter Fuehrer and Ayola Akim Adegnika

Received: 18 December 2023
Revised: 3 January 2024
Accepted: 15 January 2024
Published: 17 January 2024

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

© 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (**https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/**).

No special permission is required to reuse all or part of article published by MDPI, including figures and tables. For articles published under an open access Creative Common CC BY license, any part of the article may be reused without permission provided that the original article is clearly cited. Reuse of an article does not imply endorsement by the authors or MDPI. Furthermore, no special permission is required for authors to submit their work to external repositories. This policy extends to all versions of a paper: submitted, accepted, and published.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

pathogens

MDPI

Article

Formulating Parasiticidal Fungi in Dried Edible Gelatins to Reduce the Risk of Infection by *Trichuris* sp. among Continuous Grazing Bison

Rami Salmo [1], Cándido Viña [1], Izaro Zubiria [1], José Ángel Hernández Malagón [1], Jaime M. Sanchís [2], Cristiana Cazapal [1], María Sol Arias [1,*], Rita Sánchez-Andrade [1] and Adolfo Paz-Silva [1,*]

[1] Control of Parasites Group (COPAR, GI-2120), Department of Animal Pathology, Faculty of Veterinary, University of Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain; rami.salmo@rai.usc.es (R.S.); candido.vina@rai.usc.es (C.V.); izaro88@gmail.com (I.Z.); joseangel.malagon@usc.es (J.Á.H.M.); cristiana.cazapal@usc.es (C.C.); rita.sanchez-andrade@usc.es (R.S.-A.)

[2] Parasitology and Parasitic Diseases, Faculty of Veterinary, University of "La República" (Regional Litoral Norte), Salto 50000, Uruguay; sanchisjaime@gmail.com

* Correspondence: mariasol.arias@usc.es (M.S.A.); adolfo.paz@usc.es (A.P.-S.); Tel.: +34-982-822-126 (M.S.A. & A.P.-S.)

Abstract: Control of infection by gastrointestinal nematodes remains a big problem in ruminants under continuous grazing. For the purpose of decreasing the risk of infection by *Trichuris* sp. in captive bison (*Bison bison*) always maintained in the same plot, dried gelatins having $\geq 10^6$ chlamydospores of both *Mucor circinelloides* and *Duddingtonia flagrans* were given to them for one week, and at the end, fecal samples (FF) collected each week for four weeks were analyzed immediately. Feces taken one week prior to gelatin administration served as controls (CF). Eggs of *Trichuris* sp. were sorted into non-viable and viable, then classified into viable undeveloped (VU), viable with cellular development (VCD), or viable infective (VI). Ovistatic and ovicidal effects were determined throughout the study. In FF, viability of *Trichuris* eggs decreased between 9% (first week) and 57% (fourth week), egg development was delayed during the first two weeks, and VI percentages were significantly lower than in CF ($p = 0.001$). It is concluded that the preparation of gelatins with chlamydospores of parasiticidal fungi and their subsequent dehydration offer an edible formulation that is ready to use, stress-free to supply, and easy to store, as well as being well-accepted by ruminants and highly efficient to reduce the risk of *Trichuris* sp. infection among animals under continuous grazing regimes.

Keywords: helminth control; sustainability; *Mucor circinelloides*; *Duddingtonia flagrans*; dry gelatin

check for updates

Citation: Salmo, R.; Viña, C.; Zubiria, I.; Malagón, J.Á.H.; Sanchís, J.M.; Cazapal, C.; Arias, M.S.; Sánchez-Andrade, R.; Paz-Silva, A. Formulating Parasiticidal Fungi in Dried Edible Gelatins to Reduce the Risk of Infection by *Trichuris* sp. among Continuous Grazing Bison. *Pathogens* **2024**, *13*, 82. https://doi.org/10.3390/pathogens13010082

Academic Editors: Hans-Peter Fuehrer and Ayola Akim Adegnika

Received: 18 December 2023
Revised: 3 January 2024
Accepted: 15 January 2024
Published: 17 January 2024

Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

Grazing management systems have returned in recent decades based on the increase in the cost of raw materials for feedstuff manufacturing. In addition, animal welfare became an important concern for consumers, who appreciate when animals can pasture outside for as long as possible, regarding the weather conditions. Different grazing regimes are applied, mainly to ensure adequate nutrition for the animals. Rotational pasturing appears very appropriate because nutritive needs are reached by moving animals to new prairies often (every two–three days) [1]. In contrast, it is generally assumed that continuous pasturing provides lower nutritional power because forage species cannot grow again quickly, making supplementation mandatory [2].

An important problem associated with pasturing regimes consists of herbivores that can become infected by taking infective stages of several parasites together with the herbage [3]. Hence, considerable efforts are required to control these pathogens responsible for important economic losses, reduction of the health status of the animals, and even their

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

death [4]. Despite grazing animals receiving very successful deworming, reinfection occurs soon because of infective stages that develop in areas with vegetation. This underlines the need for proper information on the time the free-living stages can survive on the ground, and the population dynamics [5]. Rotational pasturing has been advised to reduce the risk of infection by certain parasites, based on the fact that herbivores might take advantage of grasslands with very low levels of contamination [6]. On the contrary, continuously grazed paddocks are regularly associated with elevated risk of infection, thus worsening the possibilities to control several parasitic infections. Constant and long-term use of the same area during winter causes an accumulation of invasive material and increased risk of helminth invasions [7].

The gastrointestinal nematodes are a very important group of helminths affecting herbivores, especially under pasturing conditions, and control is frequently performed by the regular administration of chemical anthelmintic drugs [8,9]. Most attention has been focused on infection by strongyles, and scarcely on others belonging to the genus *Trichuris* [10]. These species have a direct life cycle, and the infected individuals pass unembryonated eggs in the feces, which develop once in the soil until the infective stage appears (the egg contains a first-stage larva inside), approximately after 2–4 weeks [11]. After being swallowed, these eggs hatch in the intestine, and the released larvae move to the caecum and proximal colon, where the worms bury their narrow anterior end into the mucosa. Although many cases are asymptomatic, infection by *Trichuris* spp. can be responsible for bloody colitis, diphteritic caecitis, and ulcerative and necrotic lesions on the mucosa [12]. In the presence of high burdens of worms, anemia, dehydration, and jaundice evolve and cause death if appropriate treatment (benzimidazoles or macrocyclic lactones) is not administered [4,13]. Because of this, new strategies targeting the eggs of *Trichuris* in the soil appear essential for contributing to the control of this nematode, as a complement to the administration of efficient anthelmintics [14].

For the purpose of acting against different stages of helminths in the soil, the saprophytic filamentous fungus *Duddingtonia flagrans* and *Mucor circinelloides* have been simultaneously cultured in a submerged medium [15]. This formulation provides a very useful tool to trap and destroy the larvae of gastrointestinal nematodes as trichostrongylids, cyathostomin, or ancylostomatids by means of *D. flagrans* [9,16]. Additionally, *M. circinelloides* is capable of developing a type three effect on eggs of different species, consisting of eggshell injury, penetration of the hyphae inside, and embryo destruction. Previous investigations reported successful results when a blend of the chlamydospores of *M. circinelloides* and *D. flagrans* was formulated as aqueous solutions, and mixed with cereal grains or nutritional pellets [1,17–19]. In the current study, a novel formulation comprising the manufacturing of edible gelatins with chlamydospores of both fungi was developed. Then, edible gelatins were desiccated, and finally tested on captive bison maintained in a zoological garden under continuous pasturing.

2. Materials and Methods

2.1. Edible Gelatins with Fungal Chlamydospores

Two saprophytic filamentous fungi, *Mucor circinelloides* (CECT 20824; active against helminth eggs) and *Duddingtonia flagrans* (CECT 20823; helminth larvae antagonist)—isolated from soil and fecal samples of animal species and deposited in the Spanish Type Culture Collection (CECT, Valencia, Spain)—were co-cultured in a submerged medium until a quantity $\approx 10^7$ chlamydospores of every one was attained. This medium was added to edible gelatin powder, honey, and water (pending on registration). Once completely homogenized, the blend was heated under microwave for a brief period and placed into silicone molds (approximately 10 mL/each), quenched at 4–6 °C to enhance gelation, and then at −35 °C until frozen. Finally, the products were lyophilized (Figure 1), and packed into reusable plastic bags.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2.2. Effect of Drying on the Viability of Fungal Chlamydospores

Examination of the dried gelatins was conducted to ascertain if the procedure might decrease the number of chlamydospores. Every month for six months, 30 gelatins were freeze-dried, then rehydrated by submerging each one into 10 mL water at 37 °C, and stirred until completely melted. Finally, five 25 µL-aliquots of each solution were taken, and their spores were counted in a Neubauer chamber under an optical microscope at 20× and expressed as numbers per mL. The reduction of the number of chlamydospores during the drying process was estimated as follows:

$$\text{Reduction drying (\%)} = [1 - (\text{Counts}_{\text{DRY GELATIN}} / \text{Counts}_{\text{GELATIN}})] \times 100.$$

The analysis of the dried gelatins revealed that a percentage of 5–7% chlamydospores were lost during the lyophilization, so this formulation enabled that every individual received $\geq 10^6$ chlamydospores of each parasiticide fungus/piece.

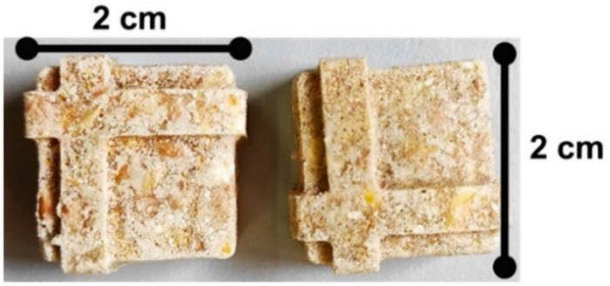


Figure 1. Gelatins were made from a blend of 10^7 chlamydospores of both *M. circinelloides* and *D. flagrans*, and then dehydrated.

2.3. Captive Bison

Seven captive bison (*Bison bison*) maintained in the Marcelle Natureza Zoological Park (Outeiro de Rei, Lugo; 43°4′14.71″ N, 7°37′53.50″ W; Spain) were utilized in the current study (Figure 2). These ruminants are maintained under continuous grazing in a 1-Ha fenced paddock with trees and grass. Nutritional supplementation consisting of pelleted feed is provided every 2 days, as well as hay during the winter. Feces is removed manually every 2–3 days prior to the visitors entering the park. Deworming involves the quarterly administration of anthelmintics (albendazole or ivermectin).



Figure 2. Captive bison under continuous grazing and passing eggs of *Trichuris* sp. in their feces received dried gelatins containing a blend of 10^6 chlamydospores of both *M. circinelloides* and *D. flagrans* each (Marcelle Natureza Zoological Park, NW Spain).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2.4. Experimental Design

During one week, fecal samples were taken directly from the soil and considered as controls (CF, control feces). After being homogenized by mixing vigorously, a quantity of four grams was placed into 16 plastic boxes with holes in each wall to allow aeration, then a plastic cover was put on top and it was moved to a grassland for four weeks [20].

For a period of one week, every bison was given one gelatin daily, and at the end, feces were collected and labelled as FF (feces with fungi). Again, fecal samples were homogenized, and four grams were deposited into 24 plastic boxes, which proceeded as explained above. In order to guarantee that each bison received the corresponding dosage of chlamydospores, one dry gelatin was mixed with ca. 10 g nutritional pellets and put into the feeder.

2.5. Evaluation of the Strategy

The fecal contents of 4 CF boxes and 6 FF boxes were analyzed weekly by means of a coprological flotation test for the purpose of detecting the presence of parasites [20]. Briefly, feces were emulsified in 42 mL water, stirred and filtered through a 150 µm mesh, then collected into 12 mL tubes. After centrifuging at 2000 rpm for 5 min, supernatants were discarded, and the sediments were resuspended into a NaCl saturated solution (ρ = 1.25 g/mL) and observed under an optical microscope (10×–20×) by placing 20 µL between a glass slide and coverslip, until a minimum of 150 eggs of *Trichuris* sp. were examined. This analysis was conducted in replicate for each fecal sample.

The effect of the parasiticide fungi on the eggs of *Trichuris* spp. was based on their ability to destroy them or damage them permanently (ovicide effect), as well as to influence the capability of the eggs to develop to the infective stage (ovistatic effect). In this way, eggs of *Trichuris* were sorted firstly into non-viable and viable, with respect to the observation of at least one disturbance, including shell disruption or contraction, cytoplasm vacuolization, or larval immobility when light stimulated (presence = non-viable; absence = viable) [21] (Figure 3). The ovicidal effect or viability reduction (VR) was assessed weekly by comparing the number of viable eggs in the feces with fungi (FF) and those in the controls (CF) (1):

$$\text{VR (\%)} = \left[1 - \left(\frac{\text{FF Viable eggs}}{\text{CF viable eggs}}\right)\right] \times 100 \quad (1)$$

Assessment of the ovistatic effect comprised the evaluation of the development of the eggs in the FF in comparison to the controls (CF). For this purpose, viable eggs were further classified as undeveloped (VU), with cellular development (VCD), or infective (VI) (Figure 3) [18]. The ratios for the different *Trichuris* sp. ova development stages in CF and FF were estimated as follows (2):

$$\text{Ratio} = \%\ \text{Eggs}_{\text{CF}} / \%\ \text{Eggs}_{\text{FF}} \quad (2)$$

Finally, the Soil Contamination Index (SCI) was calculated for FF and CF to get information about the risk of infection in the soil (3):

$$\text{SCI (\%)} = (\%\ \text{Viable Eggs} \times \%\ \text{of Eggs with L1})/100 \quad (3)$$

2.6. Statistical Analysis

The analysis by means of the Kolmogorov–Smirnov probe showed that data regarding the numbers of viable eggs, VU, VCD, and VP were not normally distributed ($p < 0.05$), and the Levene probe confirmed that the variances were not homogeneous ($p < 0.05$). Accordingly, the nonparametric Mann–Whitney U test was performed (significance level $p < 0.05$). All of the probes were conducted by using the IBM® SPSS® Statistics for Windows, version 21 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

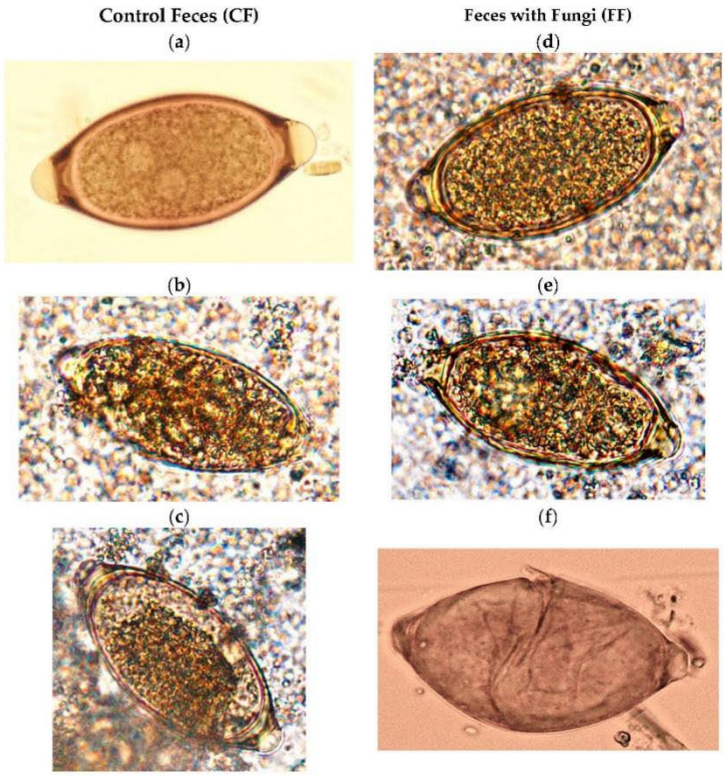


Figure 3. Evolution of eggs of *Trichuris* sp. in feces of bison kept under continuous grazing. CF (controls): samples collected prior to providing bison fungal chlamydospores. (**a**) Viable unembryonated, with two nuclei; (**b**) viable with cellular development (VCD); (**c**) viable with cylindrical larva (VI, infective). FF: samples taken after giving bison a blend of chlamydospores. (**d**) Viable undeveloped (VU); (**e**) cytoplasm vacuolization (non-viable); (**f**) empty, with eggshell disrupted (non-viable).

3. Results

3.1. Variations on the Viability of Eggs of Trichuris sp.

As illustrated in Figure 4, minor variations were observed in the percentages of viable eggs of *Trichuris* sp. in CF (control fecal samples), and values higher than 95% were achieved throughout a period of four weeks. In FF (fecal samples taken one week after bison received daily gelatins with fungal chlamydospores), viability decreased from 99% to 53% during the same interval, which means a viability reduction of 46%. These differences were statistically significant ($Z = -5.734$, $p = 0.001$).

3.2. Evolution of Viable Eggs of Trichuris sp.

By the first week of the study (Figure 5), cellular development was recorded inside the eggs of *Trichuris* sp. in CF, with values around 32%. Infective eggs (VI, containing a L1 inside) were identified from the second week, with the maximal counts at the end of the study (near to 40%).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

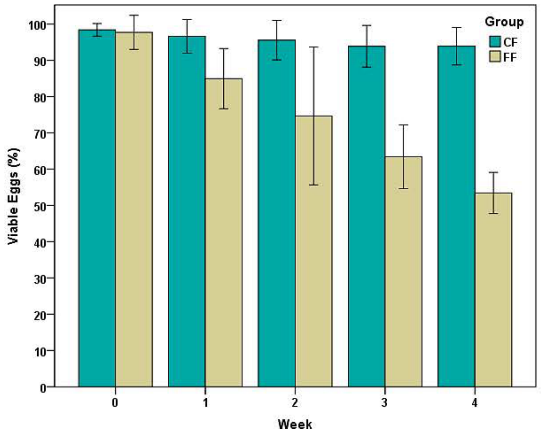


Figure 4. Percentages of viable eggs of *Trichuris* sp. in feces of bison under continuous pasturing. FF: samples taken after giving bison a blend of chlamydospores; CF (controls): samples collected prior to providing bison fungal chlamydospores. Points represent the percentage average ± 2 SD.

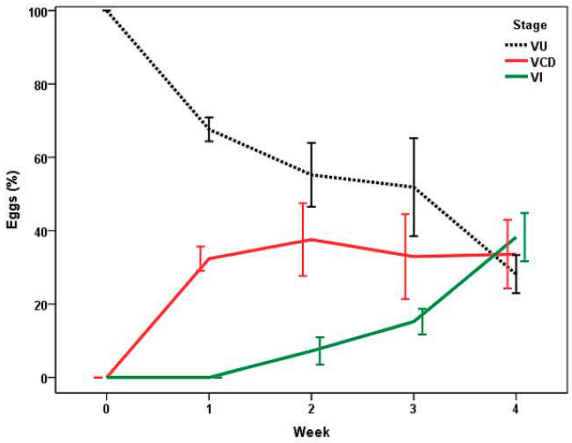


Figure 5. Stages of viable eggs of *Trichuris* sp. in feces of bison under rotational grazing (CF). VU: unembryonated (zygote); VCD: with cellular development; VI: infective. Points represent the percentage average ± 2 SD.

In the FF (Figure 6), about 25% of the eggs showed cellular development at the first week, increasing to the third week (≈37%). The presence of infective eggs (VI) was detected from the third week (1%), and numbers near 13% were attained at the end of the study.

Statistical differences were demonstrated between the two groups for VU ($Z = -3.062$, $p = 0.002$) and VI ($Z = -3.806$, $p = 0.001$).

No problems related to gelatin preparation, dehydration, or storage were recorded throughout the study. Dry gelatins containing the fungi were well-accepted by all the bison, and no trouble regarding their intake was observed.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

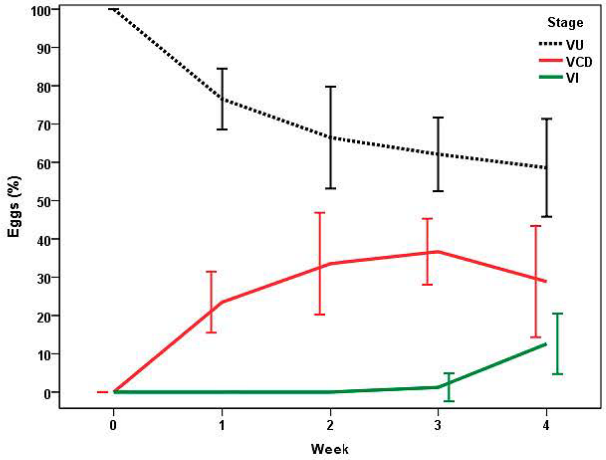


Figure 6. Stages of viable eggs of *Trichuris* sp. in feces of bison kept under continuous pasturing, after receiving dry gelatins containing a blend of chlamydospores of *M. circinelloides* and *Duddingtonia flagrans* (FF). VU: unembryonated (zygote); VCD: with cellular development; VI: infective. Points represent the percentage average ± 2 SD.

3.3. *Effect of Ingestion of Fungal Chlamydospores on Eggs of Trichuris sp.*

Regarding the analysis of the ovistatic effect, the ratios for the eggs of *Trichuris* between CF and FF are summarized in Table 1. At the end of the study, the number of VU in FF duplicated in relation to CF, whereas the counts of VI decreased by one-third.

Table 1. Ratios in the eggs of *Trichuris* sp. between CF and FF.

Week	0	1	2	3	4
VU	1	0.9	0.8	0.8	0.5
VCD	-	1.4	1.1	0.9	1.2
VI	-	-	-	15	3
Viable Eggs	1	1.1	1.3	1.5	1.8

VU: unembryonated (zygote); VCD: with cellular development; VI: infective. FF: samples taken after giving a blend of chlamydospores to bison kept under continuous grazing; CF (controls): samples collected prior to providing bison fungal chlamydospores.

According to the analysis of the ovicidal effect, counts of viable eggs of *Trichuris* in CF were 1.8 times higher than in FF by the end of the study (Table 1). A significant 44% reduction of egg viability in FF, with respect to CF, was demonstrated after four weeks ($Z = -3.710$, $p = 0.001$) (Table 2).

Table 2. Values of reduction of viability (VR) of eggs of *Trichuris* sp. in feces of bison under continuous grazing provided a blend of chlamydospores of *M. circinelloides* and *D. flagrans* (FF).

Week	1	2	3	4
VR (%)	12	22	33	44

FF: samples taken after giving a blend of chlamydospores to bison kept under continuous grazing.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Table 3 shows that the risk of soil contamination by *Trichuris* sp. was five times higher in CF (feces taken before giving chlamydospores to the captive bison) than in FF (samples collected after bison ingested the fungal chlamydospores).

Table 3. Values of Soil Contamination Index (SCI) by *Trichuris* sp.

Week		0	1	2	3	4
SCI (%)	CF	0	0	7	14	36
	FF	0	0	0	1	7

FF: samples taken after giving a blend of chlamydospores to bison kept under continuous grazing; CF (controls): samples collected prior to providing bison fungal chlamydospores.

4. Discussion

Anthelmintic deworming provides successful results against gastrointestinal nematodes, but animals become infected again by *Trichuris* and others, especially when reared under pasturing regimes, because of the existence of infective stages in the soil [22].

Without depending on their stage (zygote, morula, blastula, larva), eggs of *Trichuris* spp. can survive for years in moist and shady areas [3,4]; thus, it appears quite plausible that minimizing pasture contamination by eggs might represent a major and helpful component of the control of infection [23]. In the current study, a blend of chlamydospores of two fungi with parasiticide activity, *M. circinelloides* and *D. flagrans*, was given to bison kept under continuous grazing and passing eggs of *Trichuris* spp. in their feces. Two weeks later, egg-viability decreased 1.3-fold, and 1.8-fold at the fourth week. These results point to the ovicide effect that is achieved in the presence of parasiticide fungi in the feces of captive bison, which is in agreement with previous studies conducted against eggs of *Trichuris* sp. in feces of dromedaries captive in a zoo [20].

Once in the soil, eggs of *Trichuris* undergo different stages, and after 2–4 weeks, depending on environmental conditions (temperature and humidity), a first instar larva is formed inside. Infection occurs only when the infective stages are swallowed, which means that ingestion of the other egg stages poses no risk to the animals. For this reason, the period of time until the appearance of L1 is of great importance. In the present study, the presence of L1 in the control feces (without chlamydospores) was recorded since the second week, in congruence with previous research [14]; in addition to this, more than two-fifths of the eggs exhibited development inside at that moment. In contrast, only 1% of the eggs in the feces with fungi became infective by the third week, and two-thirds still remained undeveloped as a zygote at that time, which represents double of those in the absence of fungi (controls). These results highlight that an elevated ovistatic effect can be attained in feces by giving bison a blend of chlamydospores of *M. circinelloides* and *D. flagrans*.

Most of the information about the usefulness of fungi to control parasitic infections has been acquired by providing the animals' chlamydospores of *D. flagrans* [24,25]. Recently, it has been demonstrated in vitro that there is compatibility and nematicidal activity of *Pochonia chlamydosporia* (ovicide) and *Arthrobotrys cladodes* (larvicide), or *P. chlamydosporia* and *Monacrosporium sinense* (larvicide), against larvae of gastrointestinal nematodes affecting bovids [26–28], as it was found formerly with *M. circinelloides* and *D. flagrans* [15]. In the present research, this blend of chlamydospores confirmed that the parasiticidal spectrum notably increases because of the antagonistic effect exerted simultaneously on eggs and larvae developing in the feces and in the soil [28].

One interesting question associated with the use of parasiticidal fungi on animals relies on their administration. By means of aqueous solutions [18,29,30], handmade [31] or industrially manufactured nutritional pellets [19], or cereal flour [32,33], spores and/or mycelium of several fungi have been given to different animal species. These formulations should not only be effective, but easy to prepare, preserve, and apply. To comply with these objectives, in the current study chlamydospores of *M. circinelloides* and *D. flagrans* were formulated as edible gelatins, then dried to enhance their preservation. In this way, a final product was obtained after a simple procedure that can be kept for long periods without

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

refrigeration or freezing, and is very handy to give to the animals, alone or mixed with the feed.

Apart from management of pastures, there is scarce information about preventing infection by gastrointestinal nematodes (including trichurosis), therefore anthelmintic treatment is highly utilized. This measure does not affect the survival and/or development of the parasites in the soil until they reach the infective stage, so the chance of infection remains high or even increases. It must be emphasized that in the present research, egg viability dropped to less than half, and risk of soil contamination by *Trichuris* sp. reduced five times in feces containing parasiticide fungi. Rotational grazing is commonly advised to reduce the risk of infection by certain helminths, based on low levels of contamination that are attained. This entails that some periods of grazing exclusion help to limit the repeated defoliation of the species, but a high number of prairies could be involved, which would make it difficult to implement [34]. As for confined animals in zoos, rotation of pastures is not possible if they are kept in fenced plots, due to the stress involved in moving them from one to another, the possibility of establishing visual contact with other animal species that are their natural predators, or of hearing them. Hence, taking into account the present study as well as previous research also referring to captive ruminants always fed in the same plot [7,17,18], data obtained after the administration of chlamydospores of *M. circinelloides* and *D. flagrans* to bison could be directly extrapolated to domestic ruminants kept in continuous grazing, and the risk of infection would be expected to decrease significantly. In the last decade, the ability of condensed tannins to reduce the levels of infection by gastrointestinal nematodes has encouraged a promising investigation comprising ruminants feeding on tannin-rich plants [35,36].

Finally, it is important to note that, by the action of rain or earthworms, the eggs of *Trichuris* (and other gastrointestinal nematodes) can be leached and, therefore, could be found from the soil surface to depths of up to 10 cm [37]. Consequently, the oral administration of spores of parasiticide fungi offers a very helpful procedure to ensure that the antagonistic agents are in close contact with the eggs, regardless of their position. This has a significant advantage over other application methods, such as spraying directly on soil or feces [20,21,30].

5. Conclusions

The preparation of edible gelatins with chlamydospores of *M. circinelloides* and *D. flagrans* and their subsequent dehydration offers an edible formulation that is ready to use, stress-free to supply, and easy to store. Based on the fact that this formulation is well-accepted by ruminants and highly efficient to minimize the risk of *Trichuris* sp. infection, it is strongly recommended among animals under continuous grazing regimes.

Author Contributions: M.S.A., R.S.-A. and A.P.-S.: conceptualization, methodology, data curation, writing—original draft preparation, supervision, and funding acquisition. J.Á.H.M., C.C. and J.M.S.: software, writing, and visualization. R.S., C.V. and I.Z.: investigation, validation, and conceptualization. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This trial was partly funded by the Ministerio de Economía y Competitividad, Spain; FEDER (RYC-2016-21407), Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain; FEDER (PID2020-120208RB-I00), and Consellería de Cultura, Educación e Universidades, Xunta de Galicia, Spain (ED431B2021/07).

Institutional Review Board Statement: Ethical review and approval were waived because this study has been performed by veterinary clinicians, who confirm that bison were not exposed to any kind of injury or stress.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Acknowledgments: We would like to express our profound gratitude to the Head of the "Granja Gayoso Castro" (Deputación Provincial de Lugo, Spain) for the valuable collaboration in producing fungal spores, and to "Marcelle Natureza Zoological Park" for helping us with the fecal sampling.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Hernández, J.Á.; Sánchez-Andrade, R.; Cazapal-Monteiro, C.F.; Arroyo, F.L.; Sanchís, J.M.; Paz-Silva, A.; Arias, M.S. A combined effort to avoid strongyle infection in horses in an oceanic climate region: Rotational grazing and parasiticidal fungi. *Parasit. Vectors* **2018**, *11*, 240. [CrossRef]
2. McAllister, T.A.; Stanford, K.; Chaves, A.V.; Evans, P.R.; de Souza Figueiredo, E.E.; Ribeiro, G. Chapter 5—Nutrition, feeding and management of beef cattle in intensive and extensive production systems. In *Animal Agriculture*; Bazer, F.W., Lamb, G.C., Wu, G., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2020; pp. 75–98. [CrossRef]
3. Taylor, M.A.; Coop, R.L.; Wall, R.L. *Veterinary Parasitology*, 4th ed.; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, 2015.
4. Bulbul, K.; Akand, A.; Hussain, J.; Parbin, S.; Hasin, D. A brief understanding of *Trichuris ovis* in ruminants. *Int. J. Vet. Sci. Anim. Husb.* **2020**, *5*, 72–74.
5. Eysker, M.; Bakker, N.; Kooyman, F.N.; Ploeger, H.W. The possibilities and limitations of evasive grazing as a control measure for parasitic gastroenteritis in small ruminants in temperate climates. *Vet. Parasitol.* **2005**, *129*, 95–104. [CrossRef]
6. Bambou, J.C.; Ceï, W.; Arquet, R.; Calif, V.; Bocage, B.; Mandonnet, N.; Alexandre, G. Mixed Grazing and Dietary Supplementation Improve the Response to Gastrointestinal Nematode Parasitism and Production Performances of Goats. *Front. Vet. Sci.* **2021**, *8*, 628686. [CrossRef]
7. Kolodziej-Sobocińska, M.; Pyziel, A.; Demiaszkiewicz, A.; Borowik, T.; Kowalczyk, R. Pattern of parasite egg shedding by European bison (*Bison bonasus*) in the Białowieża Primeval Forest, Poland. *Mammal Res.* **2016**, *61*, 179–186. [CrossRef]
8. Wiese, J.D.; Caven, A.J.; Zarlenga, D.S.; Topliff, C.L.; Kelling, C.L.; Salter, J. Gastrointestinal parasites of a reintroduced semi-wild plains bison (Bison bison bison) herd: Examining effects of demographic variation, deworming treatments, and management strategy. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* **2021**, *14*, 216–227. [CrossRef]
9. Mendoza-de-Gives, P. Soil-Borne Nematodes: Impact in Agriculture and Livestock and Sustainable Strategies of Prevention and Control with Special Reference to the Use of Nematode Natural Enemies. *Pathogens* **2022**, *11*, 640. [CrossRef]
10. Waller, P.J. Sustainable nematode parasite control strategies for ruminant livestock by grazing management and biological control. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2006**, *1*, 277–289. [CrossRef]
11. Horton, J. Helminth-Nematode: *Trichuris trichiura*. In *Encyclopedia of Food Safety*; Motarjemi, Y., Ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2014; pp. 111–115. [CrossRef]
12. Spickler, A.R. Trichuriasis. 2019. Available online: http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/factsheets.php (accessed on 18 December 2023).
13. Wideman, G.N. Fatal *Trichuris* spp. infection in a Holstein heifer persistently infected with bovine viral diarrhea virus. *Can. Vet. J.* **2004**, *45*, 511–512.
14. Forman, R.; Partridge, F.A.; Sattelle, D.B.; Else, K.J. Un-'Egg'-Plored: Characterisation of Embryonation in the Whipworm Model Organism *Trichuris muris*. *Front. Trop. Dis.* **2021**, *2*, 790311. [CrossRef]
15. Arias, M.S.; Cazapal-Monteiro, C.F.; Suárez, J.; Miguélez, S.; Francisco, I.; Arroyo, F.L.; Suárez, J.L.; Paz-Silva, A.; Sánchez-Andrade, R.; Mendoza de Gives, P. Mixed production of filamentous fungal spores for preventing soil-transmitted helminth zoonoses: A preliminary analysis. *BioMed Res. Int.* **2013**, *2013*, 567876. [CrossRef]
16. Araújo, J.V.; Braga, F.R.; Mendoza-de-Gives, P.; Paz-Silva, A.; Vilela, V.L.R. Recent Advances in the Control of Helminths of Domestic Animals by Helminthophagous Fungi. *Parasitologia* **2021**, *1*, 168–176. [CrossRef]
17. Palomero, A.M.; Cazapal-Monteiro, C.F.; Valderrábano, E.; Paz-Silva, A.; Sánchez-Andrade, R.; Arias, M.S. Soil fungi enable the control of gastrointestinal nematodes in wild bovidae captive in a zoological park: A 4-year trial. *Parasitology* **2020**, *147*, 791–798. [CrossRef]
18. Voinot, M.; Bonilla, R.; Sousa, S.; Sanchís, J.; Canhão-Dias, M.; Romero Delgado, J.; Lozano, J.; Sánchez-Andrade, R.; Arias, M.S.; Madeira de Carvalho, L. Control of Strongyles in First-Season Grazing Ewe Lambs by Integrating Deworming and Thrice-Weekly Administration of Parasiticidal Fungal Spores. *Pathogens* **2021**, *10*, 1338. [CrossRef] [PubMed]
19. Voinot, M.; Cazapal-Monteiro, C.; Hernández, J.Á.; Palomero, A.M.; Arroyo, F.L.; Sanchís, J.; Pedreira, J.; Sánchez-Andrade, R.; Paz-Silva, A.; Arias, M.S. Integrating the control of helminths in dairy cattle: Deworming, rotational grazing and nutritional pellets with parasiticide fungi. *Vet. Parasitol.* **2020**, *278*, 109038. [CrossRef] [PubMed]
20. Hernández, J.A.; Cazapal-Monteiro, C.F.; Arroyo, F.L.; Silva, M.I.; Palomero, A.M.; Paz-Silva, A.; Sánchez-Andrade, R.; Arias, M.S. Biological control of soil transmitted helminths (STHs) in a zoological park by using saprophytic fungi. *Biol. Control* **2018**, *122*, 24–30. [CrossRef]

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

21. Viña, C.; Silva, M.I.; Palomero, A.M.; Voinot, M.; Vilá, M.; Hernández, J.Á.; Paz-Silva, A.; Sánchez-Andrade, R.; Cazapal-Monteiro, C.F.; Arias, M.S. The Control of Zoonotic Soil-Transmitted Helminthoses Using Saprophytic Fungi. *Pathogens* **2020**, *9*, 1071. [CrossRef]
22. Van Metre, D.C.; Tennant, B.C.; Whitlock, R.H. Chapter 6—Infectious Diseases of the Gastrointestinal Tract. In *Rebhun's Diseases of Dairy Cattle*, 2nd ed.; Divers, T.J., Peek, S.F., Eds.; W.B. Saunders: St. Louis, Missouri, USA, 2008; pp. 200–294. [CrossRef]
23. Peek, S.F.; Mcguirk, S.M.; Sweeney, R.W.; Cummings, K.J. Chapter 6—Infectious Diseases of the Gastrointestinal Tract. In *Rebhun's Diseases of Dairy Cattle*, 3rd ed.; Divers, T.J., Peek, S.F., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2018; pp. 249–356. [CrossRef]
24. Buzatti, A.; de Paula Santos, C.; Fernandes, M.A.; Yoshitani, U.Y.; Sprenger, L.K.; dos Santos, C.D.; Molento, M.B. *Duddingtonia flagrans* in the control of gastrointestinal nematodes of horses. *Exp. Parasitol.* **2015**, *159*, 1–4. [CrossRef]
25. Ortiz Pérez, D.O.; Sánchez Muñoz, B.; Nahed Toral, J.; Orantes Zebadúa, M.Á.; Cruz López, J.L.; Reyes García, M.E.; Mendoza de Gives, P. Using *Duddingtonia flagrans* in calves under an organic milk farm production system in the Mexican tropics. *Exp. Parasitol.* **2017**, *175*, 74–78. [CrossRef]
26. Vieira, Í.S.; Oliveira, I.C.; Campos, A.K.; Araújo, J.V. Association and predatory capacity of fungi *Pochonia chlamydosporia* and *Arthrobotrys cladodes* in the biological control of parasitic helminths of bovines. *Parasitology* **2019**, *146*, 1347–1351. [CrossRef]
27. Oliveira, I.C.; Vieira, Í.S.; Campos, A.K.; Araújo, J.V. In vitro compatibility and nematicidal activity of *Monacrosporium sinense* and *Pochonia chlamydosporia* for biological control of bovine parasitic nematodes. *Parasitology* **2021**, *148*, 956–961. [CrossRef]
28. Hernández, J.Á.; Cazapal-Monteiro, C.F.; Sanchís, J.; Sánchez-Andrade, R.; Paz-Silva, A.; Arias, M.S. Potential Usefulness of Filamentous Fungi to Prevent Zoonotic Soil-Transmitted Helminths. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2018**, *18*, 690–696. [CrossRef] [PubMed]
29. Paraud, C.; Hoste, H.; Lefrileux, Y.; Pommaret, A.; Paolini, V.; Pors, I.; Chartier, C. Administration of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores to goats to control gastro-intestinal nematodes: Dose trials. *Vet. Res.* **2005**, *36*, 157–166. [CrossRef] [PubMed]
30. Silva, M.E.; Uriostegui, M.A.; Millán-Orozco, J.; Gives, P.M.; Hernández, E.L.; Braga, F.R.; Araújo, J.V. Predatory activity of *Butlerius* nematodes and nematophagous fungi against *Haemonchus contortus* infective larvae. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* **2017**, *26*, 92–95. [CrossRef] [PubMed]
31. Aguilar-Marcelino, L.; Mendoza-de-Gives, P.; Torres-Hernández, G.; López-Arellano, M.E.; Becerril-Pérez, C.M.; Orihuela-Trujillo, A.; Torres-Acosta, J.F.J.; Olmedo-Juárez, A. Consumption of nutritional pellets with *Duddingtonia flagrans* fungal chlamydospores reduces infective nematode larvae of *Haemonchus contortus* in faeces of Saint Croix lambs. *J. Helminthol.* **2017**, *91*, 665–671. [CrossRef] [PubMed]
32. Healey, K.; Lawlor, C.; Knox, M.R.; Chambers, M.; Lamb, J.; Groves, P. Field evaluation of *Duddingtonia flagrans* IAH 1297 for the reduction of worm burden in grazing animals: Pasture larval studies in horses, cattle and goats. *Vet. Parasitol.* **2018**, *258*, 124–132. [CrossRef] [PubMed]
33. Fausto, G.C.; Fausto, M.C.; Vieira, Í.S.; Freitas, S.G.; Carvalho, L.M.; Oliveira, I.C.; Silva, E.N.; Campos, A.K.; Araújo, J.V. Formulation of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in the control of equine gastrointestinal parasitic nematodes. *Vet. Parasitol.* **2021**, *295*, 109458. [CrossRef]
34. Sanjari, G.; Bofu, Y.; Hossein, G.; Cyril, C. Effects of time-controlled and continuous grazing on total herbage mass and ground cover. *J. Agric. Rural Dev. Trop.* **2009**, *47*, 165–174. [CrossRef]
35. Acharya, M.; Burke, J.M.; Miller, J.E.; Terrill, T.H.; Wood, E.L.; Muir, J.P. Quebracho tannins aid in the control of *Eimeria* spp. and gastrointestinal nematodes in lambs and goat kids. *Vet. Parasitol.* **2020**, *288*, 109295. [CrossRef]
36. Hoste, H.; Meza-OCampos, G.; Marchand, S.; Sotiraki, S.; Sarasti, K.; Blomstrand, B.M.; Williams, A.R.; Thamsborg, S.M.; Athanasiadou, S.; Enemark, H.L.; et al. Use of agro-industrial by-products containing tannins for the integrated control of gastrointestinal nematodes in ruminants. *Parasite* **2022**, *29*, 10. [CrossRef]
37. Paller, V.G.V.; Babia-Abion, S. Soil-Transmitted Helminth (STH) Eggs Contaminating Soils in Selected Organic and Conventional Farms in the Philippines. *Parasit. Epidemiol. Control* **2019**, *7*, e00119. [CrossRef] [PubMed]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6. DISCUSIÓN GENERAL

Los estudios sobre parasitosis en animales silvestres en cautividad son escasos, lo que subraya la importancia de actualizar el conocimiento sobre estas infecciones para establecer programas de control, tratamiento y prevención en los parques zoológicos. El control de parásitos se centra en la administración de antiparasitarios químicos al menos dos o tres veces al año. El control de la fase endógena implica el uso de moléculas antihelmínticas para eliminar las formas parasitarias en el hospedador definitivo. Estas moléculas son eficaces contra las formas parasitarias localizadas en la luz del intestino o en su superficie, pero no contra las larvas enquistadas en los tejidos, que pueden sobrevivir durante meses o incluso años. Estas larvas pueden reactivarse, madurar sexualmente y comenzar a eliminar huevos, provocando la enfermedad en el hospedador definitivo sin necesidad de reinfección. Al considerar este tipo de tratamientos, es importante adaptarlos a las condiciones individuales de cada animal, teniendo en cuenta sus características propias y las del entorno en el que viven. Factores como la edad, el estado de salud o reproductivo, y la historia clínica del animal (incluyendo los viajes realizados a zonas endémicas para ciertos parásitos) influyen en el tratamiento. El entorno también juega un papel importante, ya que el vivir al aire libre, en compañía de otros animales, o en comunidades de carnívoros de diferentes orígenes puede influir en la frecuencia del tratamiento, debido al contacto cercano con las principales fuentes de infección. Las vías de administración de los tratamientos pueden ser oral (comprimidos, suspensión oral o pasta), tópica, mediante aplicación en *spot-on* y *pour-on*, o inyectable. La elección y aplicación de parasiticidas se presentan como algunos de los desafíos para los veterinarios de vida silvestre, debido a la falta de conocimiento sobre las dosis apropiadas o efectos secundarios. Debido a su confinamiento, se alcanzan niveles elevados de contaminación del suelo por parásitos en especies en cautividad a pesar de la desparasitación exitosa que se aplica regularmente (Fagiolini *et al*., 2010; Panayotova-Pencheva, 2016).

El control de los parásitos en animales de zoológico sigue siendo una cuestión pendiente, que incluye la administración de medicamentos antiparasitarios (Adkesson *et al*., 2007; Borges *et al*., 2017). Sin embargo, los análisis para establecer la presencia de infecciones parasitarias rara vez se realizan antes de la desparasitación, y la evaluación del éxito rara vez se tiene en cuenta.

Según las pautas de ESCCAP (2019), los dueños de mascotas deben seguir un conjunto de medidas preventivas simples (por ejemplo, no alimentar con carne cruda a sus mascotas, lavarse las manos antes de comer, lavar los utensilios y superficies que hayan estado en contacto con alimentos crudos, usar guantes cuando se trabaja en el jardín, lavar y desinfectar

USC DE COMPOSTELA

adecuadamente frutas y verduras y eliminar diariamente las heces de las mascotas del entorno). Además, las mascotas deben ser examinadas por un veterinario para evaluar su estado de salud y someterse a un examen coprológico al menos dos veces al año. De acuerdo con los resultados coprológicos y las condiciones de vida, necesitan desparasitación de manera regular (Overgaauw *et al*., 2009; Torgerson y Macpherson, 2011). Además, estas pautas recomiendan un régimen de desparasitación diseñado específicamente para cada mascota en función de una evaluación individual de los factores de riesgo (edad, estado reproductivo, estado de salud, nutrición, alojamiento compartido, vagabundeo, perros de trabajo, ubicación e historial de viajes) (ESCAPP, 2019). Los procedimientos de desparasitación rutinarios deben ser recomendados por los veterinarios teniendo en cuenta las circunstancias epidemiológicas locales y estos factores de riesgo individuales. En algunos países o regiones, la desparasitación de gatos y perros es obligatoria por ley por razones de Salud Pública (Deplazes *et al*., 2011). En algunas regiones españolas, la desparasitación contra las tenias al menos una vez al año es obligatoria. Sin embargo, esta frecuencia se ha descrito como insuficiente para el control efectivo de la equinococosis (Deplazes *et al*., 2011).

La educación es clave para controlar ciertas zoonosis. Los veterinarios a menudo están obligados a informar a los dueños de mascotas sobre los posibles riesgos y ofrecer información detallada sobre las vías de transmisión de parásitos, la importancia de la desparasitación desde una perspectiva de Salud Pública y la protección de otras mascotas, así como las medidas preventivas que ayudarán a los propietarios y mascotas a mantenerse saludables. Actividades como la eliminación diaria de heces del entorno reducirán la probabilidad de infección tanto en mascotas como en propietarios (Robertson y Thompson, 2002; ESCAPP, 2019). Según ESCCAP, también existe un riesgo elevado de importar enfermedades al introducir perros del extranjero. Por ejemplo, *E. multilocularis* es endémico en algunos países europeos, mientras que nunca se ha detectado en España. Esto significa que los perros importados deben ser examinados en busca de estas enfermedades zoonósicas y desparasitados correctamente por un veterinario, ya que estos parásitos pueden causar problemas de salud a largo plazo tanto en humanos como en mascotas (Deplazes *et al*., 2011, Torgerson y Macpherson, 2011).

En entidades como protectoras de animales, perreras o refugios, existen pautas específicas emitidas por diferentes organismos internacionales como la Asociación de Veterinarios de Refugios (ASV) o la Coalición Internacional de Gestión de Animales de Compañía (ICAM), que se preocupan por el bienestar de perros y gatos. Estas pautas se centran en aspectos como la ubicación de los centros, los materiales utilizados en su construcción, la implementación de rutinas de limpieza y desinfección, y los planes de desparasitación, entre otros, con el objetivo de garantizar niveles aceptables de salud y bienestar para los animales acogidos (ICAM, 2007; Newbury *et al.*, 2010). Sin embargo, a pesar de que existen muchas formulaciones efectivas disponibles comercialmente, las especies de animales en cautividad se reinfectan nuevamente en un corto espacio de tiempo, posiblemente debido al hecho de que los animales siempre se mantienen en la misma parcela. Esta situación puede empeorar por problemas de estrés, alimentación, condiciones higiénicas en los recintos y espacios confinados, lo que aumenta la posibilidad de infecciones parasitarias (Palomero *et al*., 2020) y aumenta su exposición a las fases infectantes que se desarrollan en el suelo. Sabiendo que los parásitos son

una de las principales causas de muerte en animales silvestres cautivos, especialmente en aquellos con una carga parasitaria elevada, la gran mayoría de estas infecciones son subclínicas y, por lo tanto, los signos clínicos rara vez son detectados por veterinarios y cuidadores de zoológicos (Atanaskova *et al*., 2011). Esto enfatiza la necesidad de medidas preventivas para evitar que grandes cantidades de parásitos evolucionen a sus respectivas fases infectantes en el entorno (recinto, jaula) donde se encuentran los animales, aumentando así su riesgo de infección y la necesidad de desparasitación adicional. Se ha señalado que los individuos que reciben estos tratamientos de manera regular no presentan signos clínicos de infección (Schieber *et al*., 2019), y esto podría interpretarse como que la infección ha desaparecido por completo. No obstante, la administración periódica de antihelmínticos no previene las reinfecciones entre especies cautivas; por lo que se sugiere que la falta de cuarentena de animales recién ingresados, así como de animales callejeros podrían ser posibles fuentes de infección (Nath *et al*., 2021). Otros problemas que necesitan atención son el uso frecuente de fármacos parasiticidas en combinación con dosis y métodos de administración inadecuados, lo que puede llevar al desarrollo de cepas resistentes de algunas especies de nematodos gastrointestinales (Shalaby, 2013). Se ha informado de la existencia de tricostrongílidos resistentes tanto a levamisol como a fenbendazol en ovejas rojas armenias cautivas, en wapitis a levamisol, y en jirafas a lactonas macrocíclicas e imidazotiazoles (Young *et al*., 2000; Garretson *et al*., 2009). Como se puede entender fácilmente, este problema es idéntico a los problemas reportados durante décadas en animales de granja, los cuales siguen sin resolverse hasta la fecha. Se debería prestar más atención a la prevención con el fin de limitar el riesgo de infección y, por lo tanto, disminuir la necesidad de desparasitación.

Basándonos en el **Artículo 1**, se han descrito diferentes parásitos como protozoos, helmintos o ectoparásitos entre los animales silvestres cautivos, pero los helmintos son los más frecuentemente detectados. Esto ocurre porque los animales están separados, alojados en parques que normalmente impiden la entrada de otros animales y en condiciones más o menos estables en términos de la condición de sus recintos. Todo esto dificulta el desarrollo de parásitos con un ciclo de vida indirecto, en el cual se requiere la colaboración de hospedadores intermediarios (Atanaskova *et al*., 2011). Los helmintos más frecuentes son los ascáridos, estrongílidos, tricúridos y nematodos broncopulmonares (Protostrongylidae y Dictyocaulidae). Por lo tanto, es crucial contar con herramientas adecuadas para el diagnóstico de las infecciones parasitarias. Los diagnósticos de rutina consisten en la visualización de huevos de parásitos en heces, confirmando la existencia de parásitos adultos dentro del hospedador. También existen pruebas de inmunodiagnóstico, aunque un resultado positivo no es suficiente para confirmar el parasitismo, solo la exposición previa (Overgaauw *et al*., 2013).

Los animales silvestres parecen tener una resistencia natural a las infecciones parasitarias, pero cuando se mantienen en cautividad, su sensibilidad a los parásitos parece aumentar, posiblemente debido a la alteración de su ecosistema (Goossens *et al*., 2005). El control de parásitos en animales criados en cautividad se lleva a cabo mediante la administración de fármacos antiparasitarios de amplio espectro, normalmente dos veces al año, contra los estadios albergados en los hospedadores. Para el control de nematodos, los benzimidazoles como el albendazol o el fenbendazol y las lactonas macrocíclicas como la

USC

ivermectina son las familias más utilizadas, mientras que el praziquantel se utiliza para el control de cestodos. El uso de estos fármacos en especies salvajes conlleva una serie de dificultades adicionales: en un gran número de casos, la desparasitación se realiza sin un examen coprológico previo; los fármacos antiparasitarios utilizados para el ganado a menudo no son específicos para la especie objetivo, por lo que se administran en dosis menores para evitar problemas de intoxicación; los problemas de manejo animal pueden causar que la mayoría de los tratamientos se administren por vía oral debido a la imposibilidad de administrarlos por vía parenteral, lo que no asegura la ingestión adecuada de fármacos antiparasitarios, por lo que habrá animales que ingieran una dosis mayor a la recomendada y otros en los cuales la dosis sea prácticamente nula.

Uno de los principales factores limitantes respecto a la implementación de medidas preventivas contra los parásitos es el lugar donde se encuentran estos animales, que generalmente es limitado y permanente. La necesidad de tratamiento antiparasitario se incrementa como consecuencia de las reinfecciones al mantenerse de manera continua en el mismo recinto. Los metabolitos de los fármacos son excretados al medio en la orina y heces de los animales siendo tóxicos para algunas especies de microorganismos que son muy útiles para el enriquecimiento del suelo, como algunos escarabajos coprófagos (Martínez *et al*., 2017; Verdú *et al*., 2020).

Con el propósito de limitar el riesgo de infección por ciertos parásitos, es necesario realizar una monitorización regular con el fin de minimizar el riesgo de reinfección, siendo también importante la limpieza frecuente de los refugios y las instalaciones de los animales, así como la retirada de las heces para evitar que se alcancen los estadios infectantes (Nath *et al*., 2021). Es importante señalar que prevenir la contaminación ambiental por los huevos y larvas de los parásitos representa uno de los pasos clave para detener su transmisión. A pesar de la desparasitación adecuada y la aplicación de buenas prácticas de higiene, los animales que viven en cautividad seguirán sufriendo enfermedades causadas por parásitos. Esto ocurre debido a la presencia de los animales en el mismo lugar durante períodos prolongados, favoreciendo su exposición a formas infectantes, por lo que ocurre la reinfección (Fagiolini *et al*., 2010; Maesano *et al*., 2014). Teniendo en cuenta todo lo anterior, junto con la alta resistencia de los huevos de algunos helmintos e incluso de las larvas infectantes de nematodos gastrointestinales bajo ciertas condiciones, parece necesario adoptar un enfoque alternativo para el control de estos parásitos transmitidos por el suelo (Gavin *et al*., 2005; Overgaauw y van Knapen, 2013; Gałecki *et al*., 2015; Gawor y Borecka, 2017).

Algunos hongos son antagonistas de diferentes parásitos, proporcionando así un método ecológico de control que no es perjudicial para las personas, animales ni plantas. Esta estrategia no está destinada a eliminar todas las formas parasitarias, como ocurre con los fármacos antihelmínticos, sino a buscar un equilibrio entre los animales y los parásitos que no cause un declive en su salud ni productividad (Grønvold *et al*., 1996). Según los datos recopilados en las últimas décadas, los hongos filamentosos saprófitos son capaces de destruir o interferir con el desarrollo de ciertos parásitos en heces y/o suelo, lo que ha cobrado gran importancia en la contribución al control de diferentes parásitos que afectan a los animales mantenidos en parques zoológicos, donde la administración de compuestos químicos parasiticidas, a menudo utilizados

en el ganado, parece ser la única solución. Los hongos con actividad parasiticida resultan de gran utilidad para controlar la carga parasitaria del medio, reduciendo la probabilidad de infección de los animales presentes (Maciel *et al*., 2012; Pérez-Anzúrez *et al*., 2023). Aquellas especies con actividad larvicida actúan frente a las larvas infectantes de nematodos gastrointestinales ya que pueden desarrollar diferentes tipos de trampas en las cuales las fases parasitarias móviles quedan atrapadas, siendo posteriormente absorbidas y finalmente destruidas. Por otro lado, los hongos con actividad ovicida lo hacen frente a huevos de distintos helmintos, ya que sus hifas se adhieren y penetran el huevo a través de pequeños poros de la capa vitelina, causando alteraciones en su permeabilidad. Estos hongos continúan su desarrollo hasta colonizar el contenido del huevo (embrión o larva), desarrollando distintos tipos de actividad ovicida: Tipo 1, cuando las hifas rodean la cubierta del huevo sin penetrarla y no se observan alteraciones en el embrión, pero se detiene el desarrollo del parásito; Tipo 2 si la actividad ocurre cuando la cubierta del huevo y el embrión muestran alteraciones morfológicas sin penetración de hifas; y Tipo 3 en el que las hifas penetran la cubierta del huevo y destruyen el embrión, de modo que los huevos se vuelven completamente inviables, incapaces de infectar a los animales. Si no se observan daños o alteraciones en los huevos, estos permanecen viables, lo que se considera actividad Tipo 0 (Cazapal-Monteiro *et al*., 2015). Es importante enfatizar que, dependiendo de la fase infectante del parásito es necesario un mecanismo con distinta actividad parasiticida. En los ascáridos o tricúridos, la fase infectante es inmóvil (huevo larvado), por lo que los hongos ovicidas resultan de gran utilidad (Ferreira *et al*., 2011). Por otro lado, los estrongílidos tienen una fase infectante móvil (L3), y pueden ser controlados mediante hongos larvicidas.

Para establecer la utilidad del control biológico para prevenir el desarrollo de parásitos hasta sus fases infectantes, se realizaron pruebas que consistían en la adición de clamidosporas de *D. flagrans*, *M. circinelloides*, *Verticillium* y *Paecilomyces* sobre heces de animales parasitados. Algunos de estos estudios se llevaron a cabo en un parque zoológico ubicado en Galicia (noroeste de España), donde estos hongos filamentosos fueron aislados y probados frente a varios nematodos gastrointestinales de carnívoros, équidos, rumiantes y herbívoros monogástricos mantenidos en cautiverio con resultados notables. Se rociaron clamidosporas de *M. circinelloides*, *Paecilomyces* y *Verticillium* sobre heces de mapaches (*Procyon lotor*) que eliminaban huevos de *B. procyonis*, obteniéndose reducciones del 53-69%, 45-62% y 52-67%, respectivamente, lo que indica una actividad Tipo 3 para estos tres hongos (Cazapal-Monteiro *et al*., 2015). Resultados similares se registraron cuando se añadió *M. circinelloides* sobre huevos de *T. leonina* y *Parascaris equorum*, obteniéndose reducciones del 58% y 61-67%, respectivamente (Arroyo *et al*., 2016; Hernández *et al*., 2018). La actividad ovicida Tipo 3 fue observada con todas las especies fúngicas en cada experimento, lo que concuerda con nuestros resultados (**Artículo 2** y **3**). Además, la adición de esporas de *M. circinelloides* o *T. atrobrunneum* a las heces de dromedarios (*Camelus dromedarius*) redujo la viabilidad de los huevos de *Trichuris* sp. al 50% (Hernández *et al*., 2018). Para evaluar la actividad larvicida del hongo atrapa-nematodos *D. flagrans* sobre L3 de estrongílidos de équidos, se añadieron clamidosporas al alimento dos veces por semana, alcanzando una reducción del 84-89% (Arias *et al*., 2015). La viabilidad de los huevos o larvas de nematodos gastrointestinales se redujo en

≥45%. Debe considerarse que, hasta el momento, se han realizado pocas pruebas sobre la eficacia de los hongos en parásitos que afectan a estos animales, y la mayoría de ellas se han llevado a cabo *in vitro* en placas Petri. Por lo tanto, es necesario buscar una alternativa para asegurar la presencia de las distintas estructuras fúngicas (micelio, esporas) en las heces y así interactuar con las diferentes fases parasitarias pudiendo desarrollar su actividad antagónica. Existen varias posibilidades, siendo más eficaces aquellas formulaciones que se administran vía oral a los animales.

Debido a la resistencia de las clamidosporas a altas temperaturas y condiciones de pH, estos hongos pueden sobrevivir al paso a través del tracto digestivo y, una vez excretados, se desarrollan en las heces, lo que los convierte en candidatos ideales para la administración oral (Canhão-Dias *et al*., 2020). En las últimas décadas, se han probado diferentes formulaciones para la administración de hongos a los animales. Una de ellas consistió en mezclar manualmente las esporas con el alimento antes de dárselo a los animales. La solución fúngica, que podía contener una o dos especies de hongos, debe mezclarse con el concentrado alimentario inmediatamente antes de su administración a los animales para evitar cualquier alteración de sus características organolépticas, haciéndolo poco apetitoso para los animales (Hernández *et al*., 2016). Otra posibilidad fue incorporar estas clamidosporas en un suplemento alimenticio con granos y alimentos dulces para mejorar su consumo por los animales. Esta estrategia se utilizó con éxito en jirafas, antílopes y gerenuks en EEUU. (Terry, 2013), pero también en España con burros europeos, burros africanos y cebras (Arias *et al*., 2015), logrando elevados porcentajes de reducción larvaria. Otra opción para proporcionar las esporas por vía oral es utilizar el polvo resultante del triturado de los hongos que logró reducir la presencia de L3 de nematodos gastrointestinales en jirafas reticuladas, orix de cuerno cimitarra y antílope roano al mezclarlo con su alimento (Young, 2018). Para facilitar aún más la tarea de administrar las esporas a los animales, se realizaron algunos experimentos con pellets nutricionales a los cuales se añadieron clamidosporas de *M. circinelloides* y *D. flagrans* durante la fase de mezcla del proceso de fabricación. Se comprobó la capacidad de ambos hongos para reducir las fases infectantes de *Trichostrongylus*, *Nematodirus*, *Chabertia* y *Haemonchus* en el suelo (Arroyo *et al.*, 2016), disminuyendo la probabilidad de reinfección en todas las especies estudiadas, al no requerirse otro tratamiento antihelmíntico de los animales en los 24 meses que duró el estudio.

Todos estos experimentos realizados con animales domésticos o silvestres mantenidos en cautividad requirieron una desparasitación individual antes de comenzar la administración fúngica, ya que los hongos nematófagos no tienen efecto sobre los parásitos albergados dentro del animal y solo destruyen aquellas fases parasitarias de vida libre (Terry, 2013). Es importante subrayar la ausencia de efectos secundarios cuando se administraron clamidosporas fúngicas a caballos, vacas y ovejas, así como a animales silvestres en cautividad (Terry, 2013; Palomero *et al*., 2018). Estas investigaciones corroboran hallazgos previos, demostrando que la administración oral de esporas fúngicas es posible mediante diferentes formulaciones alimentarias.

Un programa eficaz de control de parásitos que integre análisis coprológicos previos a la desparasitación, junto con la administración periódica de clamidosporas de hongos parasiticidas, parece ser una contribución novedosa y útil para el manejo sostenible de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

infecciones digestivas en parques zoológicos. Parece muy plausible que se pueda desarrollar una estrategia sostenible y ecológica para animales silvestres cautivos no solo en zoológicos, sino también aquellos animales mantenidos en áreas públicas, constituyendo un procedimiento seguro. Las principales ventajas de usar ciertos hongos filamentosos saprófitos para el control de helmintos que afectan a las especies animales se centran en la posibilidad de reducir el riesgo de infección para prevenir daños a los hospedadores y minimizar la necesidad de aplicación frecuente de antiparasitarios químicos (Ortiz Pérez *et al*., 2017; Mendoza *et al*., 2018).

En el **Artículo 2**, se probó una nueva forma de administración de hongos filamentosos a base de gelatina a la que previamente se añadieron clamidosporas de *M. circinelloides* y *D. flagrans* y que se ofrecieron a cachorros y babuinos infectados por *T. canis* y *Trichuris* sp., respectivamente. Cuatro semanas después, la viabilidad de los huevos de *T. canis* en las muestras fecales se redujo a la mitad, lo que concuerda con investigaciones previas en las que los cachorros recibieron pellets nutricionales premezclados con las clamidosporas fúngicas (Hernández *et al*., 2018a). Algunos estudios *in vitro* señalaron que los hongos filamentosos como *P. chlamydosporia* o *Purpureocillium lilacinum* tienen una notable actividad antagonista sobre los huevos de *T. canis* (Carvalho *et al*., 2010; Hywel-Jones y Samson, 2011; Maciel *et al*., 2012; Araujo *et al*., 2013). Al pulverizar esporas de *T. atrobrunneum* o *Clonostachys rosea* directamente sobre heces de cerdos que eliminaban huevos de *A. suum*, Viña *et al*. (2020) reportaron un efecto ovicida del 50-66%, respectivamente. Resultados similares se alcanzaron en heces de lince que eliminaban huevos de *T. leonina*, al pulverizarlas con esporas de *M. circinelloides* (Hernández *et al*., 2018b). Esta formulación a base de gelatina era fácil de preparar y los cachorros la tomaban rápidamente (en menos de cinco minutos) sin embargo, mientras que algunos babuinos se negaron a tomarla y otros lo hicieron con dificultad. Además, la necesidad de mantener las gelatinas refrigeradas para mantener su consistencia suponía una dificultad ya que se derretían después de 15-20 días, complicando su manejo y administración más allá de este intervalo. En un intento de prolongar su vida útil, esta formulación a base de gelatina se deshidrató, probándose en otros grupos de cachorros infectados por *T. canis*, así como en los babuinos que excretaban huevos de *Trichuris* sp. Se obtuvieron resultados similares a los descritos en el primer experimento (con gelatina), en línea también con un estudio previo con cachorros que recibieron pellets nutricionales rociados con la misma mezcla de clamidosporas parasiticidas (Hernández *et al*., 2018a). La viabilidad de los huevos de *Trichuris* sp. en las heces de babuinos se redujo un 30%, pero las formulaciones deshidratadas se tuvieron que romper y mezclar con frutas, cereales o semillas para facilitar su ingesta. Disminuir la actividad del agua a casi cero evita la desintegración de esta formulación, que puede así ser fácilmente manipulada y transportada, además de conservarse a temperatura ambiente durante meses. Cuando se almacenan en condiciones óptimas evitando humedad y la exposición directa a la luz solar, su apariencia externa no se modifica y no se produce desarrollo fúngico, lo cual es relevante para los dueños o cuidadores de los animales.

Gran parte de la investigación realizada hasta ahora sobre el uso de ciertas cepas de hongos parasiticidas contra diferentes helmintos capaces de infectar animales se ha centrado en el ganado, principalmente rumiantes (Vilela *et al*., 2016; Canhão-Dias *et al*., 2020; Rodrigues *et al*., 2020; Araújo *et al*., 2021). Para ello, se han diseñado formulaciones adecuadas que

permiten la administración oral de esporas/micelio fúngico como galletas con cereales, pellets nutricionales o bloques energéticos (Sagüés *et al*, 2011; Healey *et al*., 2018; Voinot *et al*., 2021a). Sin embargo, debe destacarse que algunas especies animales (como mascotas) no reciben estas formulaciones debido a la ausencia de productos comerciales disponibles o porque no forman parte de su dieta. En muchas áreas, los caballos se mantienen en régimen de pastoreo y rara vez (si es que alguna vez) reciben suplementos (Hernández *et al*., 2018c).

En el caso de los animales silvestres cautivos en zoológicos, ciertos aspectos relacionados con el beneficio económico pueden complicar la situación. Existe un alto número de especies con requisitos nutricionales específicos, y para los cuales no existen preparaciones comerciales disponibles en el mercado, a diferencia de lo que ocurre en los animales domésticos. Todas estas preocupaciones interfieren en la aplicación de estas estrategias sostenibles basadas en agentes biológicos para el control de los helmintos, por lo que se requieren nuevos abordajes para mejorar su implementación.

En cuanto a la preparación de las dos formulaciones comestibles, un problema crucial radica en que la concentración de clamidosporas podría reducirse. Como se esperaba, se obtuvieron variaciones menores y no significativas en la preparación de formulaciones a base de gelatina. Sin embargo, se observó que el recuento de clamidosporas fúngicas disminuyó de manera significativa en aproximadamente un 10% después de su deshidratación. Es destacable señalar una actividad parasiticida similar en las heces de los cachorros que recibieron la formulación a base de gelatina o en aquellos a los que se les dio la formulación deshidratada. Además, se observaron ligeras y no significativas variaciones durante un período de almacenamiento de ocho meses, lo que remarca el efecto beneficioso que se consigue al deshidratar las gelatinas.

Durante décadas, la desparasitación de los animales se ha considerado a menudo la única medida para el control de los helmintos, pero su uso excesivo o una dosificación incorrecta han provocado porcentajes de eficacia más bajos de lo esperado, e incluso el desarrollo de resistencias de estos nematodos frente a los antihelmínticos (Vercruysse *et al*., 2011; Moudgil y Singla, 2018; Lahat *et al*., 2021). Esto subraya la necesidad de desarrollar estrategias preventivas adicionales para prolongar la necesidad de repetir el tratamiento, evitando así las resistencias mencionadas (Goossens *et al*., 2005). Al considerar que los animales se infectan por la ingestión de fases infectantes que se desarrollan en el suelo, la capacidad de dañar permanentemente los huevos de ciertos helmintos o de detener o retrasar su desarrollo resulta clave para la prevención de parasitosis.

El éxito de cualquier programa de control parasitario depende de la disminución del riesgo de reinfección de los animales, lo que está directamente relacionado con el nivel de contaminación del suelo por las distintas fases infectantes (Maesano *et al*., 2014; Palomero *et al*., 2020). La estimación del Índice de Contaminación del Suelo basado en el porcentaje de huevos viables que se desarrollaron hasta el estadio infectante en el grupo testigo (cachorros sin exposición a los hongos) fue tres veces superior al detectado en el grupo tratado (heces recogidas después de dos meses tomando clamidosporas), y cinco veces superior en babuinos, lo que confirma que el riesgo de infección puede reducirse hasta tres veces en presencia de hongos filamentosos, como señalaron Viña *et al*. (2020). La desparasitación antihelmíntica proporciona resultados exitosos frente a nematodos gastrointestinales, pero los animales se

vuelven a infectar, especialmente aquellos mantenidos en regímenes de pastoreo, debido a la existencia de fases infectantes en el suelo (Van Metre *et al*., 2008). Sin importar su etapa de desarrollo (cigoto, mórula, blástula, larva), los huevos de *Trichuris* spp. pueden sobrevivir durante años en áreas húmedas y sombreadas (Taylor *et al*., 2015; Bulbul *et al*., 2020); por lo tanto, parece bastante plausible que minimizar la contaminación de los pastos pueda representar un factor importante y útil para el control de la infección (Peek *et al*., 2018).

En el **Artículo 3**, una mezcla de clamidosporas de dos hongos con actividad parasiticida, *M. circinelloides* y *D. flagrans*, fue administrada a bisontes mantenidos en pastoreo continuo y que excretaban huevos de *Trichuris* sp. en sus heces. Dos semanas después, la viabilidad de estos huevos disminuyó 1,3 veces, y 1,8 veces en la cuarta semana. Estos resultados confirman el efecto ovicida que ejercen estos hongos parasiticidas sobre los huevos de *Trichuris* sp., lo que coincide con estudios previos realizados en heces de dromedarios cautivos en un zoológico (Hernández *et al*., 2018).

Una vez en el suelo, los huevos de *Trichuris* sp. pasan por diferentes etapas, y después de 2 a 4 semanas, dependiendo de las condiciones ambientales (temperatura y humedad), se forma una L1 en su interior. La infección ocurre solo cuando las fases infectantes son ingeridas, lo que significa que la ingestión de huevos en otras etapas de desarrollo no representa un riesgo para los animales. Por esta razón, el período de tiempo hasta que se desarrolla la L1 es de gran importancia. La presencia de huevos infectantes en las heces del grupo testigo (sin clamidosporas) se registró a partir de la segunda semana, coincidiendo con investigaciones previas (Forman *et al*., 2021); además, más de dos quintos de los huevos mostraban desarrollo embrionario en su interior en ese momento. Sin embargo, en grupo tratado tan solo el 1% de los huevos alcanzaron el estadio infectante a la tercera semana, permaneciendo dos tercios sin desarrollar (cigoto), el doble de aquellos en ausencia de hongos (grupo testigo). Estos resultados destacan que se puede alcanzar un elevado efecto ovistático al administrar una mezcla de clamidosporas de *M. circinelloides* y *D. flagrans* a los bisontes.

La mayor parte de la información sobre la utilidad de los hongos para controlar las infecciones parasitarias se ha adquirido proporcionando clamidosporas de *D. flagrans* a los animales (Buzatti *et al*., 2015; Ortiz Pérez *et al*., 2017). Recientemente, se ha demostrado la compatibilidad y actividad nematicida *in vitro* de *P. chlamydosporia* (ovicida) y *Arthrobotrys cladodes* (larvicida), o *P. chlamydosporia* y *Monacrosporium sinense* (larvicida), contra larvas de nematodos gastrointestinales que afectan a los bóvidos (Hernández *et al*., 2018; Vieira *et al*., 2019), como se describió anteriormente con *M. circinelloides* y *D. flagrans* (Arias *et al*., 2013). Esta mezcla fúngica confirmó que el espectro parasiticida se incrementa notablemente debido al efecto antagónico ejercido simultáneamente sobre los huevos y larvas en desarrollo en las heces y en el suelo (Hernández *et al*., 2018).

Una cuestión interesante asociada con el uso de hongos parasiticidas en los animales está relacionada con su administración. Por ello, se han probado distintas formulaciones para vehicular esporas y/o micelio de varios hongos; soluciones acuosas (Paraud *et al*., 2005; Silva *et al*., 2017; Voinot *et al*., 2021), pellets nutricionales elaborados a mano (Aguilar-Marcelino *et al*., 2017) o fabricados industrialmente (Voinot *et al*., 2020), o también harina de cereales (Healey *et al*., 2018; Fausto *et al*., 2021). Estas formulaciones no solo deben ser efectivas, sino

también fáciles de preparar, conservar y administrar. Para cumplir con estos objetivos, en este artículo las clamidosporas de *M. circinelloides* y *D. flagrans* se formularon como gelatinas comestibles y luego se deshidrataron para mejorar su conservación. De esta manera, se obtuvo un producto final después de un procedimiento sencillo que puede mantenerse durante largos períodos sin refrigeración ni congelación, siendo muy fácil de administrar a los animales, bien solos o mezclados con el alimento.

Además del manejo de los pastos, la información sobre la prevención de infecciones por nematodos gastrointestinales, incluida la tricurosis, es escasa por lo que el tratamiento antihelmíntico es muy utilizado. Esta medida no afecta a la supervivencia y/o el desarrollo de los parásitos en el suelo hasta que alcancen la fase infectante, por lo que el riesgo de infección permanece alto o incluso aumenta. Debe destacarse que, en este estudio, la viabilidad de los huevos disminuyó casi a la mitad, y el riesgo de contaminación del suelo por *Trichuris* sp. se redujo cinco veces en el grupo tratado con hongos parasiticidas. Se recomienda el pastoreo rotacional para reducir el riesgo de infección por ciertos helmintos, basándose en los bajos niveles de contaminación que se alcanzan. Esto favorece la biodiversidad de plantas, pero supone la disponibilidad de un alto número de praderas, lo que dificultaría su implementación (Sanjari *et al*., 2009). En cuanto a los animales confinados en zoológicos, el pastoreo rotacional no es posible si se mantienen en parcelas cercadas, debido al estrés que implica moverlos, la posibilidad de establecer contacto visual con otras especies animales que son sus depredadores naturales o de oírlas. Por lo tanto, al considerarse este estudio e investigaciones previas con rumiantes cautivos mantenidos en la misma parcela (Kołodziej-Sobocińska *et al*., 2016; Palomero *et al*., 2020; Voinot *et al*., 2021), los resultados tras la administración de clamidosporas de *M. circinelloides* y *D. flagrans* a bisontes podrían extrapolarse directamente a rumiantes domésticos mantenidos en pastoreo continuo, disminuyendo significativamente el riesgo de infección. En la última década, la capacidad de los taninos condensados para reducir los niveles de infección por nematodos gastrointestinales supuso la base para diversos estudios sobre su efecto en rumiantes que se alimentan de plantas ricas en taninos (Acharya *et al*., 2020; Hoste *et al*., 2022).

Finalmente, es importante señalar que, por acción de la lluvia o las lombrices de tierra, los huevos de *Trichuris* sp. y otros nematodos gastrointestinales pueden ser lixiviados y, por lo tanto, podrían encontrarse desde la superficie del suelo hasta a 10 cm de profundidad (Paller *et al*., 2019). En consecuencia, la administración oral de esporas de hongos parasiticidas ofrece una herramienta muy útil para asegurar que los agentes antagónicos entren en contacto con los huevos, independientemente de su localización. Esto supone ventaja significativa sobre otros métodos de aplicación, como pulverizar directamente sobre el suelo o las heces (Silva *et al*., 2017; Hernández *et al*., 2018; Viña *et al*., 2020).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

7. CONCLUSIONES

Los trabajos realizados en esta Tesis Doctoral nos llevaron a las siguientes conclusiones:

1. Las investigaciones publicadas hasta el momento demuestran que los hongos filamentosos saprófitos tienen la capacidad de destruir o interferir en el desarrollo de ciertos parásitos presentes en heces y suelo, porque contribuyen a reducir el riesgo de infecciones y la frecuencia del uso de tratamientos antihelmínticos. Teniendo en cuenta la dificultad que supone, es necesario disponer de nuevas formas de distribución a animales cautivos en parques zoológicos.

2. La elaboración de gelatinas comestibles con clamidosporas de *Mucor circinelloides* (ovicida) y *Duddingtonia flagrans* (larvicida) proporciona una solución práctica e innovadora para administrar estos hongos saprófitos filamentosos a animales. La caducidad de esta formulación se incrementa considerablemente mediante su deshidratación, lo que facilita significativamente su conservación y distribución entre especies animales.

3. La formulación seca con clamidosporas de *Mucor circinelloides* y *Duddingtonia flagrans* no genera estrés en animales, es aceptada sin problemas y proporciona una alta eficacia en la reducción del riesgo de infección por *Trichuris sp.,* por lo que se recomienda especialmente para animales mantenidos bajo regímenes de pastoreo continuo.

4. La combinación del análisis previo de heces, la desparasitación en caso de ser necesaria, y la aplicación periódica de clamidosporas de *M. circinelloides* y *D. flagrans* constituye un programa integrado para el control parasitario de animales silvestres en cautividad, y también en cachorros.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5. Mediante el desarrollo de una estrategia sostenible y ecológica, basada en la aplicación de una mezcla de los hongos *M. circinelloides* y *D. flagrans*, se dispone de una estrategia segura y beneficiosa para la salud animal y la gestión ambiental.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

8. REFERENCIAS

Abdi J, Darabi M, Sayehmiri K. (2012). Epidemiological situation of toxocariasis in Iran: Meta-analysis and systematic review. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, *15*(22), 1052-1055. https://doi.org/10.3923/pjbs.2012.1052.1055.

Abou-El-Naga IF. (2018). Developmental stages and viability of *Toxocara canis* eggs outside the host. *Biomedica*, *38*(2),189-197. https://doi.org/10.7705/biomedica.v38i0.3684.

Acha PN, Szyfres B. (2001). *Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals*, Vol. 1. (3rd ed.). Pan American Health Organization. https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2010/ZoonosesCommonManAnimals.pdf

Acha PN, Szyfres B. (2003). *Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals*, Vol. 1. (3rd ed.). Pan American Health Organization. https://iris.paho.org/handle/10665.2/709.

Acharya M, Burke JM, Miller JE, Terrill TH, Wood EL, Muir JP. (2020). Quebracho tannins aid in the control of *Eimeria* spp. and gastrointestinal nematodes in lambs and goat kids. *Veterinary Parasitology*, 288, 109295. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109295.

Adkesson MJ, Langan JN, Paul A. (2007). Evaluation of control and treatment of *Gongylonema* spp. infections in callitrichids. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, *38*(1), 27-31. https://doi.org/10.1638/06-005.1.

Agerholm JS. (2013). *Coxiella burnetii* associated reproductive disorders in domestic animals—a critical review. *Acta Veterinaria Scandinavica*, *55*(1), 13. https://doi.org/10.1186/1751-0147-55-13.

Aguilar-Marcelino L, Mendoza-de-Gives P, Torres-Hernández G, López-Arellano ME, Becerril-Pérez CM, Orihuela-Trujillo A, Torres-Acosta J, Olmedo-Juárez A. (2017). Consumption of nutritional pellets with *Duddingtonia flagrans* fungal chlamydospores reduces infective nematode larvae of *Haemonchus contortus* in faeces of Saint Croix lambs. *Journal of Helminthology*, *91*(6), 665-671. https://doi.org/10.1017/S0022149X1600081X.

Akao N, Desowitz RS, Kondo K. (1990). Decrease in litter size of female mice with *Toxocara canis*. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *84*(5), 724. https://doi.org/10.1016/0035-9203(90)90164-A.

Albajes R, Alomar Ò. (1999). Current and potential use of polyphagous predators. In: Albajes R, Lodovica Gullino M, van Lenteren JC, Elad Y (Eds.) *Integrated Pest and Disease Management in Greenhouse Crops*. *Developments in Plant Pathology*, Vol. 14. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/0-306-47585-5_19.

Albonico M, Bickle Q, Ramsan M, Montresor A, Savioli L, Taylor M. (2003). Efficacy of mebendazole and levamisole alone or in combination against intestinal nematode infections after repeated

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

targeted mebendazole treatment in Zanzibar. *Bulletin of the World Health Organization*, *81*(5), 343-352.

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. https://doi.org/10.1134/S0026261711020020.

Araujo JM, Araújo JV, Braga FR, Araújo DM, Ferreira SR, Soares FEF, Benjamin LA (2012). Survival of *Pochonia chlamydosporia* in the gastrointestinal tract of experimentally treated dogs. *Research in Veterinary Science*, *93*(2), 803-806. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.10.019.

Araujo JM, Araújo JV, Braga FR, Ferreira SR, Tavela AO. (2013). Predatory activity of chlamydospores of the fungus *Pochonia chlamydosporia* on *Toxocara canis* eggs under laboratory conditions. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, *22*(2), 171-174. https://doi.org/10.1590/s1984-29612013000100033.

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*. *Veterinary Parasitology*, *166*(1-2), 86-89. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.08.003.

Araújo JV, Braga FR, Mendoza-de-Gives P, Paz-Silva A, Vilela VLR. (2021). Recent advances in the control of helminths of domestic animals by helminthophagous fungi. *Parasitologia*, *1*(3), 168-176. https://doi.org/10.3390/parasitologia1030018.

Araújo JV, Braga FR, Mendoza-de-Gives P, Paz-Silva A, Vilela VLR. (2021). Recent advances in the control of helminths of domestic animals by helminthophagous fungi. *Parasitologia*, *1*(3), 168-176. https://doi.org/10.3390/parasitologia1030018.

Arias M, 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. (2013). A preliminary study of the biological control of strongyles affecting equids in a zoological park. *Journal of Equine Veterinary Science*, *33*(12), 1115-1120. https://doi.org/10.1016/j.jevs.2013.04.013.

Arias MS, Valderrábano, E, Cazapal-Monteiro C, Rois L, Miguélez S, Rodríguez I, Morrondo, P, Sánchez-Andrade R. (25-27 de noviembre de 2011). Control ecológico de parasitismos que afectan a animales salvajes en cautividad. Resultados preliminares en Marcelle Natureza (Lugo, España). (Ponencia). II Curso de Medicina Veterinaria y Conservación de Parques zoológicos. Lugo, España.

Arias MS, Arroyo FL, Cazapal-Monteiro CF, 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. *Journal of Science Technology and Environment*, 5, 3000249.

Arias MS, Cazapal-Monteiro CF, Francisco I, López-Arellano ME, Piñeiro P, Suárez JL, Sánchez-Andrade R, Mendoza de Gives P, Paz-Silva A. (2013b). Trematodes enhance the development of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys (Duddingtonia) flagrans*. *Fungal Biology*, *117*, 540-544. https://doi.org/10.1016/j.funbio.2013.06.003.

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. (2013a). Mixed production of filamentous fungal

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

spores for preventing soil-transmitted helminth zoonoses: a preliminary analysis. *BioMed Research International*, 567876. https://doi.org/10.1155/2013/567876.

Arroyo F, Hernández JA, Cazapal-Monteiro CF, Pedreira J, Sanchís J, Romasanta Á, Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A, Arias MS (2017). Effect of the filamentous fungus *Mucor circinelloides* on the development of eggs of the rumen fluke *Calicophoron daubneyi* (Paramphistomidae). *Journal of Parasitology*, *103*(3), 199-206. https://doi.org/10.1645/16-76.

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 parasiticidal activity after the industrial feed pelleting enhances the possibilities of biological control of livestock parasites. *Biological Control*, *92*, 38-44. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.09.007.

Asakura T, Nakamura S, Ohta M, Une Y, Furuya K. (2006). Genetically unique microsporidian *Encephalitozoon cuniculi* strain type III isolated from squirrel monkeys. *Parasitology International*, *55*(2), 159-162. https://doi.org/10.1016/j.parint.2006.02.002.

Asanji MF, Williams MO. (1984). The effect of sex on seasonal variation in single and double infection of cattle in Sierra Leone by *Dicrocoelium hospes* and *Fasciola gigantica*. *Veterinary Parasitology*, *15*(3-4), 247-255. https://doi.org/10.1016/0304-4017(84)90076-1.

Atanaskova E, Kochevski Z, Stefanovska J, Nikolovski G. (2011). Endoparasites in wild animals at the zoological garden in Skopje, Macedonia. *Journal of Threatened Taxa*, *3*, 1955-1958. https://doi.org/10.11609/JoTT.o2440.1955-8.

Avato P, Bucci R, Tava A, Vitali C, Rosato A, Bialy Z, Jurzysta M. (2006). Antimicrobial activity of saponins from *Medicago* sp.: Structure-activity relationship. *Phytotherapy Research*, *20*(6), 454-457. https://doi.org/10.1002/ptr.1876.

Avato P, Migoni D, Argentieri M, Fanizzi FP, Tava A. (2017). Activity of saponins from *Medicago* species against HeLa and MCF-7 cell lines and their capacity to potentiate cisplatin effect. *Anticancer Agents in Medicinal Chemistry*, *17*(11), 1508-1518. https://doi.org/10.2174/1871520617666170727152805.

Avcioglu H, Burgu A. (2008). Seasonal prevalence of *Toxocara ova* in soil samples from public parks in Ankara, Turkey. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, *8*(3), 345-350. https://doi.org/10.1089/vbz.2007.0212.

Aviruppola AJM, Rajapakse RPVJ, Rajakaruna RS. (2016). Coprological survey of gastrointestinal parasites of mammals in Dehiwala National Zoological Gardens, Sri Lanka. *Ceylon Journal of Science*, *45*, 83-96.

Awadallah MA, Salem LM. (2015). Zoonotic enteric parasites transmitted from dogs in Egypt with special concern to *Toxocara canis* infection. *Veterinary World*, *8*(8), 946-957. https://doi.org/10.14202/vetworld.2015.946-957.

Ayres RM, Mara DD. (1996). *Analysis of wastewater for use in agriculture: A laboratory manual of parasitological and bacteriological techniques*, Geneva: WHO, 1-35.

Azam D, Ukpai OM, Said A, Abd-Allah GA, Morgan ER. (2012). Temperature and the development and survival of infective *Toxocara canis* larvae. *Parasitology Research*, *110*(2), 649-656. https://doi.org/10.1007/s00436-011-2536-8.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Bambou JC, Ceï W, Arquet R, Calif V, Bocage B, Mandonnet N, Alexandre G. (2021). Mixed grazing and dietary supplementation improve the response to gastrointestinal nematode parasitism and production performances of goats. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 628686. https://doi.org/10.3389/fvets.2021.628686.

Baneth G, Thamsborg SM, Otranto D, Guillot J, Blaga R, Deplazes P, Solano-Gallego L. (2016). Major parasitic zoonoses associated with dogs and cats in Europe. *Journal of Comparative Pathology*, *155*(1), S54-S74. https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2015.10.179.

Barbosa AS, Pinheiro JL, dos Santos CR. (2020). Gastrointestinal parasites in captive animals at the Rio de Janeiro Zoo. *Acta Parasitologica*, *65*, 237-249. https://doi.org/10.2478/s11686-019-00145-6.

Baron NC, Rigobelo EC, Zied DC. (2019). Filamentous fungi in biological control: current status and future perspectives. *Chilean Journal of Agricultural Research*, *79*(2), 307-321. https://doi.org/10.4067/S0718-58392019000200307.

Baron S, editor. (1996). *Medical Microbiology*, (4th ed.). Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston.

Barratt JL, Harkness J, Marriott D, Ellis JT, Stark D. (2010). Importance of nonenteric protozoan infections in immunocompromised people. *Clinical Microbiology Reviews*, *23*, 795-836. https://doi.org/10.1128/CMR.00001-10.

Bártová E, Lukášová R, Vodička R, Váhala J, Pavlačík L, Budíková M, Sedlák K. (2018). Epizootological study on *Toxoplasma gondii* in zoo animals in the Czech Republic. *Acta Tropica*, *187*, 222-228. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.08.005.

Batchelor DJ, Tzannes S, Graham PA, Wastling JM, Pinchbeck GL, German AJ. (2008). Detection of endoparasites with zoonotic potential in dogs with gastrointestinal disease in the UK. *Transboundary and Emerging Diseases*, *55*(2), 99-104. https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2007.01005.x.

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. *Veterinary Parasitology*, *89*(3), 219-230. https://doi.org/10.1016/s0304-4017(00)00201-6.

Baumm J, Stoye M. (1981). Pränatale und galaktogene Infektionen mit *Toxocara canis* WERNER 1782 (Anisakidae) bei der Maus. *Zentralblatt fur Veterinarmedizin. Reihe B*, *28*, 319-328. https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1981.tb01917.x.

Beaver PC, Jung RC, Cupp EW. (1984). *Clinical parasitology*. (9th ed.). Philadelphia: Lea & Febiger; Visceral *larva migrans*; p. 325-329.

Beaver PC, Little MD. (1964). The genital girdle in relation to estrus and mating in *Ascaris lumbricoides*. *Journal of Parasitology*, *50*, 128-130. https://doi.org/10.2307/3276046.

Belizario VY, Amarillo ME, de Leon WU, de los Reyes AE, Bugayong MG, Macatangay BJ. (2003). A comparison of the efficacy of single doses of albendazole, ivermectin, and diethylcarbamazine alone or in combinations against *Ascaris* and *Trichuris* spp. *Bulletin of the World Health Organization*, *81*(1), 35-42.

Benbow SMP. (2004). Death and dying at the zoo. *The Journal of Popular Culture*, *37*(3), 379-398.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Berny J-F, Hennebert GL. (1991). Viability and stability of yeast cells and filamentous fungus spores during freeze-drying: effects of protectants and cooling rates. *Mycologia*, *83*, 805-815. https://doi.org/10.1080/00275514.1991.12026086.

Berri M, Bernard F, Lecu A, Ollivet-Courtois F, Rodolakis A. (2004). Molecular characterisation and ovine live vaccine 1B evaluation toward a *Chlamydophila abortus* strain isolated from springbok antelope abortion. *Veterinary Microbiology*, *103*(3-4), 231-240. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.08.009.

Bethony JM, Brooker S, Albonico M, Geiger SM, Loukas A, Diemert D, Hotez PJ. (2006). Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. *The Lancet*, *367*, 1521-1532.

Betson M, Søe M, Nejsum P. (2015). Human trichuriasis: whipworm genetics, phylogeny, transmission and future research directions. *Current Tropical Medicine Reports*, *2*, 209-217. https://doi.org/10.1007/s40475-015-0062-y.

Beugnet F, Bourdeau P, Chalvet-Monfray K, Cozma V, Farkas R, Guillot J, Halos L, Joachim A, Losson B, Miró G, Otranto D, Renaud M, Rinaldi L. (2014). Parasites of domestic owned cats in Europe: co-infestations and risk factors. *Parasites & Vectors*, *7*, 291. https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-291.

Beugnet F, Halos L, Guillot J. (2018). *Textbook of clinical parasitology in dogs and cats*. Servet Editorial-Grupo Asís Biomedia, S.L.

Beyazıt A, Selver MM. (2011). İzmir'de bir zebrada görülen parazitler [Parasites observed in a zebra in Izmir]. *Turkiye Parazitol Derg*, *35*(4), 204-206. https://doi.org/10.5152/tpd.2011.51.

Bindke JD, Springer A, Böer M, Strube C (2017) Helminth fauna in captive European gray wolves (*Canis lupus lupus*) in Germany. *Frontiers in Veterinary Science*, *4*(228). https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00228.

Blaszkowska J, Wojcik A, Kurnatowski P, Szwabe K. (2013). Biological interactions between soil saprotrophic fungi and *Ascaris suum* eggs. *Veterinary Parasitology*, *196*(3-4), 401-408. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.02.029.

Blood DC, Radostits OM. (2000). *Veterinary Medicine: A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses.* (9th ed.). Saunders Ltd.

Borges JC, Jung LM, Santos SS, Carvalho VL, Ramos RA, Alves LC. (2017). Treatment of *Pulmonicola cochleotrema* infection with ivermectin-praziquantel combination in an Antillean manatee (*Trichechus manatus manatus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, *48*(1), 217-219. https://doi.org/10.1638/2016-0149.1

Braga FR, Araújo JV, Silva AR, Araujo JM, Carvalho RO, Tavela AO, Campos AK, Carvalho GR. (2009). Biological control of horse cyathostomin (Nematoda: Cyathostominae) using the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in tropical southeastern Brazil. *Veterinary Parasitology*, *163*(4), 335-340. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.05.003.

Braga FR, Araújo JV, Soares FEF, Araujo JM, Tavela AO, Carvalho LM, Queiroz JH (2013). Interaction of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* on *Amblyomma cajannense* engorged females and enzymatic characterisation of its chitinase. *Biocontrol Science and Technology*, *23*(5), 584-594. https://doi.org/10.1080/09583157.2013.789481.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Braga FR, Ferraz CM, da Silva EN, de Araújo JV. (2020). Efficiency of the *Bioverm*® (*Duddingtonia flagrans*) fungal formulation to control *in vivo* and *in vitro* of *Haemonchus contortus* and *Strongyloides papillosus* in sheep. *3 Biotech*, *10*, 62. https://doi.org/10.1007/s13205-019-2042-8.

Bruňaská M, Dubinský P, Reiterová K. (1995). *Toxocara canis*: Ultrastructural aspects of larval moulting in the maturing eggs. *International Journal for Parasitology*, *25*(6), 683-690. https://doi.org/10.1016/0020-7519(94)00183-O

Brunori AB. (1985). *Introduzione allo studio dei funghi,* Il Libro Ed.

Bulbul K, Akand A, Hussain J, Parbin S, Hasin D. (2020). A brief understanding of *Trichuris ovis* in ruminants. *International Journal of Veterinary Science and Animal Husbandry*, *5*, 72-74.

Burke JM, Miller JE, Mosjidis JA, Terrill TH. (2012). Grazing sericea lespedeza for control of gastrointestinal nematodes in lambs. *Veterinary Parasitology*, *186*(3-4), 507-512. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.12.004.

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. *Experimental Parasitology*, *159*, 1-4. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.07.006.

Buzatti A, Santos C, Fernandes MAM, Yoshitani UY, Sprenger LK, Molento M. (2017). Control of free living gastrointestinal nematodes of horses using *Duddingtonia flagrans*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, *69*, 364-370. https://doi.org/10.1590/1678-4162-9028.

Callejón R, Halajian A, Cutillas C. (2017). Description of a new species, *Trichuris ursinus* n. sp. (Nematoda: Trichuridae) from *Papio ursinus* Keer, 1792 from South Africa. *Infection, Genetics and Evolution*, *51*, 182-193. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.04.002.

Camps S, Dubey J, Saville W. (2008). Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii* in zoo animals in selected zoos in the Midwestern United States. *The Journal of Parasitology*, *94*, 648-653. https://doi.org/10.1645/GE-1453.1.

Canhão-Dias M, Paz-Silva A, Madeira de Carvalho LM. (2020). The efficacy of predatory fungi on the control of gastrointestinal parasites in domestic and wild animals: A systematic review. *Veterinary Parasitology*, *283*, 109173. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109173.

Capasso M, Girolamo ND, Silvestre P, Laricchiuta P. (2019). Performance of two portable blood glucose meters for measuring blood glucose concentration in tigers (*Panthera tigris*) and lions (*Panthera leo*). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *254*(3), 399-408. https://doi.org/10.2460/javma.254.3.399.

Capasso M, Maurelli MP, Ianniello D, Alves LC, Amadesi A, Laricchiuta P, Silvestre P, Campolo M, Cringoli G, Rinaldi L. (2019). Use of Mini-FLOTAC and Fill-FLOTAC for rapidly diagnosing parasitic infections in zoo mammals. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 28(1), 168-171. https://doi.org/10.1590/S1984-296120180087.

Carmena D, Cardona GA. (2013). Canine echinococcosis: global epidemiology and genotypic diversity. *Acta Tropica*, *128*(3), 441-460. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.08.002.

Carr N, Cohen S. (2011). The public face of zoos: images of entertainment, education and conservation. *Anthrozoös*, *24*(2), 175-189. https://doi.org/10.2752/175303711X12998632257620.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Carvalho L, Serra PM, Fernando B, Agricola R, Jorge H, Farrim AP, Fazendeiro IM, Silva A. (2011). Controle integrado da estrongilidose equina com anti-helmínticos associados ao fungo *Duddingtonia flagrans*: Aspectos da sua utilização em Portugal. *Acta Parasitológica Portuguesa*, *18*, 63-90.

Carvalho RO, Araújo JV, Braga FR, Araujo JM, Silva AR, Tavela AO. (2009). Predatory activity of nematophagous fungi on infective larvae of *Ancylostoma* sp.: evaluation *in vitro* and after passing through the gastrointestinal tract of dogs. *Journal of Helminthology*, *83*(3), 231-236. https://doi.org/10.1017/S0022149X08158965.

Carvalho RO, Araújo JV, Braga FR, Ferreira SR, Araujo JM, Silva AR, Frassy LN, Alves CD. (2009). Biological control of Ancylostomosis in dogs using the nematode-trapping fungus *Monacrosporium thaumasium* in southeastern Brazil. *Veterinary Parasitology*, *165*(1-2), 179-183. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.06.024.

Carvalho RO, Braga FR, Araújo JV. (2011). Viability and nematophagous activity of the freeze-dried fungus *Arthrobotrys robusta* against *Ancylostoma* spp. infective larvae in dogs. *Veterinary Parasitology*, *176*(2-3), 236-239. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.10.051.

Cazapal Monteiro CF. (2015). Posibilidades de control de helmintozoonosis en Galicia. *Tesis Doctoral, Universidade de Santiago de Compostela*.

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*. *Parasitology Research, 114*(7), 2443-2450. https://doi.org/10.1007/s00436-015-4440-0.

Chamove AS, Moodie EM. (2005). Brief threatening events beneficial for captive tamarins? *Zoo Biology*, *24*(3), 207-218. John Wiley and Sons. https://doi.org/10.1002/zoo.1430090403.

Chandrawathani P, Jamnah O, Waller PJ, Höglund 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*. *Veterinary Research*, *33*(6), 685-696. https://doi.org/10.1051/vetres:2002049.

Chandrawathani P, Panchadcharam C, Chang K, Raimy N, Waller P, Adnan M, Zaini C, Jamnah O, Saad K, Vincent N. (2006). Daily feeding of fresh Neem leaves (*Azadirachta indica*) for worm control in sheep. *Tropical Biomedicine*, *23*, 23-30.

Charlier J, De Waele V, Ducheyne E, van der Voort M, Vande Velde F, Claerebout E. (2016). Decision making on helminths in cattle: Diagnostics, economics, and human behavior. *Irish Veterinary Journal*, *69*, 14. https://doi.org/10.1186/s13620-016-0073-6.

Chaverri P, Rocha FB, Jaklitsch W, Gazis R, Degenkolb T, Samuels GJ. (2015). Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. *Mycologia*, *107*(3), 558-590. https://doi.org/10.3852/14-147.

Ciarmela ML, Minvielle MC, Lori G, Basualdo JA. (2002). Biological interaction between soil fungi and *Toxocara canis* eggs. *Veterinary Parasitology*, *103*(3), 251-257. https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00598-2.

Citino SB. (2003). Bovidae (except sheep and goat) and antilocapridae. In EM Fowler, ER Miller (Eds.), *Zoo & Wild Animal Medicine* (5th ed., Chapter: *63*, p.649). Saunders, W.B., Philadelphia, PA.

Clemente L, Fernandes TL, Barahona MJ, Bernardino R, Botelho A. (2008). Confirmation by PCR of *Coxiella burnetii* infection in animals at a zoo in Lisbon, Portugal. *Veterinary Record*, *163*(7), 221-222. https://doi.org/10.1136/vr.163.7.221.

Clutton-Brock J, Serpell J. (1995). *The domestic dog: its evolution, behavior and interactions with people*. Cambridge University Press.

Comparative study of endo-parasites in captive Hog Deer (*Axis porcinus*). (2015). *International Journal of Biosciences (IJB)*, *6*(1), 162-170.

Conway WG. (2011). Buying time for wild animals with zoos. *Zoo Biology*, *30*(1), 1-8. https://doi.org/10.1002/zoo.20352.

Cooke RC. (1969). Two nematode-trapping hyphomycetes, *Duddingtonia flagrans* gen. et comb. nov. and *Monacrosporium mutabilis* sp. nov. *Transactions of the British Mycological Society*, *53*(3), 305-319. https://doi.org/10.1016/S0007-1536(69)80070-7.

Coppinger R. (2001). *Dogs: A Startling New Understanding of Canine Origin, Behavior and Evolution*. Scribner.

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 Science and Technology*, *25*(12), 1443-1452. https://doi.org/10.1080/09583157.2015.1062843.

Costa C, Costa HS, Gonçalves Albuquerque T, Ramos F, Castilho MC, Sanches-Silva A. (2015). Advances in phenolic compounds analysis of aromatic plants and their potential applications. *Trends in Food Science & Technology*, *45*(2), 336-354. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.06.009.

Côtes E. (2014). *Clinic and veterinary advisor: Dogs and cats* (3rd ed.). Elsevier.

Croke V. (1997). *The Modern Ark: The Story of Zoos: Past, Present, and Future.* Bard, New York, 1998, ©1997.

Cruz R. (2015). *Atividade de fungos sobre ovos, larvas e oocistos de parasitas de ungulados silvestres e do cão.* Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa.

Cunningham AA. (1996). Disease risks of wildlife translocations. *Conservation Biology*, *10*(2), 349-353. https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.1996.10020349.x.

Cutillas C, Callejón R, De Rojas M, Tewes B, Úbeda JM, Ariza C, et al. (2009). *Trichuris suis* and *Trichuris trichiura* are different nematode species. *Acta Tropica*, *111*, 299-307. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.05.011.

Cutillas C, Callejón R, Rojas M, Tewes B, Ubeda JM. (2009). Molecular identification of *Trichuris suis* and *Trichuris trichiura* isolated from different hosts. *Parasitology Research*, *105*(3), 715-720. https://doi.org/10.1007/s00436-009-1443-8.

Cutillas C, de Rojas M, Zurita A, et al. Trichuris colobae n. sp. (Nematoda: Trichuridae), a new species of *Trichuris* from *Colobus guereza kikuyensis*. *Parasitology Research,* 2014, *113*, 2725-2732. https://doi.org/10.1007/s00436-014-3933-6.

Cutler SJ, Bouzid M, Cutler RR. (2007). Q fever. *Journal of Infection*, *54*(4), 313-318. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2006.10.048.

Cutt H, Giles-Corti B, Knuiman M, Burke V. Dog ownership, health and physical activity: A critical review of the literature. *Health & Place,* 2007, *13*(1), 261-272. https://doi.org/10.1016/j.healthplace.2006.01.003.

D'Addabbo T, Carbonara T, Leonetti P. (2011). Control of plant parasitic nematodes with active saponins and biomass from *Medicago sativa. Phytochemistry Reviews*, *10*, 503-519. https://doi.org/10.1007/s11101-010-9180-2.

D'Ambroso Fernandes F, Rojas Guerra R, Segabinazzi Ries A, Felipetto Cargnelutti J, Sangioni LA, Vogel SF, Fausto GC. (2022). Gastrointestinal helminths in dogs: Occurrence, risk factors, and multiple antiparasitic drug resistance. *Parasitology Research*, *121*(7), 2579-2586. https://doi.org/10.1007/s00436-022-07599-0.

Dado D, Izquierdo F, Vera O, Montoya A, Mateo M, Fenoy S, Galván AL, García S, García A, Aránguez E, López L, del Águila C, Miró G. (2012). Detection of zoonotic intestinal parasites in public parks of Spain. Potential epidemiological role of microsporidia. *Zoonoses Public Health, 59*(1), 23-28. https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2011.01411.x.

Dărăbuş G, Afrenie M, Hotea I, Imre M, Morariu S. (2014). Endoparasites in mammals from seven zoological gardens in Romania. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine, 45*(2), 239-246. https://doi.org/10.1638/2012-0170.1.

Darwin C, Murray J. (1868). *The Variation of Animals and Plants under Domestication*. London: John Murray.

Dashe D, Berhanu A. (2020). Study on gastrointestinal parasitism of wild animals in captivity at the Zoological Garden of Haramaya University, Ethiopia. *Open Journal of Veterinary Medicine*, *10*, 173-184. https://doi.org/10.4236/ojvm.2020.109015.

Dashe YG, Berhanu AT. (2020). Prevalence of gastrointestinal helminths in captive wild animals in Ethiopian zoos. *Journal of Parasitology Research*, *109*(5), 305-312. https://doi.org/10.1155/2020/1090605.

Davis MR, Kinsel M, Wasson K, Boonstra J, Warneke M, Langan JN. (2008). Fatal disseminated encephalitozoonosis in a captive, adult Goeldi's monkey (*Callimico goeldii*) and subsequent serosurvey of the exposed conspecifics. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, *39*(2), 221-227. http://www.jstor.org/stable/20460459.

De Oliveira L, Dias F, Melo A, de Carvalho LM, Silva EN, Araújo JV. (2021). Bioverm® in the control of nematodes in beef cattle raised in the Central-West region of Brazil. *Pathogens*, *10*(5), 548. https://doi.org/10.3390/pathogens10050548.

De Silva NR, Brooker S, Hotez PJ, Montresor A, Engels D, Savioli L. (2003). Soil-transmitted helminth infections: updating the global picture. *Trends in Parasitology*, *19*(12), 547-551. https://doi.org/10.1016/j.pt.2003.10.002.

Deplazes P, Eckert J, Mathis A, von Samson-Himmelstjerna G, Zahner H. (2016). *Parasitology in Veterinary Medicine* (pp. 650). https://doi.org/10.3920/978-90-8686-274-0.

Deplazes P, Eckert J. (2001). Veterinary aspects of alveolar echinococcosis—a zoonosis of public health significance. *Veterinary Parasitology*, *98*(1-3), 65-87. https://doi.org/10.1016/s0304-4017(01)00424-1.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Deplazes P, van Knapen F, Schweiger A, Overgaauw PA. (2011). Role of pet dogs and cats in the transmission of helminthic zoonoses in Europe, with a focus on echinococcosis and toxocarosis. *Veterinary Parasitology*, *182*(1), 41-53. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.07.014.

Dias AS, Araújo JV, Braga FR, Araujo JM, Puppin AC, Fernandes FM, Ramos RF, Bertonceli RM, da Silva RG, Perboni WR. (2012). Biological control of *Fasciola hepatica* eggs with the *Pochonia chlamydosporia* fungus after passing through the cattle gastrointestinal tract. *Parasitology Research*, *110*(2), 663-667. https://doi.org/10.1007/s00436-011-2538-6.

Dias AS, Araújo JV, Braga FR. (2013). *Pochonia chlamydosporia* in the biological control of *Fasciola hepatica* in cattle in Southeastern Brazil. *Parasitology Research*, *112*, 2131-2136. https://doi.org/10.1007/s00436-013-3372-9.

Doligalska M, Jóźwicka K, Kiersnowska M, Mroczek A, Pączkowski C, Janiszowska W. (2011). Triterpenoid saponins affect the function of P-glycoprotein and reduce the survival of the free-living stages of *Heligmosomoides bakeri*. *Veterinary Parasitology*, *179*(1-3), 144-151. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.01.053.

Donahoe SL, Lindsay SA, Krockenberger M, Phalen D, Šlapeta J. (2015). A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife. *International Journal of Parasitology: Parasites and Wildlife*, *4*(2), 216-238. https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2015.04.002.

Dorko E, Rimárová K, Pilipčinc E, Trávníček M. (2009). Prevalence of *Coxiella burnetii* antibodies in wild ruminants in Kavečany Zoo, Košice, Eastern Slovakia. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, *16*(2), 321-324.

Dubey JP, Lago EG, Gennari SM, Su C, Jones JL. (2012). Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. *Parasitology.Sep*;*139*(11):1375-424. https://doi.org/10.1017/S0031182012000765.

Eid MM, El-Kowrany SI, Othman AA, El Gendy DI, Saied EM. (2015). Immunopathological changes in the brain of immunosuppressed mice experimentally infected with *Toxocara canis*. *The Korean Journal of Parasitology*, *53*(1), 51-58. https://doi.org/10.3347/kjp.2015.53.1.51.

Elsheikha HM. (2011). Major cestode infections. In HM Elsheikha, NA Khan (Eds.), *Essentials of veterinary parasitology* (pp. 71-79).

El-Shenawy SM, Marzouk MS, Dib RA, Elyazed HE, Shaffie NM, Fatma A. (2008). Polyphenols and biological activities of *Feijoa sellowiana* leaves and twigs.

EMA (European Medicines Agency). (2013a). Use of colistin products in animals within the European Union: development of resistance and possible impact on human and animal health (EMA/755938/2012). Available online: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2013/07/WC500146813.pdf.

EMA (European Medicines Agency). (2013b). Use of glycylcyclines in animals in the European Union: development of resistance and possible impact on human and animal health (EMA/291760/2013). Available online: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2013/07/WC500146814.pdf.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ESCAPP. (2019). Guidelines for the prevention of parasitic zoonoses in companion animals. *European Scientific Counsel Companion Animal Parasites*.

ESCCAP (2018). Guidelines for the prevention of parasitic zoonoses in companion animals. *European Scientific Counsel Companion Animal Parasites*. Retrieved from https://www.escapp.org.

ESCCAP. (2017). Guía de control de parásitos en perros y gatos. *Consejo Científico Europeo de Parásitos de Animales de Compañía*. Disponible en: ESCCAP.

Espinoza Y, Huapaya P, Roldán W, Jiménez S, Arce Z, López E. (2008). Clinical and serological evidence of *Toxocara* infection in school children from Morrope District, Lambayeque, Peru. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, *50*(2), 101-105.

Eysker M, Bakker N, Kooyman FN, Ploeger HW. (2005). The possibilities and limitations of evasive grazing as a control measure for parasitic gastroenteritis in small ruminants in temperate climates. *Veterinary Parasitology*, *129*, 95-104. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.12.022.

Fa J, Funk S, O'Connell D. (2011). *Zoo Conservation Biology*. https://doi.org/10.1017/CBO9780511993435.

Fagiolini M, Lia RP, Laricchiuta P, Cavicchio P, Mannella R, Cafarchia C, Otranto D, Finotello R, Perrucci S. (2010). Gastrointestinal parasites in mammals of two Italian zoological gardens. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine, 41*(4), 662-670. https://doi.org/10.1638/2010-0049.1.

Fagiolini M, Lia RP, Laricchiuta P, Cavicchio P, Mannella R , Cafarchia C, Otranto D, Finotello R, Perrucci S. (2010). Gastrointestinal parasites in mammals of two Italian zoological gardens. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine, 41*(4), 662-670. https://doi.org/10.1638/2010-0049.1.

Fan CK, Liao CW, Cheng YC. (2013). Factors affecting disease manifestation of toxocarosis in humans: Genetics and environment. *Veterinary Parasitology*, *193*(4), 342-352. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.030.

Fan C, Holland CV, Loxton K, Barghouth U. (2015). Cerebral Toxocariasis: Silent Progression to Neurodegenerative Disorders? *Clinical Microbiology Reviews, 28*, 663-686. https://doi.org/10.1128/CMR.00106-14.

Fausto GC, Fausto MC, Vieira ÍS, Freitas SG, Carvalho LM, Oliveira IC, Silva EN, Campos AK, Araújo JV. (2021). Formulation of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in the control of equine gastrointestinal parasitic nematodes. *Veterinary Parasitology*, *295*, 109458. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2021.109458.

Fernandes DM, Mello RA, Gomes MJ. (2017). Efficacy of a fungal mixture for reducing gastrointestinal nematode eggs in ruminants. *Veterinary Parasitology*, *239*, 10-17. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.04.013.

Ferreira SR, Araújo JV, Braga FR, Araujo JM, Carvalho RO, Silva AR, Frassy LN, Freitas LG. (2011). Ovicidal activity of seven *Pochonia chlamydosporia* fungal isolates on *Ascaris suum* eggs. *Tropical Animal Health and Production*, *43*(3), 639-642. https://doi.org/10.1007/s11250-010-9744-6.

Fidgett AL, Clauss M, Ganslοßer U, Hatt JM, Nijboer J. (2003). *Zoo Animal Nutrition, Volume II*. Filander Verlag, Furth.

Fillaux J, Magnaval JF. (2013). Laboratory diagnosis of human toxocariasis. *Veterinary Parasitology*, *193*(4), 327-336. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.028.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Fisher M. (2003). *Toxocara cati*: an underestimated zoonotic agent. *Trends in Parasitology*, *19(4)*:167-70. http://doi:10.1016/s1471-4922(03)00027-8.

Fitzgerald R, Ashley RF. (1977). Differential survival of *Ascaris* ova in wastewater sludge. *Journal of the Water Pollution Control Federation*, *49*, 1722-1724.

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.*

Fogle B. (2000). *The new encyclopedia of the dog*. DK Publishing.

Foor WE. (1967). *Ultrastructural aspects of oocyte development and shell formation in Ascaris lumbricoides. The Journal of Parasitology, 53*(6), 1245-1261. https://doi.org/10.2307/3276689.

Forman R, Partridge FA, Sattelle DB, Else KJ. (2021). Un-'Egg'-Plored: Characterisation of embryonation in the whipworm model organism *Trichuris muris*. *Frontiers in Tropical Diseases*, *2*, 790311. https://doi.org/10.3389/fitd.2021.790311.

Freiría Barreiro D. (2020). *Procedimientos de escalado de la producción de esporas del hongo parasiticida Duddingtonia flagrans*.

Gagne T. (2017). *The dog encyclopedia for kids*. Capstone Young Readers.

Gałecki R, Sokół R, Koziatek S. (2015). Parasites of wild animals as a potential source of hazard to humans. *Annals of Parasitology*, *61*(2), 105-108.

Gamboa MI. (2005). *Effects of temperature and humidity on the development of eggs of Toxocara canis under laboratory conditions. Journal of Helminthology, 79*(4), 327-331. https://doi.org/10.1079/joh2005287.

Gams W, Zare R. (2001). A revision of *Verticillium* sect. *Prostrata*. III. Generic classification. *Nova Hedwigia*, *72*(3-4), 329-337.

Garijo MM, Ortiz JM, Ruiz de Ibáñez MR. (2004). *Helminths in a giraffe (Giraffa camelopardalis xgiraffa) from a zoo in Spain. The Onderstepoort Journal of Veterinary Research, 71*(2), 153-156.

Garretson PD, Hammond EE, Craig TM, Holman PJ. (2009). *Anthelmintic resistant Haemonchus contortus in a giraffe (Giraffa camelopardalis) in Florida. Journal of Zoo and Wildlife Medicine, 40*(1), 131-139. https://doi.org/10.1638/2007-0094.1.

Gavin PJ, Kazacos KR, Shulman ST. (2005). *Baylisascariasis*. *Clinical Microbiology Reviews*, *18*(4), 703-718. https://doi.org/10.1128/CMR.18.4.703-718.2005.

Gawor J, Borecka A. (2017). *Quantifying the risk of zoonotic geohelminth infections for rural household inhabitants in Central Poland. Annals of Agricultural and Environmental Medicine, 24*(1), 44-48. https://doi.org/10.5604/12321966.1230679.

Georgi JR, Georgi ME. (1990). *Parasitology for Veterinarians*. (6th ed.). W.B. Saunders. This reference provides details on *Trichuris discolor*, focusing on its effects primarily in cattle.

Germonpré M, Sablin MV, Stevens RE, Hedges REM, Hofreiter M, Stiller M, Després VR. (2009). *Fossil dogs and wolves from Palaeolithic sites in Belgium, the Ukraine and Russia: osteometry, ancient DNA and stable isotopes. Journal of Archaeological Science, 36*(2), 473-490. https://doi.org/10.1016/j.jas.2008.09.033.

Ghai R, Simons N, Chapman C, Omeja P, Davies T, Ting N, Goldberg T. (2014). *Hidden population structure and cross-species transmission of whipworms (Trichuris* sp.*) in humans and non-*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

human primates in Uganda. PLoS Neglected Tropical Diseases, 8, e3256. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003256.

Gibbons LM. (2010). *Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates: Supplementary Volume (Vol. 10).* Wallingford: CAB International.

Gilbert T, Soorae P. (2017). *Editorial: The role of zoos and aquariums in reintroductions and other conservation translocations. International Zoo Yearbook, 51*. https://doi.org/10.1111/izy.12164.

Githiori JB, Höglund J, Waller PJ. (2005). *Ethnoveterinary plant preparations as livestock dewormers: Practices, popular beliefs, pitfalls and prospects for the future. Animal Health Research Reviews, 6*, 91-103. https://doi.org/10.1079/AHR2005099.

Glickman LT, Magnaval JF. (1993). *Zoonotic roundworm infections. Infectious Disease Clinics of North America, 7*(3), 717-732.

Gómez Rincón C. (2006). Microbiología del suelo: una herramienta para el control biológico de plagas y enfermedades. *Revista de Ciencias Ambientales*, *40*(1), 67-72.

Gómez-Rincón C, Uriarte J, Valderrábano J. (2006). *Efficiency of Duddingtonia flagrans against Trichostrongyle infections of sheep on mountain pastures. Veterinary Parasitology, 141*(1-2), 84-90. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.05.007.

Gonzálvez M, Moreno E, Pérez-Cutillas P, Gilbert T, Ortiz J, Valera F, et al. (2021). *Zoological institutions as hotspots of gastrointestinal parasites that may affect the success of ungulate reintroduction programmes. Veterinary Record,* e506. https://doi.org/10.1002/vetr.506.

Goodman D, Haji HJ, Bickle QD, Stoltzfus RJ, Tielsch JM, Ramsan M, Savioli L, Albonico M. (2007). A comparison of methods for detecting the eggs of *Ascaris*, *Trichuris*, and hookworm in infant stool, and the epidemiology of infection in Zanzibari infants. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *76*(4), 725-731.

Goossens E, Dorny P, Boomker J, Vercammen F, Vercruysse J. (2005). A 12-month survey of the gastrointestinal helminths of antelopes, gazelles, and giraffids kept at two zoos in Belgium. *Veterinary Parasitology*, *127*(4), 303-312. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.10.013.

Gortari M, Galarza B, Cazau MC, Hours R. (2008). *Comparison of the biological properties of two strains of Paecilomyces lilacinus (Thom) Samson associated with their antagonistic effect on Toxocara canis eggs. Malaysian Journal of Microbiology, 4*, 35-41. https://doi.org/10.21161/mjm.12508.

Gracenea M, Gómez MS, Torres J, Carné E, Fernández-Morán J. (2002). *Transmission dynamics of Cryptosporidium in primates and herbivores at the Barcelona zoo: A long-term study. Veterinary Parasitology, 104*(1), 19-26. https://doi.org/10.1016/s0304-4017(01)00611-2.

Grønvold J, Henriksen SAa, Larsen M, Nansen P, Wolstrup J. (1996). *Biological control aspects of biological control—with special reference to arthropods, protozoans, and helminths of domesticated animals. Veterinary Parasitology, 64*(1-2), 47-64. https://doi.org/10.1016/0304-4017(96)00967-3.

Guilherme EV, Marchioro AA, Araujo SM, Falavigna DL, Adami C, Falavigna-Guilherme G, Rubinsky-Elefant G, Falavigna-Guilherme AL. (2013). *Toxocariasis in children attending a Public Health Service Pneumology Unit in Paraná State, Brazil. Revista do Instituto de*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Medicina Tropical de São Paulo, 55(3), S0036-46652013000300189. https://doi.org/10.1590/S0036-46652013000300009.

Gul N, Tak H. (2016). *Prevalence of Trichuris spp. in small ruminants slaughtered in Srinagar District (J&K). Journal of Parasitic Diseases, 40*, 741-744. https://doi.org/10.1007/s12639-014-0570-z.

Guscetti F, Mathis A, Hatt JM, Deplazes P. (2003). *Overt fatal and chronic subclinical Encephalitozoon cuniculi microsporidiosis in a colony of captive emperor tamarins (Saguinus imperator). Journal of Medical Primatology, 32*(2), 111-119. https://doi.org/10.1034/j.1600-0684.2003.00016.x.

Habeeb SM, Ashry HM, Saad MM. (2017). *Ovicidal effect of chitinase and protease enzymes produced by soil fungi on the camel tick Hyalomma dromedarii eggs (Acari: Ixodidae). Journal of Parasitic Diseases: Official Organ of the Indian Society for Parasitology, 41*(1), 268-273. https://doi.org/10.1007/s12639-016-0791-4.

Hawash MB, Betson M, Al-Jubury A. (2015). Mitochondrial genome analyses suggest multiple *Trichuris* species in humans, baboons, and pigs from different geographical regions. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *9*(9), e0004059. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004059.

Healey K, Lawlor C, Knox MR, Chambers M, Lamb J. (2018). Field evaluation of *Duddingtonia flagrans* IAH 1297 for the reduction of worm burden in grazing animals: Tracer studies in sheep. *Veterinary Parasitology*, *253*, 48-54. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.02.010.

Hebden JM. (1961). Studies on the therapeutic action of anthelmintics. *Journal of the Royal Society of Medicine*, *54*(1), 27-32.

Henke A, Dickhoefer U, Westreicher-Kristen E, Knappstein K, Molkentin J, Hasler M, Susenbeth A. (2017). *Effect of dietary Quebracho tannin extract on feed intake, digestibility, excretion of urinary purine derivatives and milk production in dairy cows. Archives of Animal Nutrition, 71*, 37-53. https://doi.org/10.3168/jds.2016-12149.

Hernández JA, Arroyo FL, Suárez J, Cazapal-Monteiro CF, Romasanta Á, López-Arellano ME, Pedreira J, de Carvalho LMM, Sánchez-Andrade R, Arias MS, Mendoza de Gives P, Paz-Silva A. (2016). *Feeding horses with industrially manufactured pellets with fungal spores to promote nematode integrated control. Veterinary Parasitology, 229*, 37-44. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.09.014.

Hernández JA, Cazapal-Monteiro CF, Arroyo FL, Silva MI, Palomero AM, Paz-Silva A, Sánchez-Andrade R, Arias MS. (2018a). *Biological control of soil-transmitted helminths (STHs) in a zoological park by using saprophytic fungi. Biological Control, 122*, 24-30. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.04.005.

Hernández JA, Cazapal-Monteiro CF, Sanchís J, Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A, Arias MS. (2018b). *Potential usefulness of filamentous fungi to prevent zoonotic soil-transmitted helminths (STHs). Vector-Borne and Zoonotic Diseases, 18*, 690-696. https://doi.org/10.1089/vbz.2018.2296.

Hernández JA, Sánchez-Andrade R, Cazapal-Monteiro CF, Arroyo FL, Sanchís JM, Paz-Silva A, Arias MS. (2018c). *A combined effort to avoid strongyle infection in horses in an oceanic climate region: rotational grazing and parasiticidal fungi. Parasites & Vectors, 11*, 240. https://doi.org/10.1186/s13071-018-2827-3.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Hernández JA, Vázquez-Ruiz RA, Cazapal-Monteiro CF, Valderrábano E, Arroyo FL, Francisco I, Miguélez S, Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A, Arias MS. (2017). *Isolation of ovicidal fungi from fecal samples of captive animals maintained in a zoological park. Journal of Fungi, 3*, 29. https://doi.org/10.3390/jof3020029.

Hernández-Rodríguez CS, van Vliet AL, Bautsoens N, Van Rie J, Ferré J. (2008). *Specific binding of Bacillus thuringiensis Cry2A insecticidal proteins to a common site in the midgut of Helicoverpa species. Applied and Environmental Microbiology, 74*, 7654-7659. https://doi.org/10.1128/AEM.01373-08.

Hoage RJ, Deiss WA (Eds.). (1996). *New Worlds, New Animals: From Menagerie to Zoological Park in the Nineteenth Century.* Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD.

Hoog GS de, Oorschot CA N van. (1985). Taxonomy of the *Dactylaria* complex, VI. Key to the genera and check-list of epithets. *Studies in Mycology*, *26*, 97-122. https://www.studiesinmycology.org/sim/Sim26/full%20text.htm.

Hoopes J, Hill JE, Polley L, Fernando C, Wagner B, Schurer J, Jenkins E. (2015). Enteric parasites of free-roaming, owned, and rural cats in prairie regions of Canada. *Canadian Veterinary Journal*, *56*(5), 495-501.

Hoopes M, Furlong J. (2015). The prevalence of intestinal parasites in stray dogs and cats in selected areas of Canada. *Canadian Veterinary Journal*, *56*(8), 861-865.

Horton J. (2014). Helminth-Nematode: *Trichuris trichiura*. In *Encyclopedia of Food Safety*; Motarjemi Y, (Eds.), Academic Press: Cambridge, MA, USA, (pp.111-115). https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378612-8.00146-3.

Hoste H, Meza-Ocampos G, Marchand S, Sotiraki S, Sarasti K, Blomstrand BM, Williams AR, Thamsborg SM, Athanasiadou S, Enemark HL. (2022). Use of agro-industrial by-products containing tannins for the integrated control of gastrointestinal nematodes in ruminants. *Parasite*, *29*, 10. https://doi.org/10.1051/parasite/2022010.

Hoy JM, Murray PJ, Tribe A. (2010). *Thirty years later: enrichment practices for captive mammals. Zoo Biology, 29(*3), 303-316. https://doi.org/10.1002/zoo.20254.

Hu W, Yu X, Wu S, Tan L, Song M, Abdullahi A, Wang Z, Jiang B, Li G. (2015). *Levels of Ancylostoma infections and phylogenetic analysis of cox1 gene of A. ceylanicum in stray cat fecal samples from Guangzhou, China. Journal of Helminthology,* -1, 1-6. https://doi.org/10.1017/S0022149X15000413.

ICAM. (2007). International Coalition for Animal Welfare Guidelines: Guidelines for the operation of animal shelters. *International Coalition for Animal Welfare*. https://www.icam-coalition.org/guidelines.

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*(4), 474-485. https://doi.org/10.1163/187529286X00345.

Islam MK (1989) Studies on some epidemiological and pathological aspects of Trichuris spp. infection in Black Bengal goats in Mymensingh, Bangladesh, Thesis. M. Sc. (Vet. Science) in Parasitology, Bangladesh Agricultural University, Mymensingh.

Jackson F, Coop RL. (2000). The development of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Parasitology*, *120*(S1), S95-S107. https://doi.org/10.1017/S0031182099005740.

Jin Z, Akao N, Ohta N. (2008). *Prolactin evokes lactational transmission of larvae in mice infected with Toxocara canis. Parasitology International, 57*(4), 495-498. https://doi.org/10.1016/j.parint.2008.06.006.

Jouzani GS, Abad AP, Seifinejad A, Marzban R, Kariman K, Maleki B. (2008). *Distribution and diversity of Dipteran-specific cry and cyt genes in native Bacillus thuringiensis strains obtained from different ecosystems of Iran. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 35*(2), 83-94. https://doi.org/10.1007/s10295-007-0269-6.

Juan-Sallés C, Garner MM, Didier ES, Serrato S, Acevedo LD, Ramos-Vara JA, Nordhausen RW, Bowers LC, Parás AD. (2006). Disseminated encephalitozoonosis in captive, juvenile cotton-top (*Saguinus oedipus*) and neonatal emperor (*Saguinus imperator*) tamarins in North America. *Veterinary Pathology*, *43*(4), 438-446. https://doi.org/10.1354/vp.43-4-438.

Keiser J, Utzinger J. (2008). Efficacy of current drugs against soil-transmitted helminth infections: Systematic review and meta-analysis. *JAMA*, *299*(16), 1937-1948. https://doi.org/10.1001/jama.299.16.1937.

Keulartz J. (2015). *Captivity for conservation? Zoos at a crossroads. Journal of Agricultural and Environmental Ethics, 28*, 335-351. https://doi.org/10.1007/s10806-015-9537-z.

Khalil HM, Khaled ML, Farag Ali O, Hifny N, Bebars MA. (1978). *Examination of soil for Toxocara canis eggs in different governorates of Egypt. The Journal of the Egyptian Public Health Association, 53*(5-6), 295-302.

Kisling VN, editor. (2000). *Zoo and aquarium history: Ancient animal collections to zoological gardens* (1st ed.). *CRC Press.* https://doi.org/10.1201/9781420039245.

Kitz S, Grimm F, Wenger S, Hatt J, Kipar A, Hetzel U. (2018). *Encephalitozoon cuniculi infection in Barbary striped grass mice (Lemniscomys barbarus). Schweizer Archiv für Tierheilkunde, 160*(6), 394-400. https://doi.org/10.17236/sat00166.

Kleine A, Springer A, Strube C. (2017). *Seasonal variation in the prevalence of Toxocara eggs on children's playgrounds in the city of Hanover, Germany. Parasites & Vectors, 10*(1), 248. https://doi.org/10.1186/s13071-017-2193-6.

Knight RA. (1984). *Morphological differences in Trichuris ovis associated with different host species. The Journal of Parasitology, 70*(5), 842-843.

Knopp S, Mohammed KA, Speich B, Hattendorf J, Khamis IS, Khamis AN, Stothard JR, Rollinson D, Marti H, Utzinger J. (2010). *Albendazole and mebendazole administered alone or in combination with ivermectin against Trichuris trichiura: a randomized controlled trial. Clinical Infectious Diseases, 51*(12), 1420-1428. https://doi.org/10.1086/657310.

Knox MR, Josh PF, Anderson LJ. (2002). *Deployment of Duddingtonia flagrans in an improved pasture system: dispersal, persistence, and effects on free-living soil nematodes and microarthropods. Biological Control, 24*(2), 176-182. https://doi.org/10.1016/S1049-9644(02)00012-9.

Kołodziej-Sobocińska M, Demiaszkiewicz AW, Lachowicz J, Borowik T, Kowalczyk R. (2016). Influence of management and biological factors on parasitic invasions in the wild - Spread of the blood-sucking nematode *Ashworthius sidemi* in European bison (*Bison bonasus*). *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, *5*(3), 286-294. https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2016.09.005.

Kopp SR, Kotze AC, McCarthy JS, Coleman GT. (2007). High-level pyrantel resistance in the hookworm *Ancylostoma caninum*. *Veterinary Parasitology*, *143*(3-4), 299-304. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.08.036.

Kramer 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. *Revista Iberoamericana de Micología*, *31*(2), 114-118. https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.05.003.

Krasińska M, Krasiński ZA. (2007). *European Bison: The Nature Monograph*. Mammal Research Institute, Polish Academy of Sciences.

Kuchai JA, Chishti MZ, Jaki MM, Ahmad J, Rasool M, Dar SA, Tak H. (2011). Prevalence of nematode parasites in sheep of *Ladakh-India*. *Journal of Agricultural Extension and Rural Development*, *3*, 229-231. https://doi.org/10.5897/JAERD11.099.

Kuchta R, Choudhury A, Scholz T. (2018). Asian fish tapeworm: the most successful invasive parasite in freshwater. *Trends in Parasitology*, *34*(6), 511-523. https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.03.001.

Kyei G, Ayi I, Boampong JN, Turkson PK. (2015). Sero-epidemiology of *Toxocara canis* infection in children attending four selected health facilities in the Central Region of Ghana. *Ghana Medical Journal*, *49*(2), 77-83. https://doi.org/10.4314/gmj.v49i2.3.

Lafferty KD. (2012). Biodiversity loss decreases parasite diversity: theory and patterns. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, *367*(1604), 2814-2827. https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0110.

Lahat L, Ortiz J.M., Tizzani P, Ibáñez B, Valera F, Moreno E, Espeso G, Ruiz de Ybañez R. (2021). Are anthelminthic treatments of captive ruminants necessary? *Veterinary Sciences*, *8*(10), 240. https://doi.org/10.3390/vetsci8100240.

Larsen M, Nansen P, Wolstrup J, Grønvold JR, Henriksen SA, Zorn A. (1995). Biological control of trichostrongyles in calves by the fungus *Duddingtonia flagrans* fed to animals under natural grazing conditions. *Veterinary Parasitology*, *60*(3-4), 321-330. https://doi.org/10.1016/0304-4017(95)00792-8.

Larsen M. (1999). Biological control of helminths. *International Journal for Parasitology*, *29*(1), 139-146; discussion 153-154. https://doi.org/10.1016/s0020-7519(98)00185-4.

Lee ACY, Schantz PM, Kazacos KR, Montgomery SP, Bowman DD. (2010). Epidemiologic and zoonotic aspects of ascarid infections in dogs and cats. *Trends in Parasitology*, *26*(4), 155-161. https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.01.002.

Lee K, Suh Ch. (1976). Transplacental migration of *Toxocara canis* larvae in experimentally infected mice. *Journal of Parasitology*, *62*(3), 460-465.

Li J, Zou C, Xu J, Ji X, Niu X, Yang J, Huang X, Zhang KQ. (2015). Molecular mechanisms of nematode-nematophagous microbe interactions: basis for biological control of plant-parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology*, *53*, 67-95. https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120336.

Little SE, Johnson EM, Lewis D, Jaklitsch RP, Payton ME, Blagburn BL. (2009). Prevalence of intestinal parasites in pet dogs in the United States. *Veterinary Parasitology*, *166*, 144-152. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.07.044.

Liu GH, Zhou W, Nisbet AJ, Xu MJ, Zhou DH, Zhao GH, Wang SK, Song HQ, Lin RQ, Zhu XQ. (2014). Characterization of *Trichuris trichiura* from humans and *T. suis* from pigs in China

using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. *Journal of Helminthology*, *88*(1), 64-68. https://doi.org/10.1017/S0022149X12000740.

Liu GH, Zhou W, Nisbet AJ, Xu MJ, Zhou DH, Zhao GH, Wang SK, Song HQ, Lin RQ, Zhu XQ. (2014). Characterization of *Trichuris trichiura* from humans and *T. suis* from pigs in China using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. *Journal of Helminthology*, *88*(1), 64-68. https:// doi.org/10.1017/S0022149X12000740.

Liu H. (2014). Enrichment and Training for Captive Animals. *Journal of Environmental Animals*, *10*, 133-144. https://doi.org/10.13326/j.jea.2014.0018.

Lloyd C, Stidworthy MF, Wernery U. (2010). *Coxiella burnetii* abortion in captive *Dama gazelle* (*Gazella dama*) in the United Arab Emirates. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, *41*(1), 83-89. https://doi.org/10.1638/2009-0005.1.

Lobato J, Silva DA, Mineo TW, Amaral JD, Segundo GR, Costa-Cruz JM, Ferreira MS, Borges AS, Mineo JR. (2006). Detection of immunoglobulin G antibodies to *Neospora caninum* in humans: high seropositivity rates in patients who are infected by human immunodeficiency virus or have neurological disorders. *Clinical Vaccine Immunology*, *13*(1), 84-89. https://doi.org/10.1128/CVI.13.1.84-89.2006.

López-Llorca LV, Maciá-Vicente JG, Jansson H-B. (2008). Mode of action and interactions of nematophagous fungi. In: Ciancio A, Mukerji KG, (Eds.). *Integrated Management and Biocontrol of Vegetable and Grain Crop Nematodes* (pp. 51-76). Dordrecht: Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6063-2_3.

Lozano J, Almeida C, Oliveira M, Paz-Silva A, Madeira de Carvalho L. (2022). Biocontrol of avian gastrointestinal parasites using predatory fungi: Current status, challenges, and opportunities. *Parasitologia, 2*(1), 37-44. https://doi.org/10.3390/parasitologia2010004.

Luangsa-ard JJ, Houbraken J, van Doorn T, Hong SB, Borman AM, Hywel-Jones NL, Samson RA. (2011). *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus*. *FEMS Microbiology Letters*, *321*(2), 141-149. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02322.x.

Lysek G, Jensen C. (1991). Direct observation of trapping activities of nematode-destroying fungi in the soil using fluorescence microscopy. *FEMS Microbiology Letters, 85*(3), 207-210. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1991.tb04727.x.

Lýsek H, Fassatiová O, Cuervo NP, Lorenzo NH. (1982). Ovicidal fungi in soils of Cuba. *Folia Parasitologica*, *29*(3), 265-270.

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*(8), 1074-1085. https://doi.org/10.1017/S0031182012000418.

Maciel AS, Freitas LG, Campos AK, Lopes EA, Araújo JV. (2010). The biological control of *Ancylostoma* spp. dog infective larvae by *Duddingtonia flagrans* in a soil microcosm. *Veterinary Parasitology, 173*(3-4), 262-270. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.06.017.

Macpherson CN. (2005). Human behaviour and the epidemiology of parasitic zoonoses. *International Journal for Parasitology, 35*(11-12), 1319-1331. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.06.004.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Macpherson CN. (2013). The epidemiology and public health importance of toxocariasis: a zoonosis of global importance. *International Journal for Parasitology, 43*(12-13), 999-1008. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.07.004.

Madeira de Carvalho L, Fernando B, Paz-Silva A. (2012). The role of fungi in the control of animal parasites: classification, mode of action and practical applications. *Fungi: Types, Environmental Impact and Role in Disease*, 271-308.

Maesano G, Capasso M, Ianniello D, Cringoli G, Rinaldi L. (2014). Parasitic infections detected by FLOTAC in zoo mammals from Warsaw, Poland. *Acta Parasitologica, 59*(2), 343-353. https://doi.org/10.2478/s11686-014-0249-8.

Magnaval JF, Michault A, Calon N, Charlet JP. (1994). Epidemiology of human toxocariasis in La Réunion. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 88*(5), 531-533. https://doi.org/10.1016/0035-9203(94)90148-1.

Manini MP, Marchioro AA, Colli CM, Nishi L, Falavigna-Guilherme AL. (2012). Association between contamination of public squares and seropositivity for *Toxocara* spp. in children. *Veterinary Parasitology, 188*(1-2), 48-52. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.03.011.

Marti HP, Tschopp H, Mühlemann M. (1978). Anthelmintic resistance of *Trichuris* species in ruminants. *Veterinary Parasitology*, *4*(3-4), 225-230.

Martínez M, García H, Figuera L, González V, Lamas F, López K, Mijares V, Corrales Y, Lares M, Ferrer E. (2015). Seroprevalence and risk factors of toxocariasis in preschool children in Aragua state, Venezuela. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 109*(9), 579-588. https://doi.org/10.1093/trstmh/trv059.

Martínez MI, Lumaret J-P, Ortiz Zayas R, Kadiri N. (2017). The effects of sublethal and lethal doses of ivermectin on the reproductive physiology and larval development of the dung beetle *Euoniticellus intermedius* (Coleoptera: Scarabaeidae). *The Canadian Entomologist, 149*(4), 461-472. https://doi.org/10.4039/tce.2017.11.

Martínez R, Torres P, Meneses MA, Figueroa JG, Pérez-Álvarez JA, Viuda-Martos M. (2012). Chemical, technological, and *in vitro* antioxidant properties of mango, guava, pineapple, and passion fruit dietary fiber concentrate. *Food Chemistry, 135*(3), 1520-1526. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.057.

Martínez-Carrasco C, Berriatua E, Garijo M, Martínez J, Alonso FD, Ruiz de Ybáñez R. (2007). Epidemiological study of non-systemic parasitism in dogs in southeast Mediterranean Spain assessed by coprological and post-mortem examination. *Zoonoses and Public Health, 54*(3), 195-203. https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2007.01047.x.

Mason G, Clubb R. (2003). Animal welfare: captivity effects on wide-ranging carnivores. *Nature*, *425*(6957), 473-474. https://doi.org/10.1038/425473a.

Mateus TL, Castro A, Ribeiro JN, Vieira-Pinto M. (2014). Multiple zoonotic parasites identified in dog feces collected in Ponte de Lima, Portugal—A potential threat to human health. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *11*(9), 9050-9067. https://doi.org/10.3390/ijerph110909050.

McAllister TA, Stanford K, Chaves AV, Evans PR, Figueiredo EES, Ribeiro G. (2020). Nutrition, feeding, and management of beef cattle in intensive and extensive production systems. In Bazer

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FW, Lamb GC, Wu G (Eds.), *Animal Agriculture* (pp. 75-98). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817052-6.00005-7.

McDowell MA, Rafati S. (Eds.). (2014). *Neglected Tropical Diseases - Middle East and North Africa*. Wien: Springer-Verlag Wien. p. 281.

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. *Veterinary Parasitology*, *130*(3-4), 233-240. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.03.040.

Mendoza-de Gives P, Braga FR, Araújo JV de. (2022). Nematophagous fungi, an extraordinary tool for controlling ruminant parasitic nematodes and other biotechnological applications. *Biocontrol Science and Technology*, *32*(7), 777-793. https://doi.org/10.1080/09583157.2022.2028725.

Mendoza-de Gives P, López-Arellano ME, Aguilar-Marcelino L, Olazarán-Jenkins S, Reyes-Guerrero D, Ramírez-Várgas G, Vega-Murillo VE. (2018). The nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* reduces the gastrointestinal parasitic nematode larvae population in faeces of orally treated calves maintained under tropical conditions—Dose/response assessment. *Veterinary Parasitology*, *263*, 66-72. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.10.001.

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. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1081*, 355-359. https://doi.org/10.1196/annals.1373.050.

Mesa-Vanegas AM, Marin A, Calle-Osorno J. (2019). Metabolitos secundarios en *Trichoderma* spp. y sus aplicaciones biotecnológicas agrícolas. *Actualidades Biológicas*, *41*(111), 32-44. https://doi.org/10.17533/udea.acbi.v41n111a02.

Meyer WJ, Wiebe MG. (2003). Enzyme production by the nematode-trapping fungus, *Duddingtonia flagrans*. *Biotechnology Letters*, *25*(10), 791-795. https://doi.org/10.1023/a:1023580621840.

Mir AQ, Dua K, Singla LD, Sharma S, Singh MP. (2016). Prevalence of parasitic infection in captive wild animals in Bir Moti Bagh mini zoo (Deer Park), Patiala, Punjab. *Veterinary World*, *9*(6), 540-543. https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.540-543.

Mircean V, Titilincu A, Vasile C. (2010). Prevalence of endoparasites in household cat (*Felis catus*) populations from Transylvania (Romania) and association with risk factors. *Veterinary Parasitology*, *171*(1-2), 163-166. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.03.005.

Miró G, Mateo M, Montoya A, Vela E, Calonge R. (2006). Survey of intestinal parasites in stray dogs in the Madrid area and comparison of the efficacy of three anthelmintics in naturally infected dogs. *Parasitology Research*, *100*(2), 317-320. https://doi.org/10.1007/s00436-006-0258-0.

Miró G, Rupérez C, Checa R, Gálvez R, Hernández L, García M, Canorea I, Marino V, Montoya A. (2014). Current status of *Leishmania infantum* infection in stray cats in the Madrid region (Spain): implications for the recent outbreak of human leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, *7*, 112. https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-112.

Mirzapour A, Kiani H, Mobedi I, Spotin A, Seyyed Tabaei SJ, Rahimi M. (2018). Frequency of intestinal parasites among zoo animals by morphometric criteria and first report of *Bivitellobilharzia nairi* from elephant (*Elephas maximus maximus*) in Iran. *Iranian Journal of Parasitology*, *13*(4), 611-617.

Mohamed AS, Moore GE, Glickman LT. (2009). Prevalence of intestinal nematode parasitism among pet dogs in the United States (2003-2006). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *234*, 631-637.

Monjila MK, Begum N, Mamun MA, Mondal M, Azam MS. (2014). Coprological study of gastrointestinal parasites of captive animals at Rangpur Recreational Garden and Zoo in Bangladesh. *Journal of Threatened Taxa*, *6*, 6142-6147. https://doi.org/10.11609/JoTT.o3093.6142-7.

Moreira GM, Telmo PL, Mendonça M, Moreira AN, McBride AJ, Scaini CJ, Conceição FR. (2014). Human toxocariasis: current advances in diagnostics, treatment, and interventions. *Trends in Parasitology*, *30*(9), 456-464. https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.07.003.

Morgan ER, Charlier J, Hendrickx G, Biggeri A, Catalan D, von Samson-Himmelstjerna G, Demeler J, Müller E, van Dijk J, Kenyon F, Skuce P, Höglund J, O'Kiely P, van Ranst B, de Waal T, Rinaldi L, Cringoli G, Hertzberg H, Torgerson PR, Wolstenholme A, Vercruysse J. (2013). Global change and helminth infections in grazing ruminants in Europe: Impacts, trends and sustainable solutions. *Agriculture*, *3*(3), 484-502. https://doi.org/10.3390/agriculture3030484.

Moskvina T, Ermolenko A. (2016). Helminth infections in domestic dogs from Russia. *Veterinary World*, *9*, 1248-1258. https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.1248-1258.

Moudgil A, Singla LD, Moudgil P. (2015). Parasitosis in wild felids of India: an overview. *Journal of Threatened Taxa*, *7*, 7641-7648. https://doi.org/10.11609/JoTT.o4236.7641-8.

Moudgil AD, Singla LD. (2018). Molecular confirmation and anthelmintic efficacy assessment against natural trichurid infections in zoo-housed non-human primates. *Journal of Medical Primatology*, *47*(6), 388-392. https://doi.org/10.1111/jmp.12358.

Mughini-Gras L, Harms M, van Pelt W, Pinelli E, Kortbeek T. (2016). Seroepidemiology of human *Toxocara* and *Ascaris* infections in the Netherlands. *Parasitology Research*, *115*(10), 3779-3794. https://doi.org/10.1007/s00436-016-5139-6.

Murphy FA. (1998). Emerging zoonoses. *Emerging Infectious Diseases*, *4*(3), 429-435. https://doi.org/10.3201/eid0403.980324.

Murphy FA. (2008). Emerging zoonoses: the challenge for public health and biodefense. *Preventive Veterinary Medicine*, *86*(3-4), 216-223. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2008.02.009.

Myers JH, Cory JS. (2016). Ecology and evolution of pathogens in natural populations of Lepidoptera. *Evolutionary Applications*, *9*, 231-247. https://doi.org/10.1111/eva.12328.

Nadler S, De Leon G. (2011). Integrating molecular and morphological approaches for characterizing parasite cryptic species: implications for parasitology. *Parasitology*, *138*,1688-1709. https://doi.org/10.1017/S003118201000168X.

Nath TC, Eom KS, Choe S, Hm S, Islam S, Ndosi BA, Kang Y, Bia MM, Kim S, Eamudomkarn C. (2021). Insight into One Health approach: Endoparasite infections in captive wildlife in Bangladesh. *Pathogens*, *10*(2), 250. https://doi.org/10.3390/pathogens10020250.

Neves D, Lobo L, Simões PB, Cardoso L. (2014). Frequency of intestinal parasites in pet dogs from an urban area (Greater Oporto, northern Portugal). *Veterinary Parasitology*, *200*, 295-298.

Newbury S, Blinn MK, Bushby PA, Barker Cox C, Dinnage JD, Griffin B, Hurley KF, Isaza N, Jones W, Miller L, O'Quin J, Patronek GJ, Smith-Blackmore M, Spindel M. (2010). *Guidelines for Standards of Care in Animal Shelters*, The Association of Shelter Veterinarians.

Nissen S, Al-Jubury A, Hansen TVA, Olsen A, Christensen H, Thamsborg SM, Nejsum P. (2012). Genetic analysis of *Trichuris suis* and *Trichuris trichiura* recovered from humans and pigs in a sympatric setting in Uganda. *Veterinary Parasitology*, *188*(1-2), 68-77. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.03.004.

Norton BG, Hutchins M, Stevens EF, Maple TL (Eds.). (1995). *Ethics on the Ark*. *Smithsonian Institution Press*: Washington, DC, USA; London, UK.

Nosal P, Kowal J, Kornaś S, Wyrobisz A, Skotnicki J, Basiaga M, Plucińska NE. (2016). Endoparasites of exotic ungulates from the Giraffidae and Camelidae families kept ex situ. *Annals of Parasitology*, *62*(1), 67-70. https://doi.org/10.17420/ap6201.34.

Ojeda-Robertos NF, Torres-Acosta JF, Ayala-Burgos A, Aguilar-Caballero AJ, Cob-Galera LA, Mendoza de Gives P. (2008). A technique for the quantification of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores in sheep faeces. *Veterinary Parasitology*, *152*(4), 339-343. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.12.023.

Okello MM, Wishitemi R, Muhoro F. (2002). Forage intake rates and foraging efficiency of free-ranging zebra and impala. *South African Journal of Wildlife Research*, *32*, 93-100.

Olech W, Klich D, Perzanowski K. (2019). Development of a new Action Plan for the European bison. *Oryx*. *53*(2),214. https://doi:10.1017/S0030605318001369.

Olech W, Perzanowski K. (2002). A genetic background for reintroduction program of the European bison (*Bison bonasus*) in the Carpathians. *Biological Conservation*, *108*, 221-228.

Oliveira I de C, Vieira ÍS, Campos AK, Araújo JV de. (2021). In vitro compatibility and nematicidal activity of *Monacrosporium sinense* and *Pochonia chlamydosporia* for biological control of bovine parasitic nematodes. *Parasitology*, *148*(8), 956-961. https://doi.org/10.1017/S0031182021000652.

O'Lorcain P. (1994). Epidemiology of *Toxocara* spp. in stray dogs and cats in Dublin, Ireland. *Journal of Helminthology*, *68*(4), 331-336.

O'Lorcain P. (1995). The effects of freezing on the viability of *Toxocara canis* and *T. cati* embryonated eggs. *Journal of Helminthology*, *69*(2), 169-171. https://doi.org/10.1017/s0022149x00014073.

Olsen A, van Lieshout L, Marti H, Polderman T, Polman K, Steinmann P, Stothard R, Thybo S, Verweij JJ, Magnussen P. (2009). Strongyloidiasis—the most neglected of the neglected tropical diseases? *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *103*(10), 967-972. https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2009.02.013.

Ooi HK, Tenora F, Itoh K, Kamiya M. (1993). Comparative study of *Trichuris trichiura* from non-human primates and from man, and their difference with *T. suis*. *Journal of Veterinary Medical Science*, *55*(3), 363-366. https://doi.org/10.1292/jvms.55.363.

Ortiz Pérez DO, Sánchez Muñoz B, Nahed Toral J, Orantes Zebadúa MA, Cruz López JL, Reyes García ME, Mendoza de Gives P. (2017). Using *Duddingtonia flagrans* in calves under an organic milk farm production system in the Mexican tropics. *Experimental Parasitology*, *175*, 74-78. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.02.009.

Ortuño A, Scorza V, Castellà J, Lappin M. (2014). Prevalence of intestinal parasites in shelter and hunting dogs in Catalonia, Northeastern Spain. *The Veterinary Journal*, *199*(3), 465-467. https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.11.022.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Oshima T. (1961). Influence of pregnancy and lactation on migration of the larvae of *Toxocara canis* in mice. *The Journal of Parasitology*, *47*(4), 657-660. https://doi.org/10.2307/3275080.

Otero D, Alho AM, Nijsse R, Roelfsema J, Overgaauw P, Madeira de Carvalho L. (2018). Environmental contamination with *Toxocara* spp. eggs in public parks and playground sandpits of Greater Lisbon, Portugal. *Journal of Infection and Public Health*, *11*(1), 94-98. https://doi.org/10.1016/j.jiph.2017.05.002.

Overgaauw PA, van Knapen F. (2013). Veterinary and public health aspects of *Toxocara* spp. *Veterinary Parasitology*, *193*(4), 398-403. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.035.

Overgaauw PA, van Zutphen L, Hoek D, Yaya FO, Roelfsema J, Pinelli E, van Knapen F, Kortbeek LM. (2009). Zoonotic parasites in fecal samples and fur from dogs and cats in The Netherlands. *Veterinary Parasitology*, *163*(1-2), 115-122. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.03.044.

Owen WB. (1930). Factors that influence the development of the ova of an *Ascaris* roundworm; *Toxocara canis* under field conditions. *Technical Bulletin*, *71*, 24-27.

Packer J, Ballantyne R. (2010). The role of zoos and aquariums in education for a sustainable future. *New Directions for Adult and Continuing Education*. https://doi.org/10.1002/ace.378.

Padwal N, Humbe A, Jadhav DS, Borde S. (2011). Seasonal variation of intestinal *Trichuris* sp. in sheep and goats from Maharashtra State. *International Multidisciplinary Research Journal, 1*, 17-18.

Paim F, Carretero-Pinzón X, Guzmán-Caro D, Lynch Alfaro J, Boubli J, Ravetta A, Calouro A. (2021). *The IUCN Red List of Threatened Species™*. https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2021-1.RLTS.T160940148A192585552.en.

Pal RA, Qayyum M. (1993). Prevalence of gastrointestinal nematodes of sheep and goats in upper Punjab, Pakistan. *Pakistan Veterinary Journal, 13*, 138-141.

Paller VG, de Chavez ER. (2014). Toxocara (Nematoda: Ascaridida) and other soil-transmitted helminth eggs contaminating soils in selected urban and rural areas in the Philippines. *Scientific World Journal,* 2014, 386232. https://doi.org/10.1155/2014/386232.

Paller VGV, Babia-Abion S. (2019). Soil-transmitted helminth (STH) eggs contaminating soils in selected organic and conventional farms in the Philippines. *Parasite Epidemiology and Control, 7*, e00119. https://doi.org/10.1016/j.parepi.2019.e00119.

Palmer CS, Thompson RC, Traub RJ, Rees R, Robertson ID. (2008). National study of the gastrointestinal parasites of dogs and cats in Australia. *Veterinary Parasitology, 151*(2-4), 181-190. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.10.015.

Palomero AM, Cazapal-Monteiro CF, Valderrábano E, Paz-Silva A, Sánchez-Andrade R, Arias MS. (2020). Soil fungi enable the control of gastrointestinal nematodes in wild bovidae captive in a zoological park: A 4-year trial. *Parasitology*, *147*(9), 791-798. https://doi.org/10.1017/S0031182020000414.

Palomero AM, Hernández JA, Cazapal-Monteiro CF, Arroyo FB, Silva MI, Paz-Silva A, Sánchez-Andrade R, Arias MS. (2018). Implementation of biological control to the integrated control of strongyle infection among wild captive equids in a zoological park. *BioMed Research International*, 4267683. https://doi.org/10.1155/2018/4267683.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Panayotova-Pencheva M. (2011). Species composition and morphology of protostrongylids (Nematoda: Protostrongylidae) in ruminants from Bulgaria. *Parasitology Research, 109*, 1015-1020. https://doi.org/10.1007/s00436-011-2337-0.

Panayotova-Pencheva MS. (2013). Parasites in captive animals: A review of studies in some European zoos. *Der Zoologische Garten, 82*(1-2), 60-71. https://doi.org/10.1016/j.zoolgart.2013.04.005.

Panayotova-Pencheva M. (2016). Experience in the ivermectin treatment of internal parasites in zoo and captive wild animals: A review. *Der Zoologische Garten, 85*, 280-308. https://doi.org/10.1016/j.zoolgart.2016.04.001.

Panuska C. (2006). Lungworms of ruminants. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, 22*(3), 583-593. https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2006.06.002.

Paquet-Durand I, Hernández J, Dolz G, Romero Zuñiga JJ, Schnieder T, Epe C. (2007). Prevalence of *Toxocara* spp., *Toxascaris leonina,* and ancylostomidae in public parks and beaches in different climate zones of Costa Rica. *Acta Tropica, 104*(1), 30-37. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2007.06.011.

Paraud C, Chartier C. (2003). Biological control of infective larvae of a gastrointestinal nematode (*Teladorsagia circumcincta*) and a small lungworm (*Muellerius capillaris*) by *Duddingtonia flagrans* in goat faeces. *Parasitology Research, 89*(2), 102-106. https://doi.org/10.1007/s00436-002-0717-1.

Paraud C, Hoste H, Lefrileux Y, Pommaret A, Paolini V, Pors I, Chartier C. (2005). Administration of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores to goats to control gastrointestinal nematodes: Dose trials. *Veterinary Research*, *36*(2), 157-166. https://doi.org/10.1051/vetres:2004060.

Parker HG, Dreger DL, Rimbault M, Davis BW, Mullen AB, Carpintero-Ramirez G, Ostrander EA. (2017). Genomic analyses reveal the influence of geographic origin, migration, and hybridization on modern dog breed development. *Cell Reports, 19*(4), 697-708. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.03.079.

Parsani HR, Momin RR, Maradia M, Singh VP. (2001). A survey of gastrointestinal parasites of captive animals at Rajkot Municipal Corporation Zoo, Rajkot, Gujarat. *Zoos' Print Journal, 16*, 604-606.

Pas A, Dubey JP. (2008). Fatal toxoplasmosis in sand cats (*Felis margarita*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine, 39*(3), 362-369. https://doi.org/10.1638/2007-0149.1.

Patel PV, Patel AI, Sahu RK, Vyas R. (2001). Prevalence of gastrointestinal parasites in captive birds of Gujarat zoos. *Zoos' Print Journal, 15*, 295-296. https://doi.org/10.11609/JoTT.ZPJ.15.7.295-6.

Patrick PG, Matthews CE, Ayers DF, Tunnicliffe SD. (2007). Conservation and education: prominent themes in zoo mission statements. *The Journal of Environmental Education, 38*(3), 53-60. https://doi.org/10.3200/JOEE.38.3.53-60.

Paz-Silva A, Francisco I, Valero-Coss RO, Cortiñas FJ, Sánchez JA, Francisco R, Arias M, Suárez JL, López-Arellano ME, Sánchez-Andrade R, de Gives PM; Equine Diseases Study Group (Epidemiology, Parasitology and Zoonoses). (2011). Ability of the fungus *Duddingtonia flagrans* to adapt to the cyathostomin egg output by spreading chlamydospores. *Vet Parasitol, 179*(1-3), 277-282. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.02.014.

Peart K. (1993). What a zoo! (Or whatever…). *Scholastic Update,*16-19.

Peek SF, McGuirk SM, Sweeney RW, Cummings KJ. (2018). Infectious Diseases of the Gastrointestinal Tract. In *Rebhun's Diseases of Dairy Cattle,* 249-356.

Perec-Matysiak A, Hildebrand J, Załeśny G, Okulewicz A, Fatuła A. (2008). The evaluation of soil contamination with geohelminth eggs in the area of Wrocław, Poland. *Wiadomości Parazytologiczne, 54*(4), 319-323.

Pérez Cordón G, Hitos Prados A, Romero D, Sánchez Moreno M, Pontes A, Osuna A, Rosales MJ. (2008). Intestinal parasitism in the animals of the zoological garden "Peña Escrita" (Almuñecar, Spain). *Veterinary Parasitology, 156*(3-4), 302-309. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.05.023.

Pérez-Anzúrez G, Olmedo-Juárez A, von-Son de Fernex E, Alonso-Díaz MÁ, Delgado-Núñez EJ, López-Arellano ME, González-Cortázar M, Zamilpa A, Ocampo-Gutierrez AY, Paz-Silva A, Mendoza-de Gives P. (2023). *Arthrobotrys musiformis* (Orbiliales) kills *Haemonchus contortus* infective larvae (Trichostrongylidae) through its predatory activity and its fungal culture filtrates. *Pathogens, 11*(10), 1068. https://doi.org/10.3390/pathogens11101068.

Piano E, Pecetti L. (2010). Minor legume species. In: Boller B, Posselt UK, Veronesi F (Eds.), *Fodder Crops and Amenity Grasses. Handbook of Plant Breeding,* vol 5. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0760-8_20.

Pokorná P, Hejcmanová P, Hejcman M, Pavlu V. (2013). Activity time budget patterns of sheep and goats co-grazing on semi-natural species-rich dry grassland. *Czech Journal of Animal Science, 58*, 208-216.

Poulle ML, Bastien M, Richard Y, Josse-Dupuis É, Aubert D, Villena I, Knapp J. (2017). Detection of *Echinococcus multilocularis* and other foodborne parasites in fox, cat, and dog feces collected in kitchen gardens in a highly endemic area for alveolar echinococcosis. *Parasite,* 24, 29. https://doi.org/10.1051/parasite/2017031

Poveda J. (2021). Insect frass in the development of sustainable agriculture. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, *41*(5), 5. https://doi.org/10.1007/s13593-020-00656-x.

Poveda J, Abril-Urias P, Escobar C. (2020). Biological control of plant-parasitic nematodes by filamentous fungi inducers of resistance: *Trichoderma*, Mycorrhizal and Endophytic Fungi. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 992. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00992.

Prociv P. (1990). Observations on the morphology of *Toxocara pteropodis* eggs. *Journal of Helminthology, 64*(4), 271-277. https://doi.org/10.1017/s0022149x00012281.

Prokopic J, Figallová V. (1982). Migration of some roundworm species in experimentally infected white mice. *Folia Parasitologica, 29*(4), 309-313.

Rabb GB. (2004). The evolution of zoos from menageries to centers of conservation and caring. *Curator: The Museum Journal, 47*, 237-246. https://doi.org/10.1111/j.2151-6952.2004.tb00121.x.

Rabinowitz PM, Gordon Z, Odofin L. (2007). Pet-related infections. *American Family Physician, 76*(9), 1314-1322.

Ranasinghe S, Armson A, Lymbery AJ, Zahedi A, Ash A. (2023). Medicinal plants as a source of antiparasitics: an overview of experimental studies. *Pathogens and Global Health*, *117*(6), 535-553. https://doi.org/10.1080/20477724.2023.2179454.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Ravasi DF, O'Riain MJ, Davids F, Illing N. (2012). Phylogenetic evidence that two distinct *Trichuris* genotypes infect both humans and non-human primates. *PLoS One, 7*(8), e44187. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044187.

Raza MA, Iqbal Z, Jabbar A, Yaseen M. (2007). Point prevalence of gastrointestinal helminthiasis in ruminants in southern Punjab, Pakistan. *Journal of Helminthology, 81*(3), 323-328. https://doi.org/10.1017/S0022149X07818554.

Rehbein S, Lindner T, Kollmannsberger M, Winter R, Visser M. (1997). Helminth infection of slaughtered sheep in Upper Bavaria. 3. Distribution of colonization of nematodes in the large intestine of sheep. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, *110*(6), 223-228.

Reichel MP, Ayanegui-Alcérreca MA, Gondim LFP, Ellis JT. (2013). What is the global economic impact of *Neospora caninum* in cattle - The billion dollar question. *International Journal for Parasitology, 43*(2), 133-142. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.10.022.

Reinhardt V, Seelig D. (1998). *Environmental enhancement for caged rhesus macaques: a photographic documentation.*

Reiterová K, Tomašovicová O, Dubinský P. (2003). Influence of maternal infection on offspring immune response in murine larval toxocariasis. *Parasite Immunology, 25*(5), 361-368. https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.2003.00642.x.

Reiterová K, Tomasovicová O, Dubinský P. (2006). Influence of *Toxocara canis* infection during pregnancy on offspring resistance towards re-infection. *Parasitology, 132*(5), 625-633. https://doi.org/10.1017/S0031182005009741

Richards LS, Zimmerman GL, Weber DW, Dawley S, Nelson M, Schons DJ. (1987). Anthelmintic efficacy of netobimin against naturally acquired gastrointestinal nematodes in yearling heifers. *Veterinary Parasitology, 26*(1-2), 79-85.

Rivera JA. (1999). Algunas observaciones en los reportes de exámenes *post-mortem* en el Zoo de Jersey (1974-1987) tesis para diploma en manejo de especies amenazadas, 15-18.

Rivero J, García-Sánchez ÁM, Zurita A. (2020). *Trichuris trichiura* isolated from *Macaca sylvanus*: morphological, biometrical, and molecular study. *BMC Veterinary Research, 16*, 445. https://doi.org/10.1186/s12917-020-02661-4.

Roberts LS, Janovy J. (2000). *Foundations of Parasitology*. McGraw-Hill.

Robertson ID, Irwin PJ, Lymbery AJ, Thompson RCA. (2000). The role of companion animals in the emergence of parasitic zoonoses. *International Journal for Parasitology, 30*(12-13), 1369-1377. https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00134-X.

Robertson ID, Thompson RCA. (2002). Enteric parasitic zoonoses of domesticated dogs and cats. *Microbes and Infection, 4*(8), 867-873. https://doi.org/10.1016/S1286-4579(02)01607-6.

Rodrigues JA, Alvares FBV, Silva JT, Ferreira LC, Costa PWL, Sarmento WF, Ferreira Feitosa T, Araújo JV, Braga FR, Vilela LR. (2020). Predatory effects of the fungus *Arthrobotrys* cladodes on sheep gastrointestinal nematodes. *Biocontrol Science and Technology*, *30*(8), 830-839. https://doi.org/10.1080/09583157.2020.1775176.

Rodríguez Cascón M, Arroyo Balán F, Romasanta Blanco A, Sánchez-Andrade R. (2017). Control biológico de zoonosis en parques zoológicos: trichurosis y capillariosis. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias, 11*(Especial), 222-226. https://doi.org/10.5209/RCCV.55503.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Rodríguez Gallegos LM, Núñez CR, Gómez LGB, Castañeda JSM, Cardenas RH. (2016). Presence of *Toxocara* spp. in Domestic Cats in the State of Mexico. *Acta Scientiae Veterinariae, 44*(1), 5. https://doi.org/10.22456/1679-9216.80903.

Roe K, McConney A, Mansfield CF. (2014). The Role of Zoos in Modern Society—A Comparison of Zoos' Reported Priorities and What Visitors Believe They Should Be. *Anthrozoös, 27*(4), 529-541. https://doi.org/10.2752/089279314X14072268687808.

Romaniuk K, Sokół R, Michalski M. (2004). Występowanie pasożytów wewnętrznych u psów i kotów w schronisku dla bezdomnych zwierząt. *Medycyna Weterynaryjna, 60*, 839-840.

Romero Núñez C, Mendoza Martínez GD, Yañez Arteaga S, Ponce Macotela M, Bustamante Montes P, Ramírez Durán N. (2013). Prevalence and risk factors associated with *Toxocara canis* infection in children. *The Scientific World Journal, 2013*, 572089. https://doi.org/10.1155/2013/572089.

Rossignol JF, Maisonneuve H. (1984). Benzimidazoles in the treatment of trichuriasis: A review. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology, 78*(2), 135-144. https://doi.org/10.1080/00034983.1984.11811787.

Rothfels N. (2002). *Savages and Beasts: The Birth of the Modern Zoo*. Johns Hopkins University Press. https://doi.org/10.1353/book.3441.

Ruiz-Fons F, Rodríguez O, Torina A, Naranjo V, Gortázar C, de la Fuente J. (2008). *Prevalence of Coxiella burnetti infection in wild and farmed ungulates*. *Veterinary Microbiology, 126*(1-3), 282-286. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.06.020.

Saavedra S, Rohr RP, Bascompte J, Godoy O, Kraft NJB, Levine JM. (2017). *A structural approach for understanding multispecies coexistence*. *Ecological Monographs, 87*, 470-486. https://doi.org/10.1002/ecm.1263.

Safarov A, Mihalca AD, Park GM, Akramova F, Ionică AM, Abdinabiev O, Deak G, Azimov D. (2022). A survey of helminths of dogs in rural and urban areas of Uzbekistan and the zoonotic risk to the human population. *Pathogens*, *11*(10), 1085. https://doi.org/10.3390/pathogens11101085.

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. *Parasitology Research*, *109*(3), 707-713. https://doi.org/10.1007/s00436-011-2302-y.

Saha SB, Pramanik S, Mukherjee GS. (1996). *Prevalence of gastrointestinal nematodes of goats in West Bengal*. *Indian Journal of Animal Sciences, 11*(1), 51-52.

Saidi A, Mimouni R, Hamadi F, Oubrou W. (2020). *Cross-sectional study of Eimeria spp. infection in three antelope species (Addax nasomaculatus, Gazella dorcas and Oryx dammah) maintained in the Souss-Massa National Park (Morocco)*. *Nature Conservation Research, 5*(Suppl.2), 77-82. https://dx.doi.org/10.24189/ncr.2020.059.

Saiful Islam KM, Taimur M. (2008). *Helminthic and protozoan internal parasitic infections in free ranging small ruminants of Bangladesh*. *Slovenian Veterinary Research, 45*, 67-72.

Salinas J, Caro MR, Vicente J, Cuello F, Reyes-Garcia AR, Buendía AJ, Rodolakis A, Gortázar C. (2009). *High prevalence of antibodies against Chlamydiaceae and Chlamydophila abortus in wild ungulates using two "in house" blocking-ELISA tests*. *Veterinary Microbiology, 135*(1-2), 46-53. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.10.001.

USA

Samson A, Dubay SA, Huspeni TC, Cyr A. (2012). *Influence of environmental variables on Baylisascaris procyonis infection in raccoons*. *Journal of Parasitology, 98*(6), 1279-1282. https://doi.org/10.1645/GE-3073.1.

Sangster C, Bryant B, Campbell-Ward M, King JS, Šlapeta J. (2010). *Neosporosis in an Aborted Southern White Rhinoceros (Ceratotherium simum simum) Fetus*. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine, 41*(4), 725-728. https://doi.org/10.1638/2009-0250.1.

Sanjari G, Yu B, Ghadiri H, Ciesiolka CA, Rose CW. (2009). Effects of time-controlled grazing on runoff and sediment loss. *Australian Journal of Soil Research*, *47*, 796-808. https://doi.org/10.1071/SR09032.

Santos MC, Silva BF, Amarante AFT. (2012). Environmental factors influencing the transmission of *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, *188*(3-4), 277-284. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.03.056.

Saumell CA, Fernández AS, Echevarria F, Gonçalves I, Iglesias L, Sagüés MF, Rodríguez EM. (2016). Lack of negative effects of the biological control agent *Duddingtonia flagrans* on soil nematodes and other nematophagous fungi. *Journal of Helminthology*, *90*(6), 706-711. https://doi.org/10.1017/S0022149X1500098X.

Savigny DH. (1975). In vitro maintenance of *Toxocara canis* larvae and a simple method for the production of *Toxocara* ES antigen for use in serodiagnostic tests for visceral larva migrans. *Journal of Parasitology*, *61*(4), 781-782.

Schaaf CD. (1994). The role of zoological parks in biodiversity conservation in the Gulf of Guinea islands. *Biodiversity & Conservation*, *3*, 962-968. https://doi.org/10.1007/BF00129670.

Schantz PM. (1989). *Toxocara larva migrans* now. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *41*(3 Suppl), 21-34. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1989.41.21.

Schieber MC, Štrkolcová G. (2019). Prevalence of endoparasites in carnivores in a zoo and a wolves park in Germany. *Folia Veterinaria*, *63*(1), 54-59. https://doi.org/10.2478/fv-2019-0008.

Scholler M, Hagedorn G, Rubner A. (1999). A reevaluation of predatory orbiliaceous fungi. II. A new generic concept. *Sydowia*, *51*, 89-113.

Schön J, Stoye M. (1986). Pränatale und galaktogene Infektionen mit *Toxocara mystax* ZEDER 1800 (Anisakidae) bei der Maus. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, *33*, 397-412. https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1986.tb00050.x.

Schroers H-J, Samuels GJ, Seifert KA, Gams W. (1999). Classification of the mycoparasite *Gliocladium roseum* in *Clonostachys* as *C. rosea*, its relationship to *Bionectria ochroleuca*, and notes on other *Gliocladium*-like fungi. *Mycologia*, *91*(3), 365-385. https://doi.org/10.1080/00275514.1999.12061028.

Sengar A, Shrivastav AB, Singh KP, Rokde A. (2017). *Noninvasive assessment of gastrointestinal parasites infection in free-ranging wild herbivores and adjoining livestock of Panna Tiger Reserve, Madhya Pradesh, India.* Veterinary World, *10*(6), 748-751. https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.748-751.

Shalaby HA. (2013). Anthelmintics resistance; how to overcome it? *Iranian Journal of Parasitology*, *8*, 18-32.

Shimizu T. (1993). Prevalence of *Toxocara* eggs in sandpits in Tokushima City and its outskirts. *Journal of Veterinary Medical Science*, *55*(5), 807-811. https://doi.org/10.1292/jvms.55.807.

Shukullari E, Rapti D, Visser M, Hamel D, Pfister K, Rehbein S. (2015). Parasites and vector-borne diseases in client-owned dogs in Albania: Intestinal and pulmonary endoparasite infections. *Parasitology Research*. https://doi.org/10.1007/s00436-015-4704-8.

Silva AR, Araújo JV, Braga FR, Alves CD, Frassy LN. (2010). *In vitro* ovicidal activity of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium*, and *Pochonia chlamydosporia* on *Trichuris vulpis* eggs. *Veterinary Parasitology*, *172*(1-2), 76-79. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.04.034.

Silva ME, Uriostegui MA, Millán-Orozco J, et al. (2017). Predatory activity of *Butlerius* nematodes and nematophagous fungi against *Haemonchus contortus* infective larvae. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria = Brazilian Journal of Veterinary Parasitology: Orgão Oficial do Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária*, *26*(1), 92-95. https://doi.org/10.1590/s1984-29612016091.

Silveira FW, Braga F, Tavela A, Dos Santos L, Domingues R, Aguiar A, Ferraz C, Carvalho L, Ayupe T, Zanuncio J, Araújo J. (2017b). Nematophagous fungi combinations reduce free-living stages of sheep gastrointestinal nematodes in the field. *Journal of Invertebrate Pathology*, *150*. https://doi.org/10.1016/j.jip.2017.08.013.

Silveira FW, Silva M, Braga F, Araújo J. (2017a). Nematicide activity of microfungi (Orbiliales, Orbiliaceae) after transit through the gastrointestinal tract of *Gallus gallus domesticus*. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, *18*, 1-9. https://doi.org/10.1590/s1519-99402017000100001.

Simonato G, Frangipane di Regalbono A, Cassini R, Traversa D, Beraldo P, Tessarin C, Pietrobelli M. (2015). Copromicroscopic and molecular investigations on intestinal parasites in kenneled dogs. *Parasitology Research*, *114*(5), 1963-1970. https://doi.org/10.1007/s00436-015-4385-3.

Singh E, Kaur P, Singla LD, Bal MS. (2017). Prevalence of gastrointestinal parasitism in small ruminants in western zone of Punjab, India. *Veterinary World*, *10*(1), 61-66. https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.61-66.

Sobczuk M, Klich D, Uciechowska-Grakowicz A, Olech W. (2023). *Exploration behaviour of European bison (Bison bonasus) after its reintroduction to Żednia Forest District in North-Eastern Poland. Diversity, 15*(4), 575. https://doi.org/10.3390/d15040575.

Soriano SV, Pierangeli NB, Roccia I, Bergagna HF, Lazzarini LE, Celescinco A, Saiz MS, Kossman A, Contreras PA, Arias C, Basualdo JA. (2010). A wide diversity of zoonotic intestinal parasites infects urban and rural dogs in Neuquén, Patagonia, Argentina. *Veterinary Parasitology*, *167*(1), 81-85. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.09.048.

Soulsby EJL. (1982). *Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals.* (7th ed.). Baillière Tindall. https://doi.org/10.1016/0035-9203(84)90110-X.

Sowemimo OA, Lee YL, Asaolu SO, Chuang TW, Akinwale OP, Badejoko BO, Gyang VP, Nwafor T, Henry E, Fan CK. (2017). Seroepidemiological study and associated risk factors of *Toxocara canis* infection among preschool children in Osun State, Nigeria. *Acta Tropica*, *173*, 85-89. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.05.030.

Spickler AR. (2019). Hemorrhagic septicemia. Retrieved from http://www.csfph.iastate.edu/DiseaseInfo/factsheets.php.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Sprenger LK, Yoshitani UY, Buzatti A, Molento MB. (2018). Occurrence of gastrointestinal parasites in wild animals in State of Paraná, Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, *90*(1), 231-238. https://doi.org/10.1590/0001-3765201720150030.

Stephen C. (2014). Toward a modernized definition of wildlife health. *Journal of Wildlife Diseases*, *50*(3), 427-430. https://doi.org/10.7589/2013-11-305.

Stojčević D, Sušić V, Lučinger S. (2010). Contamination of soil and sand with parasite elements as a risk factor for human health in public parks and playgrounds in Pula, Croatia. *Veterinarski Arhiv*, *80*, 733-742. https://hrcak.srce.hr/62389.

Strube C, Heuer L, Janecek E. (2013). *Toxocara* spp. infections in paratenic hosts. *Veterinary Parasitology*, *193*(4), 375-389. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.033.

Sudhakar NR, Samanta S, Sahu S, Raina OK, Gupta SC, Madhu DN, Kumar A. (2013). Prevalence of *Toxocara* species eggs in soil samples of public health importance in and around Bareilly, Uttar Pradesh, India. *Veterinary World*, *6*, 87-90. https://doi.org/10.5455/VETWORLD.2013.87-90.

Swedell L. (2002). Ranging behavior, group size, and behavioral flexibility in Ethiopian hamadryas baboons (*Papio hamadryas hamadryas*). *Folia Primatologica (Basel)*, *73*(2-3), 95-103. https://doi.org/10.1159/000064787.

Swedell L. (2011). African papionins: diversity of social organization and ecological flexibility. *In Primates in Perspective* (2nd ed.).

Tariq KA, Chishti MZ, Ahmad F, Shawl AS. (2008). Epidemiology of gastrointestinal nematodes of sheep managed under traditional husbandry system in Kashmir Valley. *Veterinary Parasitology*, *158*(1-2), 138-143. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.06.013.

Tavela AD, Araújo JV, Braga FR, Araújo JM, Magalhães LQ, Silveira WF, Borges LA. (2012). In vitro association of nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans* (AC001), *Monacrosporium thaumasium* (NF34), and *Pochonia chlamydosporia* (VC1) to control horse cyathostomin (*Nematoda*: Strongylidae). *Biocontrol Science and Technology*, *22*, 607-610. https://doi.org/10.1080/09583157.2012.672952.

Tavela AO, de Araújo JV, Braga FR, da Silveira WF, Dornelas e Silva VH, Carretta Júnior M, Borges LA, Araujo JM, Benjamin LA, 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. *Research in Veterinary Science*, *94*(3), 568-572. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.11.011.

Taylor MA, Coop B, Wall RL. (2007). *Veterinary Parasitology* (3rd ed.).

Taylor MA, Coop RL, Wall RL. (2015). *Veterinary Parasitology* (4th ed.).

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. *Veterinary Parasitology*, *120*(4), 285-296. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.09.024.

Terry J. (2013). The use of *Duddingtonia flagrans* for gastrointestinal parasitic nematode control in feces of exotic artiodactylids at Disney's Animal Kingdom®. *LSU Master's Theses*, 2643. https://digitalcommons.lsu.edu/gradschool_theses/2643.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Thawait V, Maiti S, Dixit A. (2014). Prevalence of gastrointestinal parasites in captive wild animals of Nandan Van Zoo, Raipur, Chhattisgarh. *Veterinary World*, *7*, 448-451. https://doi.org/10.14202/vetworld.2014.448-451.

Torgerson PR, Macpherson CN. (2011). The socioeconomic burden of parasitic zoonoses: global trends. *Veterinary Parasitology*, *182*(1), 79-95. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.07.017.

Trenda E. (2024). Cat and dog owning households in Spain 2010-2023. Published by *Statista*, June 17, 2024.

Umur Ş, Yukari BA. (2005). An abattoir survey of gastrointestinal nematodes in sheep in the Burdur region, Turkey. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, *29*, 1195-1201.

Urquhart GM, Armour J, Duncan JL, Dunn AM, Jennings FW. (1996). *Veterinary Parasitology,* (2nd ed.). Blackwell Science.

Van Metre DC, Tennant BC, Whitlock RH. (2008). Chapter 6—Infectious Diseases of the Gastrointestinal Tract. In *Rebhun's Diseases of Dairy Cattle*, (2nd ed.); Divers TJ, Peek SF, (Eds.); W.B. Saunders: St. Louis, Missouri, USA, (pp. 200-294). https://doi.org/10.1016/b978-141603137-6.50009-0.

Van Oorschot CAN. (1985). Taxonomy of the *Dactylaria* complex. A review of *Arthrobotrys* and allied genera. *Studies in Mycology*, *26*, 61-95.

Van Tieghem P. (1875). Nouvelles recherches sur les Mucorinées. *Annales des Sciences Naturelles, Botanique*, série VI, *1*, 5-175.

Vandemark LM, Jia TW, Zhou XN. (2010). Social science implications for control of helminth infections in Southeast Asia. *Advances in Parasitology*, *73*, 137-170. https://doi.org/10.1016/S0065-308X(10)73006-2.

Vercruysse J, Albonico M, Behnke JM, Kotze AC, Prichard RK, McCarthy JS, Montresor A, Levecke B. (2011). Is anthelmintic resistance a concern for the control of human soil-transmitted helminths? *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 1(1), 14-27. https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2011.09.002.

Vercruysse J, Charlier J, Van Dijk J, Morgan ER, Geary T, von Samson-Himmelstjerna G, Claerebout E. (2018). Control of helminth ruminant infections by 2030. *Parasitology*, 145(13), 1655-1664. https://doi.org/10.1017/S003118201700227X.

Verdú JR, Cortez V, Ortiz AJ, et al. (2020). Biomagnification and body distribution of ivermectin in dung beetles. *Scientific Reports*, *10*, 9073. https://doi.org/10.1038/s41598-020-66063-0.

Vieira ÍS, Oliveira IC, Campos AK, Araújo JV. (2019). Association and predatory capacity of fungi *Pochonia chlamydosporia* and *Arthrobotrys cladodes* in the biological control of parasitic helminths of bovines. *Parasitology*, *146*(10), 1347-1351. https://doi.org/10.1017/S003118201900060X.

Vigne J-D, Helmer D, Peters J. (2005). New archaeozoological approaches to trace the first steps of animal domestication: General presentation, reflections and proposals. In: Vigne J-D, Helmer D, Peters J, (Eds.). *The first steps of animal domestication: New archaeozoological approaches*. Oxbow Books, Oxford, (pp. 1-16).

Vila C, Sundqvist A-K, Nilsson K, Wayne R K. (1997). Multiple and ancient origins of the domestic dog. *Science*, *276*(5319), 1687-1689. https://doi.org/10.1126/science.276.5319.1687.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Vilela VL, Feitosa TF, Braga FR, de Araújo JV, Dos Santos A, De Morais DF, Souto D V D O, Athayde A C R. (2016). Coadministration of nematophagous fungi for biological control over gastrointestinal helminths in sheep in the semiarid region of northeastern Brazil. *Veterinary Parasitology*, *221*, 139-143. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.03.027.

Vilela VL, Feitosa TF, Braga FR, Vieira VD, Lucena SC, Araújo JV. (2018). Control of sheep gastrointestinal nematodes using the combination of *Duddingtonia flagrans* and Levamisole Hydrochloride 5. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária = Brazilian Journal of Veterinary Parasitology: Órgão Oficial do Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária*, *27*(1), 27-32. https://doi.org/10.1590/S1984-296120180011.

Viña C, Silva MI, Palomero AM, Voinot M, Vilà M, Hernández JA, Paz-Silva A, Sánchez-Andrade R, Cazapal-Monteiro CF, Arias MS. (2020). The control of zoonotic soil-transmitted helminthoses using saprophytic fungi. *Pathogens*, *9*(12), 1071. https://doi.org/10.3390/pathogens9121071.

Vo NNQ, Fukushima EO, Muranaka T. (2017). *Structure and hemolytic activity relationships of triterpenoid saponins and sapogenins*. *Journal of Natural Medicines*, *71*, 50-58. https://doi.org/10.1007/s11418-016-1026-9.

Voinot M, Cazapal-Monteiro C, Hernández JA, Palomero AM, Arroyo FL, Sanchís J, Pedreira J, Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A, Arias MS. (2020). Integrating the control of helminths in dairy cattle: Deworming, rotational grazing and nutritional pellets with parasiticide fungi. *Veterinary Parasitology*, *278*, 109038. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109038.

Voinot M, Bonilla R, Sousa S, Sanchís J, Canhão-Dias M, Romero Delgado J, Lozano J, Sánchez-Andrade R, Sol Arias M, Madeira de Carvalho L. (2021). Control of strongyles in first-season grazing ewe lambs by integrating deworming and thrice-weekly administration of parasiticidal fungal spores. *Pathogens*, *10*(10), 1338. https://doi.org/10.3390/pathogens10101338.

Voinot M, Arroyo F, Hernández JA, Paz-Silva A, Sánchez-Andrade R, Bermúdez R, Cazapal-Monteiro CF. (2022). Safety of daily administration of pellets containing parasiticidal fungal spores over a long period of time in heifers. *Biocontrol Science and Technology, 32*(11), 1249-1259. https://doi.org/10.1080/09583157.2021.2008317.

Vonholdt BM, Pollinger JP, Lohmueller KE, Han E, Parker HG, Quignon P, Degenhardt JD, Boyko AR, Earl DA, Auton A, Reynolds A, Bryc K, Brisbin A, Knowles JC, Mosher DS, Spady TC, Elkahloun A, Geffen E, Pilot M, Jedrzejewski W, Greco C, Randi E, Bannasch D, Wilton A, Shearman J, Musiani M, Cargill M, Jones PG, Qian Z, Huang W, Ding ZL, Zhang YP, Bustamante CD, Ostrander EA, Novembre J, Wayne RK. (2010). Genome-wide SNP and haplotype analyses reveal a rich history underlying dog domestication. *Nature, 464*(7290), 898-902. https://doi.org/10.1038/nature08837.

Waller PJ. (1997). Sustainable helminth control of ruminants in developing countries. *Veterinary Parasitology, 71*(2-3), 195-207. https://doi.org/10.1016/s0304-4017(97)00032-0.

Waller PJ. (2006). Sustainable nematode parasite control strategies for ruminant livestock by grazing management and biological control. *Animal Feed Science and Technology, 126*(3-4), 277-289. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.08.007.

Wang HB, Zhang HJ, Song LL, Zhu L, Chen M, Ren GJ, Liu GH, Zhao GH. (2019). Morphological and molecular confirmation of the validity of *Trichuris rhinopiptheroxella* in the endangered

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

golden snub-nosed monkey (*Rhinopithecus roxellana*). *J Helminthol, 93*(5), 601-607. https://doi.org/10.1017/S0022149X18000500.

Wayne RK, vonHoldt BM. (2012). Evolutionary genomics of dog domestication. *Mamm Genome, 23*(1-2), 3-18. https://doi.org/10.1007/s00335-011-9386-7

Wemmer C, Derrickson S, Collins L. (1996). The role of conservation and survival centers in wildlife conservation. In *Wild mammals in captivity: Principles and techniques* (pp. 306-314).

Wideman GN. (2004). Fatal *Trichuris* spp. infection in a Holstein heifer persistently infected with bovine viral diarrhea virus. *Canadian Veterinary Journal*, *45*, 511-512.

Wiese JD, Caven AJ, Zarlenga DS, Topliff CL, Kelling CL, Salter J. (2021). Gastrointestinal parasites of a reintroduced semi-wild plains bison (*Bison bison bison*) herd: Examining effects of demographic variation, deworming treatments, and management strategy. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, *14*, 216-227. https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2021.02.004.

Wolfe BA. (2015). Bovidae (Except Sheep and Goats) and Antilocapridae. In: *Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine*, Volume *8*, 626-645. https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-7397-8.00063-3.

World Health Organization. (2004). *Preventive chemotherapy in human helminthiasis*. https://www.who.int/publications/i/item/9241547103.

Wratten SD, Tylianakis JM, Čilgi T, Sedcole R. (2003). Effects of flowers on parasitoid longevity and fecundity. *New Zealand Plant Protection*, *56*, 239-245. https://doi.org/10.30843/NZPP.2003.56.6018.

Xie Y, Zhao B, Hoberg EP. (2018). Genetic characterisation and phylogenetic status of whipworms (*Trichuris* spp.) from captive non-human primates in China, determined by nuclear and mitochondrial sequencing. *Parasites & Vectors*, *11*, 516. https://doi.org/10.1186/s13071-018-3100-5.

Yamamoto N, Kon M, Saito T, Maeno N, Koyama M, Sunaoshi K, Yamaguchi M, Morishima Y, Kawanaka M. (2009). Prevalence of intestinal canine and feline parasites in Saitama Prefecture, Japan. *Kansenshogaku Zasshi*, *83*(3), 223-228. https://doi.org/10.11150/kansenshogakuzasshi.83.223.

Yang GL, Zhang XX, Shi CW. (2016). Seroprevalence and associated risk factors of *Toxocara* infection in Korean, Manchu, Mongol, and Han ethnic groups in northern China. *Epidemiology and Infection*, *144*(14), 3101-3107. https://doi.org/10.1017/S0950268816001631.

Young KE, Jensen JM, Craig TM. (2000). Evaluation of anthelmintic activity in captive wild ruminants by fecal egg reduction tests and a larval development assay. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, *31*(3), 348-352. https://doi.org/10.1638/1042-7260(2000)031[0348:EOAAIC]2.0.CO;2.

Young KR. (2018). The effect of the nematode trapping fungus *Duddingtonia flagrans* against gastrointestinal nematodes of exotic ruminant hoofstock at Disney's® Animal Kingdom Lodge. *Thesis*, Louisiana State University.

Zhou C, Li M, Yuan K, Deng S, Peng W. (2012). Pig *Ascaris*: An important source of human ascariasis in China. *Infection, Genetics and Evolution*, *12*(6), 1172-1177. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.04.016.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Ziegler M, Macpherson C. (2019). *Toxocara* and its species. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, *14*, 10.1079/PAVSNNR201914053. https://doi.org/10.1079/PAVSNNR201914053.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

9. ANEXOS

9.1. ANEXO I: LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Parásitos detectados en animales salvajes en cautividad en el Parque Zoológico Marcelle Natureza (Lugo, España) **35**

Tabla 2 Fármacos y dosis empleados para la desparasitación de babuinos, carnívoros y rumiantes en el Parque Zoológico "Marcelle Natureza" (junio 2024) **37**

Tabla 3 Programa de desparasitación en bóvidos mantenidos en el Parque Zoológico "*Marcelle Natureza*" entre 2013 y 2015 (Palomero et al., 2020). Área de pastoreo (m2). Desparasitación (D). Fenbendazol (F), ivermectina (I), praziquantel (P). **37**

Tabla 4 Patogenia y potencial zoonósico de los parásitos entéricos de los perros (*) o en el ser humano (+) clasificado como bajo, medio o alto..... **45**

Tabla 5 Patogenia y potencial zoonósico de los parásitos entéricos de los gatos (*) o humanos (+) clasificado como bajo, medio o alto. **46**

Tabla 6 Presencia de huevos de *Toxocara* y *Ancylostoma* en heces de perros y gatos. **46**

Tabla 7 Presencia de huevos de *Toxocara* y *Ancylostoma* en parques públicos. **47**

Tabla 8 Seroprevalencia de anticuerpos frente a *Toxocara* en personas. **47**

Tabla 9 Recomendaciones para evitar la exposición a diferentes parásitos. **49**

Tabla 10 Los antihelmínticos para perros disponibles en España (ESCCAP, 2018). **50**

Tabla 11 Porcentajes de eficacia frente a huevos de helmintos obtenidos en diferentes estudios realizados con hongos ovicidas. **67**

Tabla 12 Composición del medio de cultivo sólido (por 500 mL) y del medio de cultivo líquido (por 1 L) empleado para el crecimiento de los hongos filamentosos. **77**

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

9.2. ANEXO II: LISTA DE FIGURAS

Fig. 1 Modelo de piedra de león de hace 2.500 años en Egipto. **26**

Fig. 2 Mosaico de Lod (año 300 d.C.) **26**

Fig. 3 Colección de fieras real, Exeter Change, Strand, Londres, 1820..... **27**

Fig. 4 Zoo de Londres (1897)..... **28**

Fig. 5 Instalaciones Parque Zoológico "*Marcelle Natureza*"..... **29**

Fig. 6 Animales mantenidos en recintos vallados (Parque Zoológico "*Marcelle Natureza*", Outeiro de Rei, Lugo, España) **31**

Fig. 7 Clasificación taxonómica general de los helmintos..... **32**

Fig. 8 Arte rupestre libio (*Tadrart Acacus*) que representa a un cazador y su perro (7.000 años de antigüedad). **39**

Fig. 9 Ancestro(s) de los perros. **40**

Fig. 10 Perro guardián. Mosaico romano de la Casa de Paquius Proculus en Pompeya **42**

Fig. 11 Guía para la desparasitación individual de perros (ESCCAP, 2018)..... **51**

Fig. 12 Huevo de *T. canis* con larva L2 infectante en su interior. **54**

Fig. 13 Estadios de desarrollo de los huevos de *Toxocara canis*. A: una célula, B: dos células, C: tres células, D: cuatro células, E: mórula temprana, F: mórula tardía, G: blástula, H: gástrula, I: prelarva, J: L1, K: L2 y L: L3 ..... **57**

Fig. 14 Huevos de *Trichuris spp.* **58**

Fig. 15 Larva de nematodo atrapada por *D. flagrans*..... **69**

Fig. 16 Clamidosporas e hifas de *D. flagrans* **69**

Fig. 17 Huevo de ascárido destruido por *M. circinelloides*..... **71**

Fig. 18 *M.circinelloides* colonizando las cubiertas de huevos. **71**

Fig. 19 Clamidosporas de *M. circinelloides* (izquierda) y de *D. flagrans*. (derecha) **76**

Fig. 20 Placas sembradas con *M. circinelloides*..... **77**

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Fig. 21 Medio de cultivo líquido sembrado con *M. circinelloides*. **78**

Fig. 22 Gelatinas frescas con esporas de *M. circinelloides* y *D. flagrans*..... **79**

Fig. 23 Formulaciones comestibles en seco. **79**

Fig. 24 Animales del Parque Zoológico "*Marcelle Natureza*". **80**

Fig. 25 Centro canino ‘‘*Soñar*’’. **81**

Fig. 26 Cachorros de Griffon Bleu de Gascogne y Gascón Saintongeois..... **81**

Fig. 27 Babuino (*Papio hamadryas*) en el Parque Zoológico “*Marcelle Natureza*”. **82**

Fig. 28 Bisonte europeo (*Bison bonasus*) en el Parque Zoológico “*Marcelle Natureza*”. **.....83**

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

9.3. ANEXO III: LISTA DE ABREVIATURAS

BRDG: baboons receiving dried gelatins

BRDG: baboons receiving dry gelatins

CB: control baboons

CF: control feces

CP: control puppies

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

ERDF: European Regional Development Fund

FF: feces with fungi

L1, L2, L3, L4: first, second, third and fourth stage larva

PRDG: puppies receiving dried gelatins

PRDG: puppies receiving dry gelatins

PRG: puppies receiving gelatins

PRG: puppies receiving gelatins

RT: room temperature

SCI: Soil Contamination Index

SFF: saprophytic filamentous fungi

STH: soil-transmitted helminths

VCD: viable with cellular development

VE: viable eggs

VI: viable infective

VR: reduction of the viability

VR: viability reduction

VU: viable undeveloped

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

9.4. ANEXO IV: LICENCIA DE FIGURAS Y TABLAS

Todas las figuras y tablas incluidas en la presente Tesis, que no se indica expresamente la fuente son de elaboración propia del autor o del Grupo de Investigación COPAR (GI-2120). El resto de las figuras y tablas, se detalla a continuación su procedencia y licencia de uso.

- **Fig. 1** – Modelo de piedra de león de hace 2.500 años en Egipto. Fuente: The Walters Art Museum. Licencia Creative Commons Zero: No Rights Reserved - https://thewalters.org/about/policies/rights-reproductions/
- **Fig. 2** – Mosaico de Lod. "Mosaico de Lod, believed to belong to a large and well-appointed Roman house and is dated to about A.D. 300, found in Lod, Israel" por Carole Raddato, disponible en Wikimedia Commons bajo la licencia CC BY-SA 2.0. File:Lod Mosaic, believed to belong to a large and well-appointed Roman house and is dated to about A.D. 300, found in Lod, Israel (13670275234).jpg - Wikimedia Commons
- **Fig.3** – Colección de fieras real, Exeter Change, Strand, Londres, c. 1820. Fuente: Ackermann, R. (1812). Polito's Royal Menagerie, Exeter Change, Strand [Coloured aquatint]. London Museum.- Bajo licencia CC BY-NC 4.0. https://www.londonmuseum.org.uk/collections/v/object-94125/politos-royal-menagerie-exeter-change-strand
- **Fig. 4 –** The National Archives. (1897). London Zoo, 1897. Contiene información del sector público licenciada bajo la Open Government Licence v3.0. https://www.nationalarchives.gov.uk/education/resources/significant-places/london-zoo-1897/
- **Fig. 8 –** Arte rupestre libio (*Tadrart Acacus*) que representa a un cazador y su perro (7.000 años de antigüedad). Imagen tomada de https://whc.unesco.org/es/list/287 UNESCO. Licencia Creative Commons Attribution-ShareAlike 3.0 IGO (CC-BY-SA IGO 3.0).
- **Fig. 9 –** Ancestro(s) de los perros. William Harris, CC BY-SA 4.0 File:Canis early hybridisation.jpg - Wikimedia Commons
- **Fig. 10 –** Perro guardián. Mosaico romano de la Casa de *Paquius Proculus* en Pompeya. Todd, Gary, Wikimedia Commons, *Pompeii Ruins Black Mosaic Dog*, bajo licencia Public Domain Mark 1.0 Universal File:Pompeii Ruins Black Mosaic Dog (48443613827).jpg - Wikimedia Commons

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Los hongos filamentosos saprófitos pueden inhibir el desarrollo de parásitos en heces o suelo, siendo útiles para animales en zoológicos, al reducir infecciones y el uso de antihelmínticos. Las gelatinas comestibles con clamidosporas de *Mucor circinelloides* y *Duddingtonia flagrans* son una solución innovadora para administrar estos hongos a los animales. Además, una formulación seca de estos hongos, fácilmente administrable a los animales, es eficaz contra infecciones parasitarias como *Trichuris* spp. y *Toxocara canis.* Se propone un programa de control parasitario integrado que combine análisis fecales, antihelmínticos específicos y aplicación de clamidosporas para un manejo sostenible en zoológicos y criaderos de mascotas. Esta estrategia ecológica y segura beneficia tanto la salud animal como la gestión ambiental.