

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTADE DE VETERINARIA DE LUGO



**“POSIBILIDADES DE CONTROL DE
HELMINTOZONOSIS EN GALICIA”**

TESIS DOCTORAL

Cristiana Filipa Cazapal Monteiro

Grupo de Investigación COPAR (GI-2120)

Dpto. de Patoloxía Animal

Facultade de Veterinaria

Universidade de Santiago de Compostela

27002-Lugo



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

INFORMAN:

Que la Tesis Doctoral titulada **“Posibilidades de control de helmintozoonosis en Galicia”**, que presenta la Licenciada con Grado en Veterinaria Dña. CRISTIANA FILIPA CAZAPAL MONTEIRO para optar al Título de Doctor con Mención Europea, ha sido realizada bajo la dirección conjunta de los abajo firmantes, y en su opinión reúne las condiciones legales precisas.

Y para que conste a los efectos oportunos, firman en Lugo, a 28 de septiembre de 2015.

Rita Sánchez-Andrade Fernández

María Sol Arias Vázquez

Adolfo Paz Silva

Solos podemos hacer muy poco, juntos podemos hacer mucho.- *Helen Keller*

Em certos os casos, quanto mais nobre o gênio, menos nobre o destino.

Um pequeno gênio ganha fama,
um grande gênio ganha descrédito,
um gênio ainda maior ganha desprezo;
um deus ganha crucificação.

Fernando Pessoa



Agradecimientos

Este trabajo está dedicado a toda mi familia, especialmente a mis padres Pilar y Licas por su esfuerzo para que pudiera realizar esta carrera. Siempre me han hecho llegar su apoyo incondicional y, lo que es más importante, su amor. Gracias por ser tal como sois. También a mi hermano Diego por toda una feliz infancia a su lado y por dejarme ser la hermana mayor. A mi abuela Isaura, por ayudarme siempre que lo he necesitado y por enseñarme esa energía interminable. A mi abuela Lucinda por pasarme toda su buena disposición y alegría. A mis abuelos, Adolfo y Elisio por ser mis primeros ejemplos a seguir. A mi sobrina Naiara por su incuestionable inquietud y ansias de saberlo todo. A Marcos, por escuchar las historias y teorías parasitarias con todo el interés del mundo y sin ninguna queja.

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

A mis directores Profa. Dra. Rita Sánchez-Andrade Fernández, por guiarme en mis primeros pasos en el laboratorio, por su generosidad, sus consejos siempre acertados, su tranquilidad, su paciencia y dedicación, así como su cariño, amistad y especialmente por su más que glamurosa visión de la investigación y la docencia. A la Profa. Dra. María Sol Arias, por transmitirme sus conocimientos y experiencias, por brindarme su apoyo y dedicación inestimables, por ser más que una compañera, una buena amiga y convertir en un verdadero placer la realización de este trabajo con su alegría, ilusión y consejos desinteresados. Prof. Dr. Adolfo Paz-Silva, por permitirme satisfacer la curiosidad e introducirme en el mundo de la investigación, así como por dedicarme su tiempo con amabilidad y buen humor. Por enseñarme que el trabajo puede ser un placer y no una obligación. Por su gran paciencia, sabiduría, ánimo, apoyo y comprensión. Por todos esos momentos inolvidables de buena conversación.

Al Dr. José Luis García de Paredes por sus conocimientos, su ayuda y su buen humor. Por los agradables momentos que nos brindaba al final de la tarde.

Ha sido un verdadero placer trabajar con vosotros.

A los catedráticos del Departamento de Patología Animal, la Profa. Dra. Patrocinio Morrondo Pelayo y el Prof. Dr. Pablo Díez Baños por ofrecerme la posibilidad de incorporarme al Laboratorio de Enfermedades Parasitarias.

A Fabián Arroyo y José Ángel, los momentos vividos, las impresiones adquiridas, las vivencias desarrolladas no se pueden resumir en este apartado.

A los Doctores Iván Francisco Vázquez, Pablo Piñeiro, Rubén Francisco Vázquez, y en especial al Dr. Jaime Sanchís Polto, por su paciencia frente a mis dudas, por la compañía más que agradable. Gracias por ese buen humor que permite crear este excelente ambiente de trabajo.

A la Profa. Dra. Rosario Panadero Fontán, al Prof. Dr. Ceferino López Sánchez y al Prof. Dr. Pablo Díaz por su amabilidad, sus consejos y compañía durante las pausas del café.

A los compañeros con los que he compartido buenos ratos en el laboratorio, Javier Cortiñas, y en especial a Silvia Miguélez y a M^a Isabel Rodríguez, porque me hicisteis ver en las tardes de despacho que “se puede hacer investigación y estar a la última de los mejores consejos de moda y belleza”.

A todos aquellos que compartieron conmigo el agradable camino que ha sido la realización de este trabajo, especialmente al Prof. Dr. Madeira de Carvalho por recibirme tan bien en mi propia ciudad.

Um grande obrigada a todos.

ÍNDICE

1. Antecedentes	7
1.1. ASCARIOSIS.....	9
1.1.1.- Estadios de ascáridos en el ambiente	11
1.1.2.- Infección por ascáridos en animales	13
1.1.3.- Zoonosis por ascáridos.....	14
1.2.- ANCYLOSTOMOSIS.....	16
1.2.1.- Estadios de ancylostómidos en el ambiente.....	17
1.2.2.- Infección por ancylostómidos en animales.....	18
1.2.3.- Zoonosis por ancylostómidos.....	19
1.3.- IMPORTANCIA DE LAS ENFERMEDADES PARASITARIAS TRANSMITIDAS POR EL SUELO (ASCARIOSIS Y ANCYLOSTOMOSIS).....	21
1.3.1. Patogenia	21
1.3.2. Distribución de ascáridos y ancylostómidos	25
1.4. CONTROL Y PREVENCIÓN DE ZONOSIS	31
1.4.1.- Control de zoonosis por ascáridos	32
1.4.2.- Control de zoonosis por ancylostómidos	35
1.5. ALTERNATIVAS AL CONTROL DE HELMINTOZOONOSIS: CONTROL BIOLÓGICO	37
1.5.1.- Plantas medicinales.....	37
1.5.2.- Hongos parasiticidas	38
1.5.3.- Perspectivas del uso de hongos para el control biológico de zoonosis.....	49
2. Objetivos	51
3. Unidad temática	53
4. Publicaciones	59
4.1.- ANALYSIS OF THE EFFECT OF SOIL SAPROPHYTIC FUNGI ON THE EGGS OF <i>Baylisascaris procyonis</i> . Parasitology Research (2015) 114: 2443-2450.	59
4.2.- RESTORATION OF FUNGAL BIOTA IN THE SOIL IS ESSENTIAL TO PREVENT INFECTION BY ENDOPARASITES IN GRAZING ANIMALS. En "Fungi: Types, environmental impact and role in disease" (2012) (Eds. Adolfo Paz Silva & María Sol Arias)	60
4.3.- A PRELIMINARY STUDY OF THE BIOLOGICAL CONTROL OF STRONGYLES AFFECTING EQUIDS IN A ZOOLOGICAL PARK. Journal of Equine Veterinary Science (2012) 33: 1115-1120.	87
4.4.- MIXED PRODUCTION OF FILAMENTOUS FUNGAL SPORES FOR PREVENTING SOIL-TRANSMITTED HELMINTH ZONOSSES: A PRELIMINARY ANALYSIS. BioMed Research International Volume 2014, Article ID567876, 7 pages, http://dx.doi.org/10.1155/2013/567876	94
5. Discusión general	102
6. Conclusiones	110
7. Conclusions	112
8. Resumen	114
9. Summary	118
10. Bibliografía	122

1. Antecedentes



El conocimiento profundo de las zoonosis es realmente complicado teniendo en cuenta que de las 1.415 enfermedades infecciosas descritas en Medicina Humana, alrededor del 60% tienen este carácter. Pese a que la palabra zoonosis significa *enfermedad de los animales*, realmente se denominan así todas las enfermedades que se pueden transmitir entre animales vertebrados y el hombre o viceversa (OMS Informe 569, 1976).

La globalización, industrialización, reforma de los sistemas de producción agro-ganaderos y el exceso de consumismo, han favorecido la emergencia de agentes zoonóticos que cursan de forma asintomática en los animales, pero con claras manifestaciones clínicas en las personas. Desde los últimos años del siglo pasado muchas explotaciones ganaderas han optado por la producción animal intensiva. Los residuos que se acumulan en este tipo de explotaciones, junto con la presión de selección ejercida, sobre todo por el uso de fármacos y antibióticos, han provocado el aumento de las zoonosis que se transmiten mediante los alimentos y el agua contaminada.

Tampoco se puede obviar que cada vez hay más personas que conviven en las ciudades con animales de compañía, sobre todo perros y gatos, pero también hurones, lagomorfos, reptiles, etc., lo que incrementa el riesgo de adquirir determinadas zoonosis parasitarias, incluidas las causadas por nematodos ascáridos (Bojar y Kłapeć, 2012). El desarrollo de parques temáticos, visitas a granjas-escuela y en general actividades en las que se comparte ambiente con animales, crean un ambiente propicio para la emergencia de algunas zoonosis.

Las helmintosis transmitidas por el suelo continúan siendo las enfermedades infecciosas crónicas más prevalentes de las personas, con una estimación actual de 2 billones de personas infectadas en todo el mundo (Colley *et al.*, 2001). Su importancia en Salud Pública y su impacto económico son difíciles de cuantificar, aunque la OMS ha estimado que más de 1000 millones de personas en todo el mundo están infectadas por *Trichuris trichiura*, *Ascaris lumbricoides*, *Necator americanus* y *Ancylostoma duodenalis* (OMS Informe 912, 2005).

Entre las parasitosis provocadas por helmintos que se pueden transmitir, en condiciones naturales, entre los animales y el hombre, se describen las ascariosis, que pueden prevalecer tanto en el ámbito urbano y periurbano, como en el rural (Sánchez-Andrade, 2008), y las ancylostomosis. Estas infecciones transmitidas por el suelo (*Soil-transmitted helminthic zoonoses*), generalmente provocan en personas cuadros de *larva migrans* (Kłapeć y Borecka, 2012). En Galicia, existen diversos estudios en los que se ha incidido en el riesgo de helmintozoonosis por nematodos ascáridos y ancylostómidos, debido a la presencia de sus huevos en las heces de mascotas, que no siempre implica la infección de personas, pero sí su exposición a los parásitos (Morrondo *et al.*, 2006; Sánchez-Andrade *et al.*, 2008; Hernández, 2014; Íñiguez, 2015).

1.1. ASCARIOSIS

Toxocara spp. (*T. canis* y *T. cati*) y *Toxascaris leonina* son los ascáridos que afectan a mascotas (perros y gatos) y a carnívoros silvestres (lince, etc.), mientras que *Ascaris suum* parasita los suidos (Araújo *et al.*, 2015). Hasta hace algunos años se consideraba que sólo *Toxocara* tenía carácter zoonótico, pero algunos estudios han demostrado que *A. suum* puede afectar a personas (Nejsum *et al.*, 2005, 2012; Zhou *et al.*, 2012), y han sembrado una duda razonable sobre *Toxascaris* (Rinaldi *et al.*, 2006; Bryan *et al.*, 2011; Dado *et al.*, 2012). En las personas las zoonosis por estos **ascáridos** son particularmente prevalentes en poblaciones marginales de áreas periurbanas y rurales.

En la actualidad ha cobrado mucha importancia la baylisascariosis por su amplia distribución, y por la gravedad de los cuadros que ocasiona. *Baylisascaris procyonis* es un ascárido que afecta principalmente a mapaches (*Procyon lotor*), aunque también puede detectarse en otros mamíferos e incluso aves (Samson *et al.*, 2012; Bauer, 2013). Tiene especial interés en Estados Unidos, donde se describen zonas en las que el 68-82% de los mapaches están parasitados, con el consiguiente riesgo para la población humana, en especial para los niños, en los que causa un síndrome de *larva migrans* (Murray y Kazacos, 2004; Kahn, 2006). En Europa puede llegar a provocar un serio problema, ya que se ha denunciado la presencia de mapaches en libertad en Alemania, Polonia, o Francia. En España se han avistado en Madrid, Valencia, Cataluña, Galicia, Andalucía (Doñana), Canarias o Baleares (García *et al.*, 2012).

a) *Toxocara* spp.

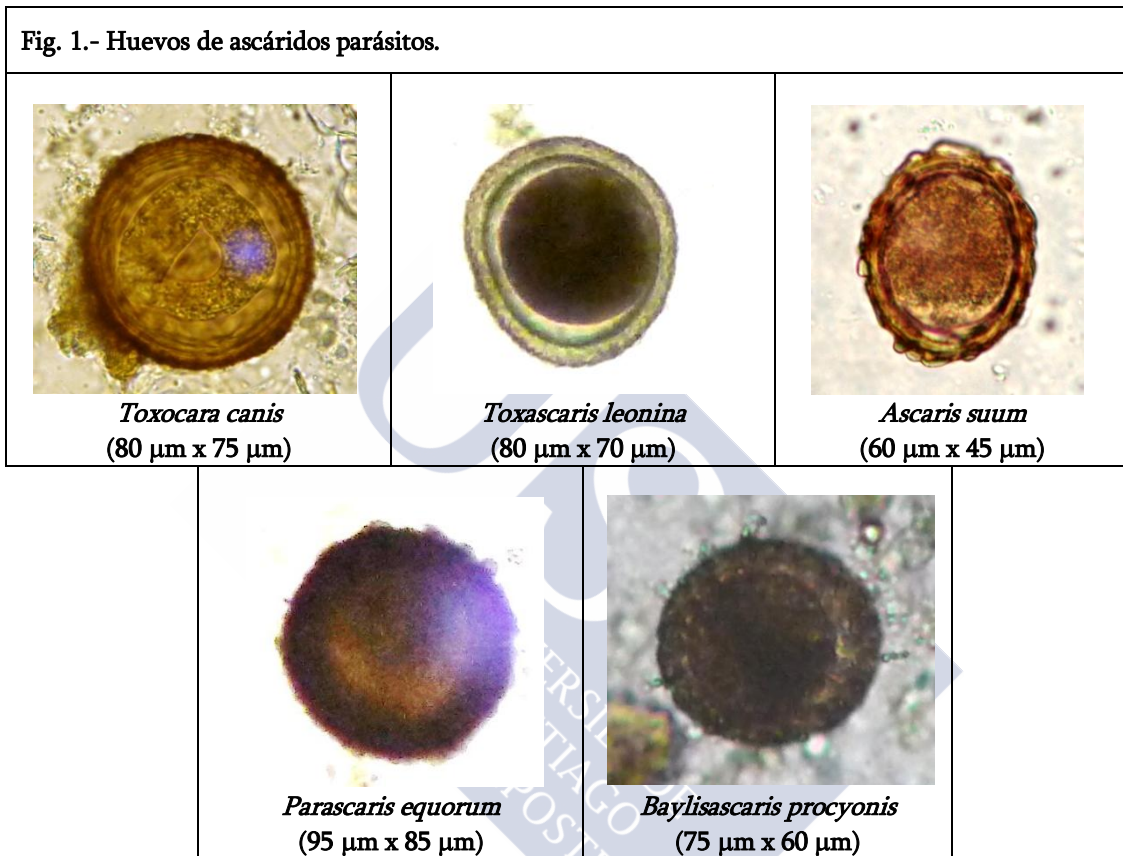
Las especies de este género parasitan el intestino delgado de carnívoros domésticos (perro, gato) y salvajes (lobo, zorro, lince o hurón). Los machos llegan a medir 10 cm de longitud por 2-2,5 mm de diámetro, y las hembras 18 x 2,5 cm y 8 mm de diámetro (Kassai, 1998). La longevidad media de los adultos de *Toxocara* en los perros no supera los 6 meses, y durante este periodo eliminan en las heces del hospedador definitivo miles de huevos / día, subglobulares y de color marrón oscuro, con una cubierta gruesa y rugosa (Hernández, 2014) (Fig. 1).

b) *Toxascaris leonina*

Puede encontrarse en perros, gatos, zorros y otros carnívoros salvajes. Los adultos de *Toxascaris* son prácticamente indistinguibles de *Toxocara*, la principal diferencia es la presencia de una formación ditiforme en el extremo de la cola del macho de este último. También las alas cervicales son más estrechas y lanceoladas en *T. leonina* y con aspecto de punta de flecha en *Toxocara cati*. Los huevos miden de 65 a 75 µm de diámetro (Fig. 1), son subsféricos con una envoltura gruesa y ligeramente punteada, y poseen una célula cuando son eliminados.

c) *Ascaris suum*

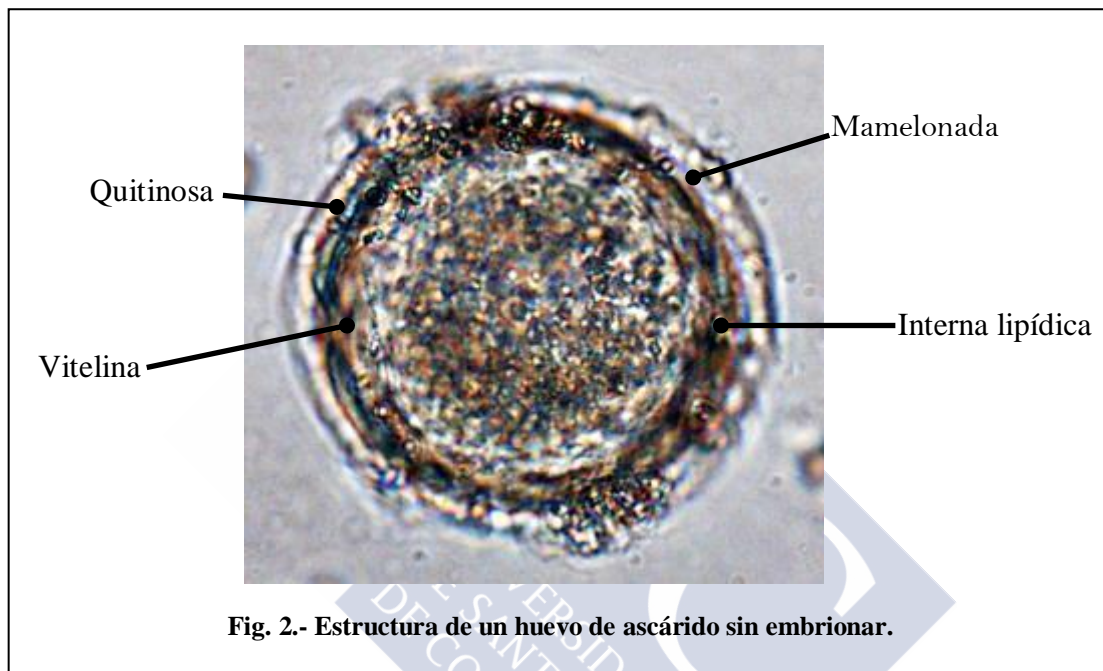
Los adultos parasitan el intestino delgado de suidos, son de color blanco amarillento y miden 15-31 cm de longitud por 2-4 mm de diámetro (Mozgovoï, 1968; Schmidt y Roberts, 1984; Soulsby, 1987). El huevo es ovoide y amarillento, de cubierta gruesa con la superficie externa irregularmente mamelonada (Fig. 1).

d) *Baylisascaris procyonis*

Afecta especialmente a mapaches, aunque puede infectar también a cánidos, pequeños mamíferos y aves. Biológica y morfológicamente se asemeja a *T. canis*. Los adultos son blancos, cilíndricos y cónicos en ambos extremos. La hembra alcanza 20-22 cm de largo y el macho 9-11 cm (Kazacos, 2001). Las hembras adultas de *B. procyonis* eliminan 115.000-180.000 huevos/día (Kazacos, 2001), de forma elipsoidal y color marrón oscuro, y un tamaño aproximado de 63-88 x 50-70 μ m (Fig. 1). A diferencia de *T. canis*, las larvas de *Baylisascaris* continúan creciendo en el interior de los hospedadores paraténicos, entre los que se encuentra el ser humano.

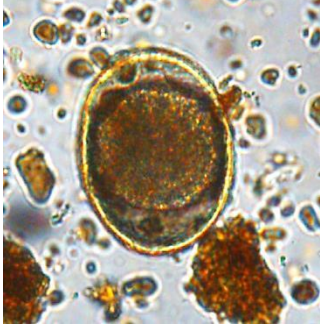

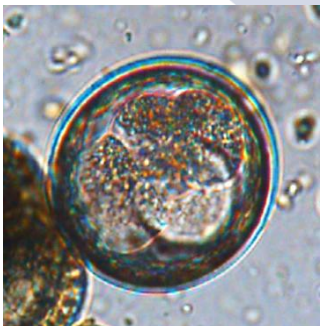

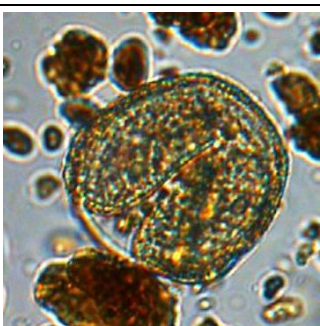
1.1.1.- Estadios de ascáridos en el ambiente

Los huevos de los ascáridos tienen forma globular a subglobular, y cuentan con una cubierta gruesa, con 3 capas concéntricas que les confieren una elevada protección frente a agentes físicos, químicos y ambientales (Papajová *et al.*, 2008) (Fig. 2). La capa externa está impregnada de una sustancia pegajosa, compuesta por proteínas, la intermedia por un complejo proteico-quitinoso y la interna por lípidos (Wharton, 1980). En el interior contienen la célula huevo, globular y no segmentada en el momento de la excreción con las heces.



Atendiendo a su grado de desarrollo, en los huevos de ascáridos se pueden distinguir 5 estadios (Fig. 3), cigoto de 1 célula, de 2 células, mórula, pre-embrión y embrión (Romasanta, 2004).

Bajo condiciones de calor moderado y aun en presencia de temperaturas fluctuantes (noches frías), la mayoría de los huevos se convierten en infectivos en 3-4 semanas. Se ha comprobado que huevos embrionados de *B. procyonis* almacenados durante 9-12 años a 4°C mantienen su infectividad y patogenicidad sobre el sistema nervioso central de ratones (Kazacos, 2001). En presencia de humedad adecuada, los huevos embrionados permanecen viables durante años en el suelo, aunque los inviernos sean muy fríos (Kazacos, 1986, 1991). Sin embargo el calor extremo y la sequedad que existe en graneros y áticos durante los meses de verano destruyen los huevos de *B. procyonis* con mayor rapidez por desecación (Kazacos y Boyce, 1989).

Fig. 3.- Evolución temporal de los huevos de ascáridos (<i>T. leonina</i>).	
	<p>Huevo con cigoto de 1 célula, son los huevos eliminados con las heces de los hospedadores definitivos.</p>
	<p>Huevo con 2 células, ya se ha iniciado la división celular y se observan 2 células o blastómeros.</p>
	<p>Huevo con mórula, constituida por un número variable de blastómeros de tamaño y forma regular.</p>
	<p>Con pre-embrión, que adopta forma de renacuajo.</p>
	<p>Huevo embrionado, en cuyo interior se encuentra la larva de segundo estadio (L2), infectiva para hospedadores definitivos y paraténicos.</p>

1.1.2.- Infección por ascáridos en animales

Cuando llegan al suelo transportados en las heces, los huevos de los ascáridos no son infectivos, y ha de transcurrir un periodo de 5-9 días para que en su interior se forme la larva 1 (L1) (Bojar y Kłapeć, 2012), que a las 2-5 semanas muda a L2, convirtiéndose el huevo en infectivo para los hospedadores definitivos y paraténicos (roedores, personas) (Mejer y Roepstorff, 2006) (Tabla 1). A diferencia del resto de nematodos, la infección por ascáridos se debe a las larvas de segundo estadio (Urquhart *et al.*, 2001). Hace algunos años se enunció la hipótesis de que en el interior del huevo, después de 2 mudas se desarrollaba una L3 como fase infectiva (Geenen *et al.*, 1999).

Una vez ingerido el huevo con L2 por el hospedador definitivo, después de unas 6 horas en presencia de al menos cuatro estímulos (temperatura corporal, anhídrido carbónico, pH≈ 6 y condiciones reductoras inespecíficas), la larva abandona el huevo (Fairbairn, 1960, 1961) y realiza una migración intraorgánica compleja hasta transformarse en adulto en el intestino. El ciclo completo dura entre 49 y 100 días (Nansen y Roepstorff, 1999; Sellon y Long, 2007; Reinemeyer, 2009).

Pese a que el ciclo biológico de los distintos ascáridos presenta muchas similitudes, es preciso señalar que mientras que la infección en todas las especies se produce por la ingestión de huevos y de hospedadores paraténicos que contienen L2 viables, en el caso de *Toxocara* se puede producir además por vía **placentaria** y **galactógena** (Prieto Novoa, 1995) (Tabla 1). Resulta notable destacar que la infección de los mapaches jóvenes por *B. procyonis* se produce por ingestión de huevos con L2, en tanto que los adultos se infectan al engullir hospedadores paraténicos (sobre todo los roedores) portadores de L2 (Page *et al.*, 2011).

Tabla 1.- Características de la transmisión de ascariosis.

Ascárido	Transmisión	Infectividad huevos	Periodo prepatencia
<i>Toxocara canis</i>	H, G, T, HP	2-4 semanas	6-8 semanas pi
<i>Toxocara cati</i>	H, G, HP	1-3 semanas	5-7 semanas p.i.
<i>Toxascaris leonina</i>	H, HP	1-3 semanas	8-10 semanas pi
<i>Ascaris suum</i>	H, HP	2-3 semanas	6-7 semanas pi
<i>Bailysascaris procyonis</i>	H, HP	2-5 semanas	7-10 semanas pi

H: huevos; G: galactógena; T: transplacentaria; HP: hospedadores paraténicos; pi: post-infección

1.1.3.- Zoonosis por ascáridos

El hombre puede ingerir de forma accidental huevos embrionados de ascáridos de animales, y aunque no llegue a completarse el ciclo, las larvas penetran a través del intestino y realizan una emigración somática y son englobadas en los tejidos, lo que puede dar lugar al síndrome de larva emigrante visceral (LVM) (Inatomi *et al.*, 1999; Hayashi *et al.*, 1999; Sakai *et al.*, 2006).

Este síndrome fue descrito por primera vez por Beaver *et al.* (1952) a consecuencia de la ingestión de huevos embrionados de *T. canis*; posteriormente ha sido diagnosticado en personas infectadas con huevos de *A. suum* (Phills *et al.*, 1972; Maruyama *et al.*, 1996; Sakakibara *et al.*, 2002; Peng *et al.*, 2007). Es importante tener en cuenta los casos ocasionados por *Baylisascaris procyonis*, el ascárido de los mapaches (Reed *et al.*, 2012), que puede provocar un síndrome de *larva migrans* cerebroespinal, que evoluciona la mayoría de las veces hacia un desenlace letal (Kazacos, 2001).

Hay que destacar que no resulta necesario el contacto directo entre personas y animales para transmitir la enfermedad, ya que los huevos de los ascáridos resisten la desecación y un amplio rango de variaciones de temperatura, pudiendo permanecer viables en el ambiente durante 3-5 años (Papajová *et al.*, 2008). Los niños pequeños están especialmente expuestos cuando juegan con tierra contaminada o cuando tienen contacto corporal estrecho con mascotas que llevan adheridas a su pelaje huevos infectivos. Wolfe y Wright (2004) encontraron huevos de *T. canis* en un 25% de muestras de pelo de perro, con un promedio de 3,3 huevos por gramo de pelo (con muestras de hasta 300 huevos, en parte embrionados, es decir infectivos).

En la región de Ahvaz (Irán), el 45% de muestras de heces de gatos callejeros recogidas de lugares de recreo públicos resultaron positivas a *Toxocara* spp. (Khademvatan *et al.*, 2013). En São Paulo (Brasil), los parques están contaminados con heces de perros y gatos, que en un 68,1% tienen huevos de *Toxocara* spp. (Marques *et al.*, 2013).

Se ha comprobado que las personas pueden adquirir la infección por *A. suum* al consumir alimentos contaminados por huevos, como por ejemplo hígado crudo de pollos o de terneros, que son hospedadores paraténicos de este parásito, o también vegetales frescos abonados con estiércol de cerdo (Permin *et al.*, 2000; Taira *et al.*, 2004). Al contrario de lo que sucede en otras explotaciones animales, en las de porcino las heces se recogen en balsas y no en estercoleros, de modo que al no sufrir fermentación este procedimiento asegura la viabilidad de los huevos de ascáridos cuando los ganaderos vacían las balsas. Juris *et al.* (1996) señalaron que los huevos de *A. suum* permanecen viables sin embrionar después de 42 días de ensilado.

En Dinamarca la infección causada por ascáridos es rara (2 casos / 10.000 habitantes / año), y afecta con mayor frecuencia a niños que viven o visitan zonas rurales (36 casos / 10.000 habitantes / año), porque han tenido la oportunidad de estar en contacto con cerdos o con su estiércol (Astrup y Prag, 2001). Es interesante tener en cuenta que en los países nórdicos la prevalencia media de infección de los cerdos por *A. suum* es del 21,5%, y aunque varía con el manejo, la higiene, edad de los cerdos y región geográfica, muy pocas granjas de cerdos están libres de la infección (Roepstorff *et al.*, 1999). En el Noroeste de España se ha demostrado un mayor porcentaje de sensibilización frente a antígenos de *A. suum* entre habitantes de zonas rurales (Sánchez-Andrade *et al.*, 2009).

En personas, la ingestión de huevos de *Toxocara*, *Toxascaris* y *Baylisascaris* se favorece en zonas urbanas y periurbanas, donde su presencia en parques, zonas de recreo, areneros o jardines puede convertirse en un grave problema de Salud Pública, especialmente entre los niños, por el hábito de geofagia (Murray y Kazacos, 2004; Sánchez-Andrade, 2008). Se ha denunciado que el 14% de la población de EEUU ha estado expuesta a *Toxocara*, y que cada año 70 personas pierden la vista por esta infección (Hotez *et al.*, 2014).

Según Gey (1998), en el estado federado de Hesse (centro de Alemania), un 71,4% de los mapaches salvajes están infectados por *Baylisascaris procyonis*, indicando asimismo que las infecciones también son frecuentes en los mapaches de los parques zoológicos, y en animales que se emplean en peletería.

1.2.- ANCYLOSTOMOSIS

Los ancylostómidos (gr. *anchylos*: gancho, y *stoma*: boca= boca con ganchos) son nematodos pertenecientes a la familia Ancylostomatidae. Los adultos se localizan en el intestino delgado de los hospedadores definitivos, y se diferencian fácilmente de los ascáridos por su tamaño (1-2 cm) y por su característica forma de gancho o garfio en la parte anterior del cuerpo (Quiroz Romero, 1999).

En los cánidos los más frecuentes son *Ancylostoma caninum*, *A. braziliense* y *Uncinaria stenocephala*, mientras que *A. tubaeforme*, *A. braziliense* y *U. stenocephala* infectan a gatos (Bowman, *et al.*, 2010; Gates y Nolan, 2009). Las especies de mayor importancia zoonótica son (Nash, 2005; Traversa, 2012):

- *A. caninum*: afecta a perros y otros cánidos (zorros, lobos, coyotes, etc.) en todo el mundo, y ocasionalmente a gatos y seres humanos, en especial en zonas con climatología tropical y templada. Se transmite por vía oral, por vía percutánea, transplacentaria y galactógena.
- *A. brasiliense*: se describe en perros y gatos, cánidos salvajes, y esporádicamente en personas de regiones tropicales y subtropicales de América y Asia.
- *U. stenocephala*: en perros, lobos, zorros y gatos de Europa, sobre todo Central y del Norte, y en casi toda América y Asia. Se distribuye por áreas de climatología templada-fría y se transmite por vía oral.

Existen otras especies de *Ancylostoma* que no son zoonóticas, como *A. tubaeforme*, que afecta específicamente a gatos en todo el mundo, y *A. ceylanicum*, en cánidos salvajes en Asia y regiones de América, y ocasionalmente a perros. Aunque se han realizado infecciones experimentales en perros y gatos, *A. duodenale* y *Necator americanus* afectan exclusivamente al hombre.

Estos parásitos intestinales se encuentran ampliamente distribuidos sobre todo los que afectan a la población canina. Los efectos patógenos están relacionados con la carga parasitaria y por eso son considerablemente mayores en lugares donde los perros no reciben ninguna atención. Estas infecciones representan un problema potencial de Salud Pública en diversas partes del mundo (Fernández y Cantó, 2002).

1.2.1.- Estadios de ancylostómidos en el ambiente

Los hospedadores definitivos albergan ancylostómidos adultos en el intestino, donde producen huevos en fase de mórula, de cubierta lisa, clara, incolora y elipsoidal (Fig. 4). Una hembra puede poner 20.000 huevos/día durante 3 años, que son expulsados con las heces al ambiente, y bajo condiciones favorables (humedad, temperatura, sombra) la L1 sale en 1-2 días. Los suelos arenosos, con bastante humedad y oxígeno, y a temperatura óptima de 23-30°C, ofrecen las condiciones idóneas para la eclosión de las L1, que se alimentan de bacterias, y mudan a L2 (ambas con esófago rabbitiforme).



Fig. 4.- Huevo de ancylostómido con mórula (izda.) (4x) y con L1 (centro). Larva 3 (dcha.) (4x).

Tras 5-10 días (y 2 mudas) las larvas se transforman en larva filariforme (L3), que son infectivas, no se alimentan y conservan la vaina de la L2. Las L3 pueden sobrevivir en el ambiente 3-4 semanas en condiciones favorables. En la Figura 5 se resumen las diferencias entre las larvas rabbitiformes y filariformes.

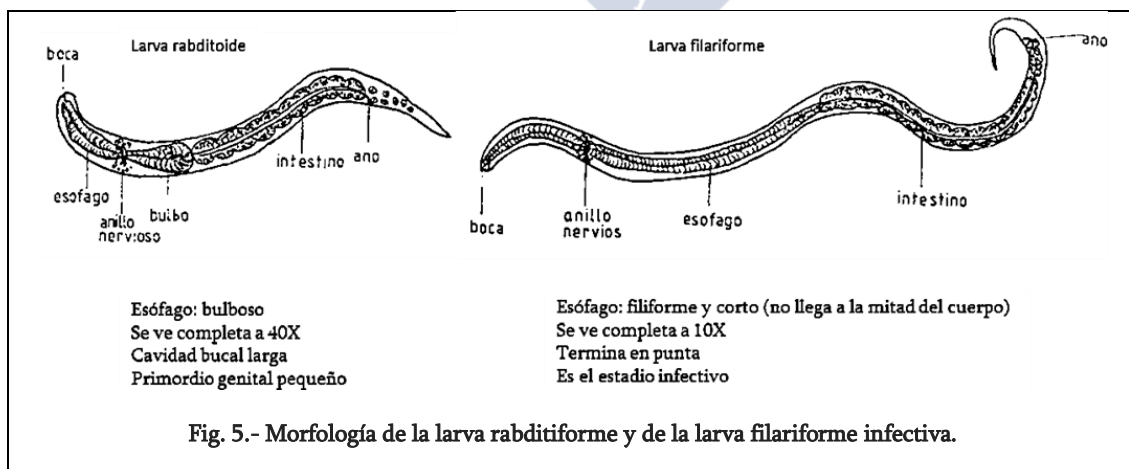


Fig. 5.- Morfología de la larva rabbitiforme y de la larva filariforme infectiva.

1.2.2.- Infección por ancylostómidos en animales

La infección de los hospedadores puede tener lugar de cinco formas diferentes: si tiene lugar por *vía oral* las larvas se transforman en adultos directamente en el intestino y el periodo de prepatencia es de 15-18 días en perros jóvenes, y 15-26 en perros adultos, en tanto que si la infección es por *vía percutánea* el periodo prepatente se prolonga porque las larvas que penetran a través de la piel o la mucosa oral alcanzan los vasos sanguíneos y son transportadas por la sangre hasta el corazón y los pulmones, y desde allí suben a los bronquios, tráquea y faringe, desde donde son deglutidas al intestino para transformarse en adultos (Quiroz Romero, 1999).

En los perros de más de tres meses, solamente una parte de las larvas se convierten en adultos, el resto se mantienen en estado de latencia como larvas somáticas en los tejidos del hospedador, y sirven como fuente de infección para los cachorros a través de la *vía mamaria* y posiblemente *transplacentaria*. También es posible la infección por *ingesta de hospedadores paraténicos* (roedores) que contienen larvas infectivas en estado de hipobiosis.

En los puntos de perforación dérmicos los animales suelen sufrir prurito intenso que puede durar semanas y dermatitis localizada autolimitante. Durante la fase de migración es frecuente que en animales con infecciones masivas, las larvas penetren en tejidos más profundos produciendo tos y neumonía.

Los adultos que viven en el intestino delgado segregan una sustancia anticoagulante que les permite alimentarse de la sangre del hospedador. Al cambiar de sitio, la herida que dejan sigue sangrando, las consiguientes hemorragias ocasionan anemia y diarrea sanguinolenta. Se calcula que la pérdida diaria debida a la infección por *Ancylostoma* puede llegar a ser de 0,8 mL de sangre, que en las infestaciones severas representa una pérdida de hierro de casi 10 mg, lo que puede ser grave e incluso mortal.

Los signos clínicos que aparecen suelen ser vómitos y diarrea negra, palidez de las mucosas, pelo desgreñado y seco, apatía. En animales jóvenes se perturba notablemente el crecimiento y el desarrollo.

A. caninum causa enteritis eosinofílica, cólicos, diarrea e hipereosinofilia circulante. Se pueden dar casos de peritonitis y obstrucción intestinal.

El ciclo de vida de *U. stenocephala* es similar al de los nematodos *A. caninum* y *A. brasiliense* excepto que la infección casi siempre se produce por *vía oral*.

1.2.3.- Zoonosis por ancylostómidos

La presencia y subsiguiente migración de larvas de ancylostómidos de diferentes animales en capas superficiales y profundas de la piel provoca el síndrome de *larva migrans cutánea* (LMC), una de las dermatosis zoonóticas más frecuentes en zonas tropicales y subtropicales (Veraldi *et al.*, 2013). Los principales agentes etiológicos en nuestro país son *A. caninum* y *A. braziliense*, el primero nematodo de cánidos y el segundo de cánidos y félidos. Con menor frecuencia se identifican, a nivel mundial, *A. tubaeforme*, *U. stenocephala* y *U. ceylanicum*. Además, en Asia se ha señalado la presencia de *A. ceylanicum*, parásito de perros y gatos, en el tracto gastrointestinal de humanos. (Nguí *et al.*, 2014).

Durante mucho tiempo se usaron los términos erupción progresiva y *larva migrans cutanea* como sinónimos, aunque finalmente se estableció que la erupción progresiva es un síntoma y *larva migrans cutánea*, un síndrome (Cames y Danis, 2004). El síntoma puede ser provocado por parásitos nematodos: *A. braziliense*, *A. caninum*, *Gnathostoma* sp., *Loa Loa*; ácaros como *Sarcoptes scabiei*, o larvas de moscas, como *Gasterophilus* spp. e *Hypoderma* spp. (James, 1947). El síndrome de *larva migrans cutánea*, por su parte, está causado únicamente por larvas de nematodos, principalmente *A. caninum*, *A. braziliense* y *U. stenocephala*, por lo que se relaciona el término con ancylostomas para evitar confusiones con las diversas patologías que pueden dar lugar a un cuadro de larva migratoria (Caumes y Danis, 2004; Heukelbach *et al.*, 2008; Feldmeier *et al.*, 2012). Desde hace muchos años se conoce la importancia etiológica de *A. brasiliense* con el síndrome de *larva migrans cutanea* y la relación del mismo con la presencia de heces de perros y gatos en terrenos con arena húmeda. Kirby-Smith (1926) describe la infección de una serie de personas que vivían en casas a la orilla de la playa y señala que aquellas que presentaban cientos de lesiones habían estado en contacto con la arena húmeda cuando estaban bañados de sudor mientras trabajaban.

Aunque posiblemente cualquier larva de nematodo sea capaz de atravesar la piel, realmente se considera que sólo las larvas infectivas de *A. braziliense*, *A. caninum* y *U. stenocephala* causan el síndrome de *larva migrans cutánea* (también conocido como enfermedad de los gusanos de la arena o erupción reptante). Las larvas de tercer estadio de *Ancylostoma* responden a las vibraciones del suelo y a las variaciones de temperatura para encontrar al hospedador (Heukelbach *et al.*, 2008).

Caminar descalzo en la arena es probablemente el factor de riesgo más importante pero el contacto de cualquier parte del cuerpo con ambiente contaminado puede provocar la infección (Fig. 6). Jelinek *et al.* (1994) y Tremblay *et al.* (2000) observaron una alta incidencia de la infección en personas que frecuentaban playas de América del Sur y Suráfrica.

La lesión visible que aparece en primer lugar es una formación eritematosa serpentiforme que sigue el curso recorrido por el parásito. Los túneles subcutáneos, de hasta 2 mm de ancho, que contienen un líquido seroso sobresalen ligeramente de la superficie de la piel, provocan un prurito más o menos intenso especialmente por la noche. Las reacciones cutáneas desaparecen habitualmente por si solas después de 2-8 semanas.

La gravedad y la persistencia de las lesiones están relacionadas, por lo menos en parte, con una hipersensibilidad por un contacto previo. Es excepcional que las larvas alcancen los pulmones y parece que en ningún caso los ancylostomas de los animales llegan a completar su desarrollo en el intestino de las personas.

En la actualidad, el síndrome de *larva migrans* cutánea que afecta a personas y está producido por *A. caninum* se considera una enfermedad emergente en nuestro medio debido al aumento de viajes a países endémicos de zonas tropicales y subtropicales (Fig. 6).

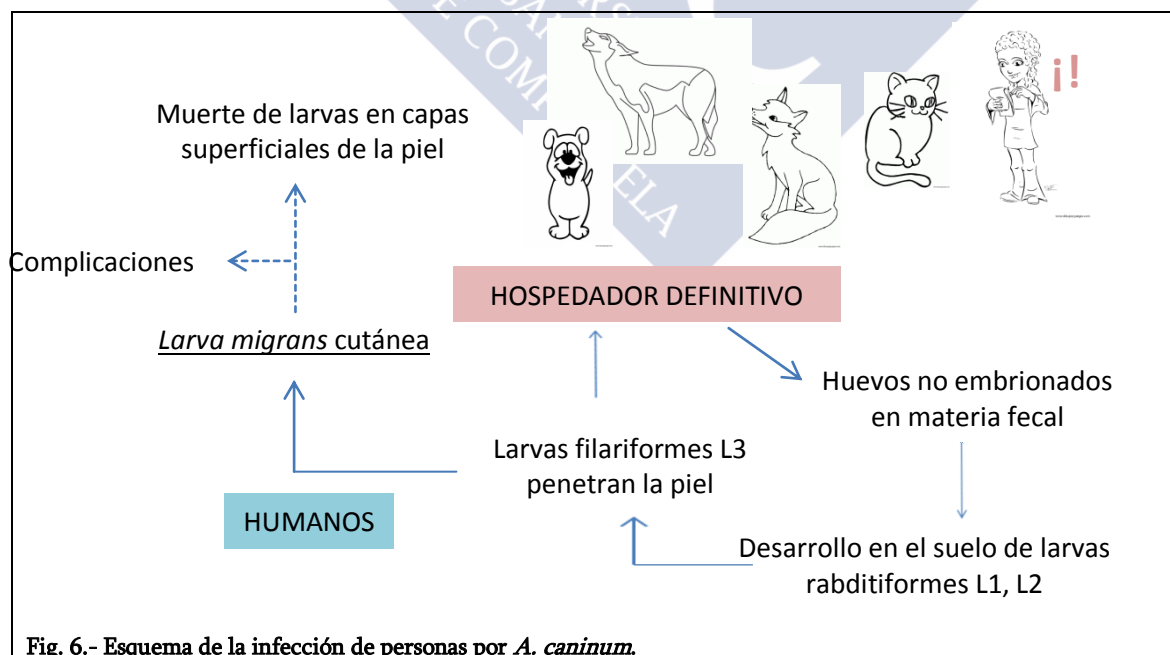


Fig. 6.- Esquema de la infección de personas por *A. caninum*.

1.3.- ZOONOSIS PARASITARIAS TRANSMITIDAS POR EL SUELO (ASCARIOSIS Y ANCYLOSTOMOSIS)

1.3.1. Patogenia

a) Ascáridos

A excepción de *Toxascaris leonina*, que desarrolla la totalidad de su ciclo endógeno en el intestino, sin producirse migración a través del hígado o pulmón, en los ascáridos se define una fase endógena caracterizada por el movimiento de las larvas a través del intestino, hígado, pulmón y regreso al intestino (Dado *et al.*, 2012).

Toxocariosis, ascariosis y baylisascariosis

El hombre puede ingerir de forma accidental huevos embrionados de *T. canis*, las larvas no completan el ciclo (no alcanzan el estado adulto) pero pueden penetrar a través del intestino y realizar una emigración somática (Humbert *et al.*, 1995), durante la cual son englobadas en los tejidos y provocan el síndrome de **larva emigrante visceral** (LEV) (Guay, 2001), o acantonarse en el ojo y causar el síndrome de **larva emigrante ocular** (LEO) (Schneider *et al.*, 2000).

Desde la década de los 80 se sabe que *T. canis* puede provocar irritaciones y manifestaciones alérgicas pulmonares (Zacharasiewicz *et al.*, 2000), pero también se han descrito otros cuadros clínicos de toxocariosis humana inespecíficos: neurológicos, oculares, pulmonares, cutáneos, reumatológicos y cardíacos (Zacharasiewicz *et al.*, 2000; Goffete *et al.*, 2000; Humbert *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 2000; Degouy *et al.*, 2001). En esta misma línea, se denomina *toxocariosis encubierta* a la presentación en pacientes cuyo diagnóstico serológico resulta positivo y que cursa con algunos síntomas locales y sistémicos, pero no en forma de *larva migrans* ni de toxocariosis ocular (Nathwani *et al.*, 1992). Magnaval *et al.* (2001) consideran que la forma encubierta aparece sólo en niños.

Al igual que sucede en la toxocariosis, se describen un síndrome de LEV provocado por *A. suum* (Inatomi *et al.*, 1999; Hayashi *et al.*, 1999). Escalante *et al.* (2005) señalan que la ascariosis intestinal está provocada por las formas adultas de *A. lumbricoides* mientras que la ascariosis pulmonar en las personas está relacionada con la ruptura de los capilares y de las paredes de los tabiques alveolares y puede ser producida por larvas de *A. lumbricoides* y de *A. suum*.

Baylisascaris procyonis es quizás uno de los ascáridos menos conocidos. Como se ha referido con anterioridad, los seres humanos se comportan como un hospedador paraténico, lo que significa que

se puede producir la infección por fases larvarias que nunca se van a desarrollar hasta adultos, y por este motivo no aparecen huevos en las heces.

La presentación clínica de baylisascariosis depende del número y la ubicación de las larvas en el organismo (Kazacos, 2000). Una semana post-infección aparecen signos y síntomas no específicos que incluyen náuseas, fiebre y letargo (Park *et al.*, 2000). Cuando se ingieren grandes cantidades de huevos embrionados, las larvas pueden ser más propensas a penetrar en el sistema nervioso central (alrededor del 5-7%), causando *larva migrans* neuronal, responsable con frecuencia de incapacidad permanente e incluso la muerte. En la infección por *Baylisascaris* se describe un cuadro de meningoencefalitis eosinofílica aguda en el que los signos y síntomas se pueden desarrollar dentro de 2 a 4 semanas después de la ingestión de grandes cantidades de huevos infectivos (Moertel *et al.*, 2001), e incluyen debilidad, incoordinación, ataxia, irritabilidad, debilidad, convulsiones, alteración del estado mental, estupor y coma (Okulewicz y Buńkowska, 2009).

Al igual que sucede en otras infecciones por ascáridos, la *larva migrans* ocular puede manifestarse como neurorretinitis difusa subaguda unilateral, fotofobia, retinitis o ceguera (típicamente unilateral). En el caso de *larva migrans* visceral se asocia a erupción macular, dolor abdominal, hepatomegalia y neumonía. Las larvas pueden causar reacciones inflamatorias en los órganos y daños en los tejidos (Murray y Kazacos, 2004).

Una característica diferencial de las larvas de *Baylisascaris* es su mayor tamaño, y que siguen creciendo en el hospedador paraténico, lo que provoca una intensa reacción y daños en el sistema nervioso central, corazón y otros órganos internos (Kazacos, 2001). La captura de hospedadores paraténicos como roedores, aves y pequeños mamíferos se ve facilitada precisamente cuando éstos están infectados por L2, debido a que las alteraciones provocadas en el SNC reducen sus posibilidades de escapar con rapidez ante depredadores (Page *et al.*, 2011).

b) *Ancylostómidos*

No existe completa unanimidad acerca de que en el hombre, los ancylostómidos que afectan a animales lleguen a completar las migraciones hemotisulares y alcancen el intestino. Sin embargo, cuando la gente camina o se sienta en la playa con arena o tierra donde perros o gatos infectados han defecado, las larvas de *Ancylostoma* pueden penetrar la piel de los pies o del resto del cuerpo y migrar en las capas superiores.

Las manifestaciones de la ancylostomosis zoonótica son el resultado de una reacción inflamatoria frente a las larvas que migran en la piel o, con menor frecuencia, en los tejidos más profundos, como pulmones, tracto intestinal o posiblemente el ojo. A diferencia de las infecciones en el hospedador definitivo, en el que las larvas pueden entrar en los tejidos, en los seres humanos las larvas no puede penetrar más allá de la dermis.

Las larvas penetran por la piel sin necesidad de que existan soluciones de continuidad, por los folículos pilosebáceos, y rara vez por las mucosas. Esta capacidad invasiva, de destrucción tisular y de degradación de las mucosas está mediada por la dotación de enzimas proteolíticas y de un factor de inhibición de la adhesión de los neutrófilos activados.



Fig. 7.- Larva migrans cutánea en el pie de un paciente en el transcurso de una semana. (Florida Departamento de Salud, Sección de Epidemiología de Duval).

Después de algunas horas tras la penetración, las larvas comienzan la migración intraepidérmica pero no penetran en la dermis por carecer de colagenasas, provocando de este modo el síndrome de *larva migrans* cutánea (LMC). Horas después de la penetración y coincidiendo con el punto de entrada de la larva aparece una pápula rojiza muy pruriginosa o una dermatitis inespecífica. Las lesiones presentan un aspecto eritematoso y son altamente pruriginosas, características por su aspecto serpenteante, color rojizo y lenta progresión, como se puede apreciar en la Figura 7.

El período de incubación de LMC suele ser corto, con signos y síntomas que se manifiestan varios días después de la penetración de las larvas de la piel. Sin embargo, en algunos casos la aparición de la enfermedad puede demorarse semanas o meses. El tiempo medio para el desarrollo de los síntomas en los brotes notificados de LCM varía de 10 a 15 días.

Se trata de una infección autolimitante que se resuelve habitualmente en unas semanas (20-80% de las larvas muere en el transcurso de 2-8 semanas), pero debido al prurito y la escoriación se complica con frecuencia por invasiones bacterianas secundarias (Gállego Berenguer, 1998). La

infección bacteriana se describe en el 8-24% de los casos, así como la dermatitis por contacto por automedicación con remedios tópicos (Richey *et al.*, 1996; Veraldi *et al.*, 2012).

Se pueden producir complicaciones como lesiones vesículo-ampollosas y edema. Más rara vez y cuando una gran cantidad de larvas penetran a través de los folículos pilosos, la parasitación puede afectar en forma de **foliculitis papular eosinofílica** de curso crónico, que no suele mostrar los típicos trayectos serpiginosos (Bowman *et al.*, 2010).

La eosinofilia puede estar presente y es más probable cuando se produce una penetración más profunda en el tejido. Se detecta eosinofilia en el 10-35% de los casos y elevación de la IgE sérica.

De manera esporádica la larva se puede diseminar por vía hematógena al pulmón dando lugar a un cuadro de neumonía eosinofílica con infiltrado pulmonar migratorio (**Síndrome de Loëffler**), posiblemente debido a una penetración más profunda de las larvas que alcanza los pulmones. Este síndrome es poco frecuente, ya que *Ancylostoma* spp. no penetra la dermis, y aunque la patogenia no está clara, se han encontrado larvas de *Ancylostoma* en el esputo de estos pacientes (Del Giudice *et al.*, 2002). Los autores discuten si podría tratarse de otro nematodo que cause ambas afecciones, ya que la mayoría de estos pacientes no eran nativos de los lugares endémicos (Hochedez *et al.*, 2007).

Los ancylostómidos del hombre (*Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus*) infectan al hombre cuando al estar con los pies o las manos sin protección, toma contacto con las larvas que atraviesan la piel, alcanzan la circulación sanguínea, llegan al corazón y de allí los pulmones; donde alcanzan la luz de los bronquios y ascienden hasta la tráquea y la faringe y son deglutidas para, finalmente transformarse en adultos que permanecen en el intestino delgado unidos a la mucosa intestinal por su cápsula bucal. Las hembras adultas producen miles de huevos al día. No existe transmisión persona a persona, pero un individuo infectado puede contaminar el suelo durante años si no recibe tratamiento. El periodo de incubación estimado oscila de 2 días a 2 años.

Otros cuadros clínicos menos frecuentes son la **enteritis eosinofílica** por la penetración de la larva en la mucosa intestinal, con dolor abdominal agudo, náuseas, anorexia y diarrea. En raras ocasiones, la enteritis eosinofílica se ha asociado con infecciones por *A. caninum*, probablemente

debido al consumo accidental de larvas infectivas que pueden penetrar la mucosa intestinal en un intento de continuar la migración. El proceso inflamatorio se debe a la actividad alérgica producida por antígenos secretados por el parásito (Botero, 1998). Excepcionalmente puede haber ulceración del íleon terminal y colón, lo que supone una urgencia quirúrgica.

A. caninum se ha descrito como parásito intestinal humano en pacientes con enteritis eosinofílica, cólicos, diarrea e hipereosinofilia circulante. Algunos pacientes presentaron cuadros de peritonitis y obstrucción intestinal, y mediante colonoscopia o cirugía se encontraron los parásitos adultos fijados a la mucosa del yeyuno (Croese *et al.*, 1996).

También poco frecuentes son la opacidad de la córnea, la *larva migrans* ocular y la retinitis subaguda unilateral difusa (DUSN) y la presencia de larvas en mucosa oral o tejido muscular generando miositis localizada (Bowman *et al.*, 2010).

***Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus* son parásitos exclusivos del hombre**, aunque se han producido infecciones experimentales por *A. duodenale* en el perro y el gato.

1.3.2. Distribución de ascáridos y ancylostómidos

En un estudio realizado en España se comprobó que los nematodos intestinales que parasitan al perro con mayor frecuencia son *T. canis*, ancylostómidos y *Toxascaris leonina* (Miró *et al.*, 1995). De estos, *T. canis* y *A. caninum* cuentan con un mayor potencial zoonótico y representan un problema de salud pública.

La contaminación de espacios de recreo con huevos embrionados de *Toxocara* parece ser para Lalosević *et al.* (2001) el indicador más directo del riesgo de LEV humana. Van Knapen *et al.* (1992) propusieron evitar la fertilización de los parques públicos con abonos orgánicos, porque existe la posibilidad de vehicular formas parasitarias que resisten procesos de depuración y de compostaje (Pegg *et al.*, 1971; Black *et al.*, 1982; Thomaz-Soccol *et al.*, 1999).

Mediante análisis de tierra de jardines y parques públicos se ha demostrado la presencia de huevos de ascáridos, en muchos casos ya embrionados. En más del 50% de parques públicos de Madrid, Angulo-Madero *et al.* (1987) comprobaron la presencia de huevos de ascáridos caninos. Asimismo, en el 3,7%, de los parques de la ciudad de Salamanca se encontraron huevos de *T. canis*, porcentaje

que se elevó al 9% en poblaciones rurales de la misma provincia (Conde García *et al.*, 1989). Toledo *et al.* (1994) observaron que el 28% de las muestras de suelo de parques de Tenerife contenían huevos de *T. canis*, y que el 85,2% de los lugares de recreo estaban contaminados por distintas formas parásitas, destacando la presencia de huevos de *T. canis* en el 37% de las muestras.

Los huevos de *A. suum* resisten la desecación y un amplio rango de variaciones de temperatura, por lo que permanecen viables en el ambiente durante mucho tiempo (Bergstrom y Langeland, 1981). El riesgo de exposición humana a los huevos de *A. suum* depende de la carga parasitaria en las explotaciones porcinas y del almacenamiento, tratamiento y eliminación del estiércol. De acuerdo con el USDA (United States Department of Agriculture), cuando el estiércol de cerdo simplemente se almacena en pozos subterráneos, a las 4 semanas el 80% de los huevos de *A. suum* son viables, el 40% a las 8 semanas, y el 0% a las 16 semanas (Gaasenbeek y Borgsteede, 1998). En condiciones anaeróbicas de almacenamiento, el 80% de los huevos resultan infectivos después de 21 días (Juris *et al.*, 1996). El ensilado de estiércol de cerdo no presenta tampoco ventajas especiales, ya que aproximadamente el 70% de los huevos de *A. suum* permanecen viables después de 56 días de tratamiento (Caballero-Hernández *et al.*, 2004).

Gaasenbeek y Borgsteede (1998) valoraron la viabilidad de los huevos al extender el estiércol de los cerdos sobre tierra, el estudio se realizó en parcelas al aire libre con diversas condiciones de sol y lluvia simulada. La supervivencia de los huevos fue mayor en las parcelas húmedas y sombreadas, con al menos el 90% de los huevos viables a las 8 semanas. Al secarse las parcelas por la acción directa del sol, la viabilidad disminuyó hasta el 10% entre las 2 y 8 semanas. Por el contrario, al aumentar la humedad relativa del 77,5 a 100% se incrementó la supervivencia de los huevos.

Ancylostoma spp. también se ha encontrado en muestras de suelos en todo el mundo. Se encuentra en lugares públicos y privados, como parques infantiles, areneros, aceras, calles, jardines y campos. Por otro lado, la bibliografía destaca que las larvas y huevos de estos parásitos gastrointestinales se encuentran frecuentemente en las muestras de arena (Mercado *et al.*, 2004; Paquetdurand *et al.*, 2007). Así, en relación con este hecho, Guimarães *et al.* (2005) señalaron que en varias ciudades de Brasil con una considerable población canina que circula por las calles y plazas públicas, donde a menudo sus hábitos de defecación contaminan el suelo con varios tipos y formas parasitarias potencialmente zoonóticas. Estos autores observaron la presencia de huevos de *Toxocara* spp. y huevos o larvas de *Ancylostoma* spp. en el 69,6% de las muestras de suelo tomadas de parques públicos. Además detectaron que las muestras de arena de las escuelas o jardines de infancia sólo

presentaban larvas de *Ancylostoma* spp. En un trabajo reciente (Silva *et al.*, 2009) demostraron la contaminación de la arena en las playas del sureste del estado de Pernambuco por larvas de *Ancylostoma* spp.

La prevalencia de las distintas especies de ancylostómidos varía en función del clima, del uso profiláctico de antihelmínticos y del contacto con animales silvestres y medios contaminados, existiendo fuertes variaciones en los estudios realizados, en los cuales se establecen rangos de prevalencia del 0,9-100% en perros, y del 0,2-91% en gatos (Scott Weese *et al.*, 2011).

La prevalencia en perros en algunos países es elevada. En Uruguay se ha encontrado *A. brasiliense* en el 49% y *A. caninum* en el 96% de 80 perros a los que se realizó autopsia (Malgor *et al.*, 1996). En Argentina (Minvielle *et al.*, 1993) realizaron un estudio de la contaminación con helmintos de materia fecal canina en la ciudad de La Plata. Sin embargo, en ese estudio encontraron que un 73% de las muestras de paseos públicos contenían huevos de helmintos potencialmente transmisibles al hombre (Taranto *et al.*, 2000).

En México, varias publicaciones de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (UNAM), señalan que *A. caninum* es uno de los contaminantes de origen parasitario más frecuentes en parques y jardines, y principal agente etiológico de la enfermedad; *A. brasiliense*, es identificado ocasionalmente (García Reyna, 2006).

En un estudio reciente llevado a cabo recogiendo heces de perros en áreas recreativas de la provincia de Lugo (Galicia, España), se comprobó un claro predominio de las infecciones por nematodos (83,7%) (Íñiguez-Rodríguez, 2015). Se identificaron huevos de *A. caninum* (24,6%), *T. canis* (7,2%), *U. stenocephala* (4,6%) y *T. leonina* (0,2%). Debido a esta contaminación ambiental, es importante que los propietarios tengan conciencia del riesgo que supone, sobre todo para los niños, que no recojan las excretas de sus mascotas.

En parques públicos de Madrid (Dado *et al.*, 2012), se detectó que el 40% estaban contaminados por parásitos gastrointestinales entre los cuales se encontraron *Toxocara* spp. en el 16% de las muestras positivas y ancylostómidos en el 3%. Estos hallazgos coinciden con los descritos en parques públicos de Córdoba (17%) (Martínez-Moreno *et al.*, 2007), y son inferiores a los

denunciados en otros países como Italia (50-63%) (Habluetzel *et al.*, 2003), Venezuela (55%) (Devera *et al.*, 2008) o Argentina (56-68%) (Córdoba *et al.*, 2002). Para Mizgajska-Wiktor y Uga (2006) la contaminación por huevos de parásitos zoonóticos como *Toxocara* spp. ocurre a nivel mundial, independientemente del nivel socioeconómico, y existe una clara relación entre el grado de contaminación del suelo con huevos de *Toxocara* spp. y la prevalencia de la toxocariosis en personas.

La ancylostomosis es una patología muy frecuente en zonas tropicales y subtropicales en vías de desarrollo, con climas cálidos y húmedos donde las condiciones de temperatura y humedad del suelo resultan adecuadas para el desarrollo del ciclo externo del parásito (Soulsby, 1982; Gomes *et al.*, 2004). Tiene distribución cosmopolita y mundial, pero predomina en las que se cumplen las condiciones necesarias para el desarrollo del parásito como en el Caribe, México (Caribe mexicano, Tamaulipas, Veracruz, Yucatán, Tabasco y Guerrero), Brasil, Venezuela, Colombia, Jamaica, Barbados y varios países asiáticos como Corea, Tailandia e India y africanos como Senegal. La población más susceptible son niños, viajeros procedentes de estas zonas, nadadores y trabajadores cuya actividad implica el contacto de la piel con tierra contaminada (Fig. 8). Playas, parques y casas con múltiples gatos y perros son lugares propicios para adquirir la enfermedad, de hecho se han descrito brotes familiares por convivencia con mascotas no desparasitadas. Este entorno sirve como lugar de ocio, por lo que representa riesgos para los animales y la salud humana (Scholler *et al.*, 1999; Maikai *et al.*, 2008). Los casos autóctonos en Europa y Estados Unidos de América son escasos. En un estudio realizado en Brasil se consideró la posibilidad de que la parasitosis sea más frecuente en las personas nativas de áreas geográficas desprotegidas, endémicas, que suelen coincidir con altas frecuencias de *Ancylostoma* spp. en perros. (Heukelbach *et al.*, 2004). Los microhábitats apropiados se encuentran en zonas costeras con presencia habitual de perros, lo que ocasiona que los turistas estén en riesgo de adquirir la enfermedad al caminar con los pies descalzos o tomar el sol en las playas (50% de los casos). También existen denuncias de infección por fómites (ropa o toallas contaminadas) y al manipular flores contaminadas con tierra que contenía larvas infectantes (Heukelbach *et al.*, 2009). Asimismo se considera en riesgo a los niños, debido a sus hábitos de juego, a jardineros y otros sujetos que se encuentren expuestos a suelos apropiados con materia fecal de perro disuelta e invisible.



Fig. 8.- Playa tropical (área de riesgo de contagio por ancylostómidos) con niños andando por la playa (población de gran riesgo de contagio).

La enfermedad puede aparecer como pequeñas epidemias o esporádicamente, pero también es una dermatosis de turistas de países industrializados que visitan países endémicos (Heukelbach *et al.*, 2008). Los viajeros ocupan los principales casos en países en desarrollo y de climas fríos; raramente se reportan casos autóctonos. De todas las enfermedades que contraen los turistas, la *larva migrans* representa 2-25%, según el lugar que visiten, el tiempo y la exposición. Los lugares donde se han contagiado son, en orden descendiente, el Caribe, el sureste de Asia, América Central y Suramérica (Feldmeier y Schuster, 2012; Gautret *et al.*, 2012; Herbingner *et al.*, 2012). Se detectó en el 12,7% de viajeros españoles, especialmente por viajes turísticos a Brasil (Ramírez-Olivencia *et al.*, 2009) y en viajeros israelíes un 15,3%, también relacionado con viajes a Brasil (Solomon *et al.*, 2011). En Alemania, Francia, Inglaterra, Nueva Zelanda, Australia y Estados Unidos se han detectado casos esporádicos, sin antecedentes de viajes, con manifestaciones clínicas atípicas, y contagiados por otros animales, por ejemplo, zarigüeyas en Australia (Black *et al.*, 2010; Feldmeier y Schuster, 2012).

En Brasil se ha señalado en el 15% de los niños durante la temporada de lluvias; se estipuló que el riesgo de contagio durante la temporada de lluvias es 15 veces mayor que en las estaciones secas (Feldmeier y Schuster, 2012). En ese país, la incidencia mensual es de 310 casos por cada 10.000 habitantes en la temporada de lluvias (Heukelbach *et al.*, 2003). En personas devotas del templo Nallur, en Sri Lanka, se ha descrito hasta en el 58,2%. El ritual que estas personas realizan incluye reposar sin ropa y sin zapatos sobre el piso arenoso del templo hasta 25 días (Kannathasan *et al.*, 2012).

Evidentemente, las deficiencias en el control de estas parasitosis y otras enfermedades zoonóticas dependen de la falta de cultura en el país sobre el cuidado responsable de millones de animales de compañía, y la carencia de medidas apropiadas para informar a la población y a profesionales de la salud. Aunque se desconoce el número de animales en condiciones de calle (redefinidos por la Organización Panamericana de la Salud en 1994, como *perro de dueño irresponsable* – no *perro callejero*), una estimación de la Secretaría de Salud maneja cifras de alrededor de 22 millones de perros en México, de los cuales aproximadamente la mitad vive en la calle, con una producción de materia fecal que varía entre 500 y 700 kg / día tan sólo en la Ciudad de México.

La prevalencia de *A. caninum* en Colombia fue de 21 a 23% en dos encuestas de morbilidad de 1966 y 1980. La primera mostró que los habitantes de zonas rurales estaban 6 veces más parasitados que los de las ciudades, y que en lugares con población de buen nivel socioeconómico la prevalencia era del 10% o inferior. En todos los grupos las infecciones leves, con menos de 2.600 HPG (huevos por gramo de heces) fueron el 90%. Otros países de América Latina tienen prevalencias similares y se han publicado frecuencias más altas en El Salvador (50%), Venezuela (40%) y Ecuador (33%) (Botero 1998).



1.4. CONTROL Y PREVENCIÓN DE ZONOSIS

La emergencia de nuevas zoonosis es un fenómeno universal y complejo. Las estrechas relaciones de interdependencia entre los hombres, los animales y los productos de origen animal, así como incontables factores que influyen en estas relaciones, han terminado por converger y crear un medio propicio para la aparición de nuevos agentes zoonóticos. Se estima que las zoonosis representan aproximadamente el 58% de todas las enfermedades infecciosas en los seres humanos, y su incremento está vinculado a cambios en el uso del suelo y de los recursos naturales (Woolhouse y Gowtage-Sequeria, 2005).

El hombre ha alterado ecosistemas, bien porque los utiliza para nuevas construcciones o porque cambia el uso de la tierra, lo que ha provocado la desaparición de especies autóctonas animales y vegetales, en tanto que las que han conseguido adaptarse a estos nuevos entornos han experimentado cambios en sus hábitos de comportamiento. DeStefano y DeGraaf (2003) señalan que en muchos estados de EEUU, las colonias de mofetas se han adaptado perfectamente a las zonas periurbanas y a menudo son fuente de conflictos humanos-vida silvestre que se caracterizan por molestias, daños a la propiedad y transmisión de enfermedades. Todos estos aspectos llevan a reflexionar acerca de incluir en las actuales iniciativas de Salud Pública la educación de profesionales de la salud veterinaria y humana (Wise *et al.*, 2005).

Algunos animales de esta fauna silvestre que se han adaptado a una cierta convivencia con los humanos facilitan la aparición de zoonosis (Kahn, 2006), de lo que se concluye que para el control y la prevención de estas infecciones es necesario plantear un enfoque multidisciplinar teniendo en cuenta factores ecológicos y manteniendo una estrecha colaboración entre médicos y veterinarios (Thompson *et al.*, 2009).

Después de realizar el diagnóstico de la enfermedad, es tan importante el tratamiento de los pacientes humanos como el tratamiento de los reservorios para romper la cadena infecciosa. Es necesario subrayar la importancia del tratamiento y las restantes medidas para la protección del hombre y animales, sobre todo cuando el pronóstico es desfavorable (Despommier, 2003).

Un punto clave reside en la información de la población, por ejemplo en lo inadecuado de proporcionar alimento a los animales silvestres, procurar que no tengan acceso a basura, restos de comida, etc. Un comité de expertos de la OMS (Informe 682, 1982) estableció unas reglas básicas para luchar frente a las zoonosis:

- **Prevención.** Todas aquellas medidas encaminadas a lograr la inmediata protección del hombre y animales frente a otras transmisiones.
- **Control.** Consiste en un gradual bloqueo de las fuentes de transmisión y en la eliminación progresiva de los reservorios de los agentes patógenos.
- **Erradicación.** Saneamiento definitivo de los lugares afectados.
- Implementación de un **sistema de información y vigilancia epidemiológica.**
- **Educación para la salud.**

Más concretamente, para la prevención de zoonosis en el hombre indicaron que han de tenerse en cuenta principalmente:

- El **control** de la infección en los animales, ya que estos constituyen sus hospedadores naturales, reservorios y fuentes de infección.
- **Higiene de los alimentos.**
- **Prácticas de inmunización.**
- **Saneamiento ambiental** con el consiguiente control de los reservorios, como roedores y aves silvestres, y de los vectores como artrópodos.

A pesar de la aplicación de estas medidas de Salud Pública y salubridad se ha observado que los patógenos pueden re-emerger si las circunstancias son favorables (Morse, 2004).

1.4.1.- Control de zoonosis por ascáridos

Al igual que sucede en otras enfermedades parasitarias, el control de las zoonosis por ascáridos ha de incluir la acción sobre los patógenos en los hospedadores definitivos, y sobre las formas que se encuentran en el medio (formas de vida libre). Desde el punto de vista zoonótico, no tiene sentido denominar la intervención sobre las personas como *control*, sino que es más adecuado definirlo como *tratamiento/curación*, puesto que los seres humanos se intercalan en el ciclo de los ascáridos de forma accidental, y no transmiten estas parasitosis.

En el caso de las helmintozoonosis, hasta la fecha son escasos los procedimientos planteados. Es interesante destacar la idea planteada por Uga y Kataoka (1995) en Japón, que consistía en cubrir con lonas de plástico las zonas arenosas de los parques públicos con acceso para perros. De este modo se pretendía evitar que las mascotas defecasen durante la noche en estas áreas, reduciendo el riesgo de eliminación de huevos de parásitos, al tiempo que la colocación de la lona produciría un incremento de la temperatura de las capas superficiales del suelo, reduciendo la viabilidad de las formas parasitarias.

La presencia de gatos en la calle es habitual en las ciudades. Son de origen doméstico, abandonados o de descendencia salvaje, sin ningún control. Estos animales se encuentran en un estado sanitario deficiente y se reproducen con mucha facilidad ya que suelen estar bien alimentados gracias a ciudadanos que les dan restos de comida.

En muchas zonas, las colonias de gatos callejeros suponen un auténtico problema de Salud Pública. El procedimiento de capturar-esterilizar-liberar llevado a cabo por veterinarios garantiza la calidad asistencial tal y como prevé la ley, y es hasta ahora el único método eficaz para controlar el crecimiento de la población de gatos callejeros.

Para el control de las infecciones parasitarias prácticamente la única medida que se adopta es la eliminación de las formas que se encuentran en el hospedador mediante tratamientos convencionales y en menor medida con el uso de plantas medicinales o homeopatía (Cabaret *et al.*, 2002). En los últimos años se trabaja con procedimientos de control biológico que permiten eliminar las formas parasitarias que se encuentran en el ambiente, los éxitos obtenidos, la mayoría en trabajos de laboratorio, animan a proseguir en esta dirección.

a) Transmitidas por hospedadores domésticos

Existe un gran número de antiparasitarios con acción frente a los ascáridos (Tabla 2). En principio se emplearon las sales de piperazina en mascotas, pero actualmente las lactonas macrocíclicas como ivermectina, selamectina o milbemicina se administran con mayor frecuencia.

Tabla 2.- Principales antiparasitarios de uso veterinario frente a ascáridos.	
Principio activo	Especie animal
Sales de piperazina	Mascotas / Animales de renta
Milbemicina	Mascotas
Selamectina	Mascotas
Imidacloprid/moxidectina	Mascotas
Pirantel / praziquantel	Mascotas / Animales de renta
Emodepsida/praziquantel	Mascotas / Animales de renta
Ivermectina	Mascotas / Animales de renta
Praziquantel	Mascotas
Fenbendazol	Suidos / Équidos

Al considerar el tratamiento de los hospedadores definitivos, conviene recordar que en los cánidos las larvas de *Toxocara canis* pueden enquistarse en tejidos, glándulas mamarias, etc., y resultan muy difíciles de eliminar, y con ello prevenir la transmisión a su descendencia. Se requiere el

aislamiento de los animales y el tratamiento repetido de las madres a través de múltiples generaciones para prevenir la reinfección, reducir y finalmente eliminar las larvas en los tejidos. Resulta evidente que estas medidas no son de fácil aplicación en las explotaciones de suidos, por lo que convendría poner énfasis en la educación/formación de los cuidadores respecto al manejo del estiércol, empleo de guantes, etc., y también es esencial el control de roedores debido a su papel como hospedadores paraténicos.

b) Transmitidas por hospedadores silvestres

Constituye un procedimiento mucho más complicado que en los animales domésticos. Se han diseñado estrategias de colocación de cebos que han proporcionado resultados muy satisfactorios en coyotes y zorros frente a la rabia (Sidwa *et al.*, 2005) y el cestodo *Echinococcus multilocularis* (Bait-tek, Orange, TX, EEUU) (Hegglin y Deplazes, 2004). Con idéntico objetivo, se han empleado también para controlar la infección por *Baylisascaris procyonis* en mapaches, junto con la retirada de los focos donde estos animales acostumbran defecar (denominados *letrinas*) y el control de roedores (Roussere *et al.*, 2003).

Los cebos se componen de harina de pescado y pamoato de pirantel (Strongid®, Pfizer, New York, NY, USA) a la dosis de 3 mg / 0,454 Kg p.v. disuelta en una mezcla de 1,83 g de crema de malvaviscos (Kroger, Cincinnati, OH, EEUU) y 0,135 mL de agua nanopura. La suspensión de pamoato de pirantel en la harina de pescado se sella con cera de parafina. El coste aproximado de cada cebo se estimó en 0,5\$, y es posible preparar cerca de 100 / hora (Page *et al.*, 2011).

Las letrinas de los mapaches se encuentran comúnmente cerca de los hogares (Page *et al.*, 2009), en el jardín (en la base de los árboles, a lo largo de las vallas), garajes, tejados o incluso en los áticos (Murray y Kazacos, 2004). La aplicación de estrategias con cebos, en conjunción con el tratamiento de terrenos en los que se encuentran estos animales, podría reducir el riesgo de transmisión a propiedades privadas cercanas.

Sin embargo, si parece complicado aplicar medidas sobre el medio en el que se manejan los animales domésticos para reducir la presencia de huevos con L2, lo es más cuando se trata de animales silvestres. Teniendo en cuenta la resistencia de los huevos de *B. procyonis*, se señalan medidas como la retirada manual de las letrinas, seguido de esterilización del suelo con una llama hasta lograr que se ponga incandescente (Page *et al.*, 2011). No se ha de olvidar el control sobre los roedores, mencionado anteriormente, puesto que los mapaches adultos se infectan al ingerir hospedadores paraténicos con L2 (Murray y Kazacos, 2004).

1.4.2.- Control de zoonosis por ancylostómidos

Debido a que caminar descalzo en la arena es el principal tipo de transmisión, la mejor manera de prevenir esta dermatosis es concienciar a la población sobre el uso de calzado. Evitar el contacto de la piel con arena o tierra utilizando colchonetas protectoras u otras cubiertas al acostarse en la playa y preferir playas que estén bañadas por la marea a playas secas, ya que de esta manera las heces son eliminadas. Una medida eficaz es advertir con señales a los turistas en destinos con climas tropicales y subtropicales y mantener lejos de las playas y zonas de recreo a perros y gatos (Caumes, 2000).

La atención veterinaria rutinaria para las mascotas, incluyendo desparasitación regular con antihelmínticos a perros y gatos a partir de la cuarta semana de vida es otra medida preventiva altamente eficaz, que reducirá la contaminación ambiental con huevos y larvas de ancylostómidos zoonóticos. Es necesario reforzar las medidas higiénicas en la eliminación sistemática de las excretas de animales para evitar la embrionación de los huevos. También se recomienda emplear larvicidas en suelos contaminados.

a) Transmitidas por hospedadores domésticos

Como antiparasitarios frente a ancylostómidos y otros nematodos se usan sobre todo antihelmínticos de amplio espectro como los benzimidazoles (p.ej. albendazol, febantel, fenbendazol), el levamisol, los endectocidas (p.ej. ivermectina, milbemicina oxima, moxidectina, selamectina) y la emodepsida.

Las tetrahidropirimidinas (pirantel, morantel) tienen un espectro menor pero también son eficaces contra estos nematodos.

Algunos de estos compuestos no son eficaces contra las larvas migratorias. Por ello, a menudo se recomienda repetir el tratamiento a las 2 a 4 semanas, pues se supone que en ese tiempo la mayoría de las larvas en latencia se habrán reactivado y vuelto susceptibles al antihelmíntico.

Los fármacos más frecuentemente utilizados son los siguientes:

Pamoato de pirantel: es eficaz (95%) contra los ancylostomas y ascáridos de los perros en dosis única de 5 mg / kg de peso vivo. En los cachorros, la eficacia es variable de modo que se

recomienda una dosis más elevada (15 mg / kg) después de una comida ligera. Los cachorros se pueden tratar mientras maman (p.e.: cuando tiene 2, 4, 6 y 8 semanas de edad) para tratar los parásitos adquiridos prenatal o lactogénicamente.

Febantel: es un antihelmíntico de amplio espectro y está autorizado para el uso contra *A. caninum*. La dosis recomendada es de 10 mg / kg diarios por 3 días seguidos. El febantel también se asocia con el praziquantel (5 mg) y con pamoato de pirantel (5 mg) para ampliar el espectro con el fin de incluir también a los cestodos.

Levamisol: El tratamiento por vía oral con 10 mg / kg / día por 2 días elimina el 95% de *A. caninum*, o inyectable con una dosis de 5.5 mg/kg / día, repetir a los 15 días.

Ivermectina: la administración SC de 0.2 mg / kg sólo tiene una eficacia del 69%, mientras que la administración por vía oral de la misma dosis mejora la eficacia hasta en más del 90%. Se puede conseguir una reducción espectacular (aproximadamente del 100%) de la transmisión prenatal y transmamaria de *A. caninum* en las perras que crían tratando a la madre 10 días antes y 10 días después del parto con 0.5 mg / kg de ivermectina.

En infecciones intensas por *Ancylostoma*, se requiere además una terapia sintomática complementaria, a base de hierro, en su caso transfusión sanguínea, restablecimiento del equilibrio electrolítico y la hidratación, vitaminoterapia y dietas ricas en nutrientes (Cordero del Campillo, 1999).

1.5. ALTERNATIVAS AL CONTROL DE HELMINTOZOONOSIS: CONTROL BIOLÓGICO

Son realmente escasas las experiencias en las que no se recurre al control de parásitos mediante el tratamiento con antihelmínticos. Básicamente se podrían resumir en el empleo de algunas plantas medicinales con actividad antihelmíntica, y más recientemente, de hongos del suelo con actividad ovicida. Conviene tener en cuenta que las plantas se administran a los hospedadores definitivos, por lo que no resuelven el problema de la presencia de formas infectivas en el medio, aspecto que sí cubrirían los hongos.

Cabaret *et al.* (2002) señalan que la medicina homeopática tiene un éxito limitado en el control de helmintos que afectan a animales que se mantienen en granjas ecológicas aunque esta terapia mejora la respuesta inmunitaria del hospedador y le ayuda a soportar mejor la infección.

1.5.1.- Plantas medicinales

La eficacia antiparasitaria de muchas de las plantas sólo se ha evaluado en laboratorio (*in vitro*). La ausencia de estudios *in vivo* impide conocer qué dosis y en qué forma han de administrarse para que sean eficaces en el campo, y por ello, de casi ninguna se puede afirmar nada sobre su posible utilidad real para el control de parásitos.

Tampoco se conoce la seguridad de estos productos, en especial la tolerancia de los animales, efectos secundarios, posibles residuos en carne y leche, contraindicaciones, interacciones, etc. Pese a que en algunos países hay productos comerciales basados en infusiones o extractos de plantas empleadas en la fitoterapia humana o de mascotas, en el ganado harían falta kilos o quintales y probablemente su costo sería del todo prohibitivo. De hecho, en la mayoría de los países no hay prácticamente ningún producto para el ganado basado en tales plantas medicinales.

Otro aspecto a considerar es que muchos estudios se refieren a plantas propias de una región que no crecen en otras, o que no se cultivan por falta de mercado. De algunas plantas se han extraído compuestos químicos que poseen eficacia antihelmíntica en pruebas realizadas *in vitro* y en animales de laboratorio. Por ahora no han surgido antihelmínticos comerciales basados en dichos compuestos, y si surgieran, no se trataría ya propiamente de plantas medicinales sino de antiparasitarios más o menos clásicos, como el caso de la ivermectina y otros endectocidas que también tienen su origen en productos naturales.

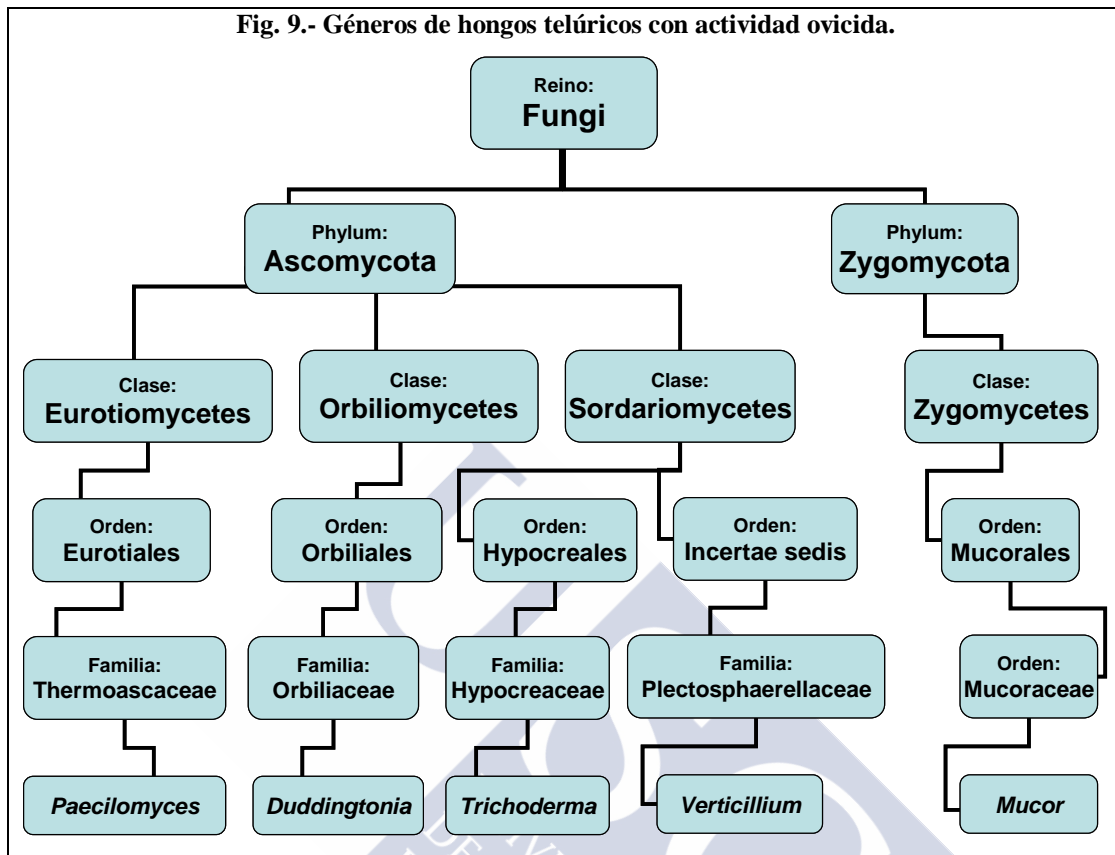
En la Tabla 3 se recogen algunas de las plantas más conocidas con actividad antiparasitaria frente a parásitos adultos. Sólo el ajo común (*Allium sativum*) tiene actividad inhibitoria sobre la eclosión de huevos de parásitos.

Especie vegetal	Grupo parasitario
<i>Juniperus communis</i>	Trematodos
<i>Gynandropsis gynandra</i> (platanito)	
<i>Moghania (=Flemingia) vestita</i>	
<i>Piper longum</i>	
<i>Gynandropsis gynandra</i> (platanito)	Cestodos
<i>Melia azedarach</i>	
<i>Moghania (=Flemingia) vestita</i>	
<i>Allium sativum</i> (ajo común)	Ascáridos
<i>Butea monosperma</i>	
<i>Piper longum</i>	
<i>Artemisia vulgaris</i> (altamisa)	Nematodos gastrointestinales (estrongilados)
<i>Azadirachta indica</i>	
<i>Bursera copallifera</i>	
<i>Caesalpinia crista</i>	
<i>Chenopodium album</i>	
<i>Chenopodium anthelminticum</i>	
<i>Calotropis procera</i>	
<i>Cucurbita maxima</i> (calabaza)	
<i>Manihot esculenta</i> (yuca, mandioca)	
<i>Monarda fistulosa</i>	

1.5.2.- Hongos parasitoidas

Los hongos son organismos eucariotas sin cloroplastos, con nutrición heterótrofa, que realizan la digestión externa de los nutrientes secretando enzimas y absorbiendo después las moléculas resultantes. La mayoría de las especies fúngicas del suelo son saprofitas y cumplen un papel muy importante al descomponer materia orgánica muerta, limpiar la superficie terrestre y proporcionar alimento para otros seres vivos.

Gilman (1957) inventarió 617 especies de hongos aisladas del suelo. En la Figura 9 se clasifican algunas de las especies más conocidas.



En trabajos previos desarrollados en España se ha indicado la presencia de hongos con actividad parasitica en suelos de 68 zonas diferentes, encontrándose especies ovidadas en 9 de ellas (13%) (Albacete, Tarragona, Valladolid, Ávila, Cuenca, Girona), que se identificaron como *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (= *Verticillium chlamydosporium* var. *chlamydosporium*) (7 cepas), *Lecanicillium lecanii* (= *Verticillium lecanii*) y *Paecilomyces lilacinus* (Olivares-Bernabéu y López-Llorca, 2002).

En Galicia se han aislado hongos con actividad parasitica a partir de heces de animales domésticos y silvestres, y también de muestras de suelo de praderas aprovechadas por rumiantes. En concreto, se ha identificado una especie larvicida, *Duddingtonia flagrans*, y 4 ovidadas, *Mucor circinelloides*, *Paecilomyces* sp., *Trichoderma* sp. y *Verticillium* sp. (Flament Simon, 2015; Palomero Salinero, 2015).

I) Hongos de actividad ovicida

Entre las especies más utilizadas en los últimos años destaca *Pochonia chlamydosporia* (*Verticillium chlamydosporium*), que puede parasitar huevos y nematodos hembra, aunque principalmente se define como ovicida (Lýsek y Stěrba, 1991). Diferentes autores han comprobado que durante los estadios iniciales de la infección produce redes de micelio que entran en contacto estrecho con la cubierta de los huevos (López-Llorca y Claugher, 1990) (Fig. 10). Es un hongo muy eficaz frente a huevos de *T. canis*, *T. vitulorum*, *A. lumbricoides*, *A. suum* y *P. equorum* (Lýsek y Stěrba, 1991; Braga *et al.*, 2007; Carvalho *et al.*, 2010; Braga *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2010; Maciel *et al.*, 2012; De Carvalho *et al.*, 2013).

Se ha demostrado que *Paecilomyces penetrans* y *Paecilomyces lilacinus* son probablemente los agentes más eficaces de biocontrol de nematodos que infectan plantas (Rahoo *et al.*, 2011; Khan *et al.*, 2012; Mukhtar *et al.*, 2013a, b). También se han desarrollado investigaciones que prueban su utilidad frente a parásitos de animales como *Toxocara canis* (Basualdo *et al.*, 2000; Carvalho *et al.*, 2010; Gortari *et al.*, 2008). Se trata de hongos que infectan los huevos mediante la penetración directa de las hifas (Khan, 2006), mecanismo ayudado por la liberación de serín-proteasas (Zareen *et al.*, 2001).

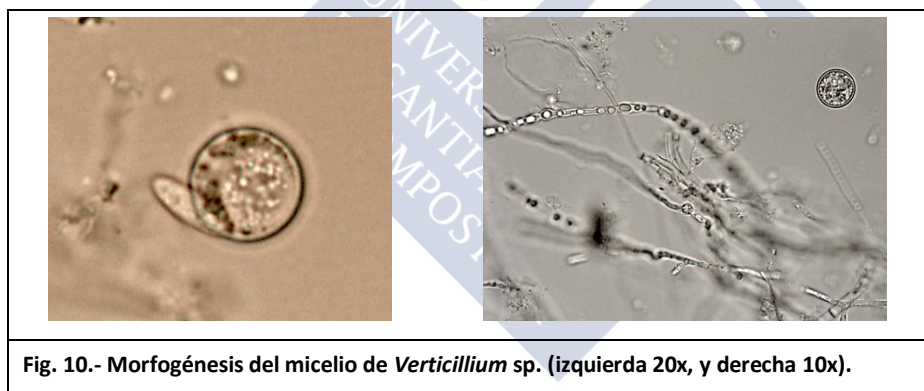


Fig. 10.- Morfogénesis del micelio de *Verticillium* sp. (izquierda 20x, y derecha 10x).

Existe una preparación comercial a base de *P. lilacinus* (Bio-Nematon®, T. Stanes & Company Ltd., India) disponible comercialmente para el control biológico de nematodos que parasitan especies vegetales. Aunque no resulta frecuente, la infección cutánea de personas por *Paecilomyces lilacinus* se ha diagnosticado en todo el mundo, en la mayoría de los casos en pacientes inmunodeprimidos (Hall *et al.*, 2004).

Las hifas de *Trichoderma harzianum* pueden atravesar la cubierta de los huevos y la cutícula de las larvas, gracias a la secreción de enzimas (quitinasas, glucanasas y proteasas) capaces de degradar la quitina. Una vez en el interior del huevo, proliferan y liberan metabolitos tóxicos (Dos Santos *et*

al., 1992; Haran *et al.*, 1996). Ciarmela *et al.* (2002) señalaron que ni *Trichoderma harzianum* ni tampoco *Mucor hiemalis* tienen efecto sobre los huevos de *T. canis*. Algunas cepas de *Trichoderma* son patógenos oportunistas de personas y animales inmunodeprimidos (Kubicek *et al.*, 2008).

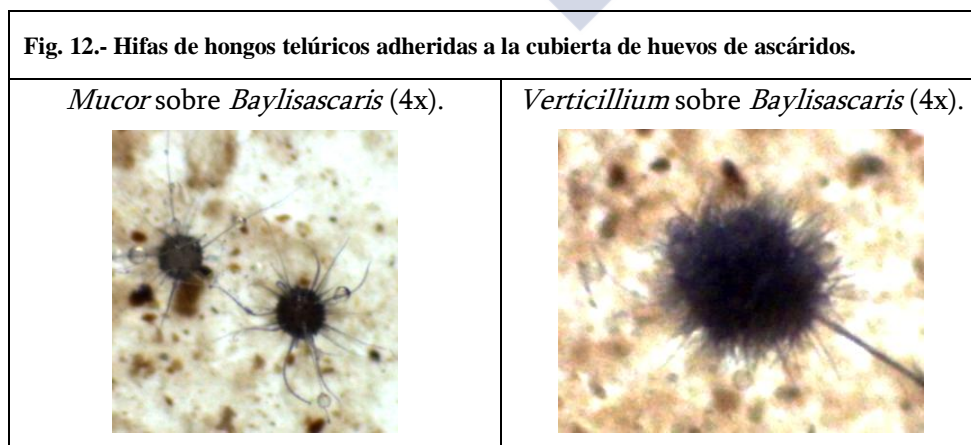
a) *Mecanismo de acción*

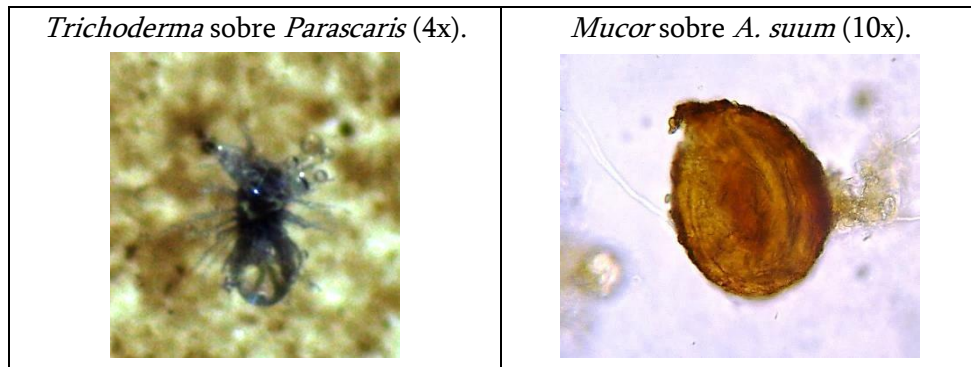
Se describen 4 fases en la actividad que algunos hongos desarrollan sobre los huevos de parásitos:

- I) Contacto
- II) Adhesión
- III) Penetración
- IV) Deliberación



Una vez detectada en las proximidades la presencia de huevos de nematodos, tiene lugar la **fase de contacto** (Figs. 11-12), y las esporas (o el micelio) de los hongos comienzan a desarrollarse y forman una red densa entre los huevos. Este proceso se favorece si los huevos se encuentran en un quiste mucoide como sucede con algunos parásitos de plantas, o incluso en el interior de las hembras de nematodos fitopatógenos (*Heterodera avenae*), probablemente porque el mucus supone un sustrato nutritivo que incrementa la intensidad del crecimiento del micelio y consecuentemente lleva a la colonización de los huevos (Irving y Kerry, 1986). La mayoría de las hifas se multiplican entre los huevos donde se encuentran restos de detritus celulares procedentes del útero.





En el extremo de algunas hifas laterales se origina una modificación corta que da lugar a un órgano de fijación específico denominado *appresorium* o *appresorio*, con el que los hongos **contactan** con la superficie del huevo y se **adhieren** a la misma. Sólo aquellas hifas que contactan y se adhieren en posición más perpendicular a la cubierta son capaces de **penetrar** en el interior del huevo (Brunori *et al.*, 1985).

Después de penetrar, los hongos continúan creciendo. Las cubiertas se mantienen intactas durante mucho tiempo, excepto en los puntos de penetración. Dentro del huevo, el hongo comienza a ramificarse rápidamente y destruye de forma gradual el contenido interno, incluyendo el embrión en desarrollo (Figs. 13-14). Esta ramificación del hongo tiene lugar primero en el espacio interno de los huevos entre la cubierta y la superficie del embrión. El hongo rodea al embrión mediante una red densa de hifas y finalmente lo destruye.



Cuando ya no existen nutrientes, el hongo consume los restos de las cubiertas y tiene lugar la fase final del proceso ovidica, denominada de **deliberación**, en la que el hongo regresa al espacio externo entre los huevos, y las hifas individuales pueden colonizar de nuevo otros huevos (Lýsek y Štěrba, 1991).

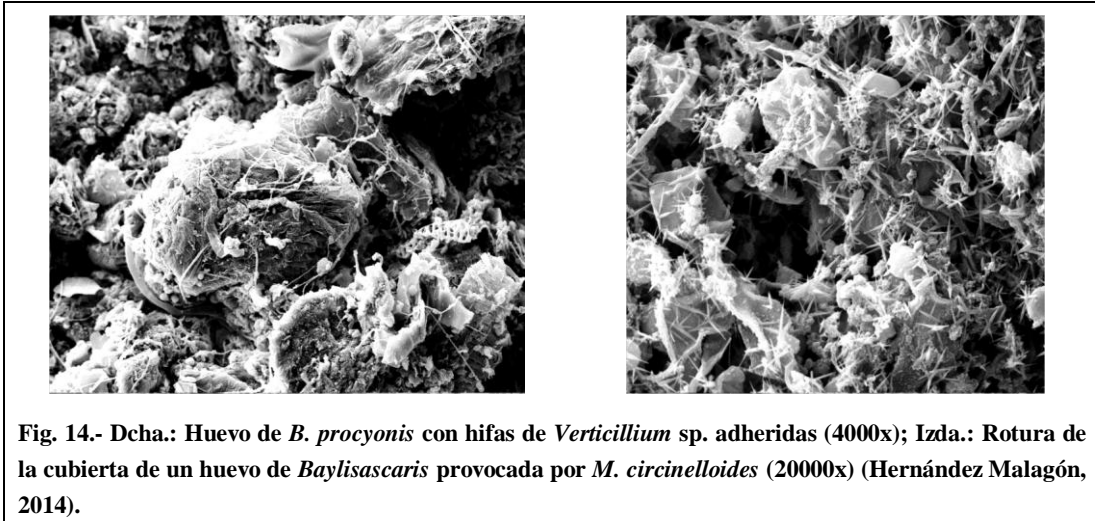


Fig. 14.- Dcha.: Huevo de *B. procyonis* con hifas de *Verticillium* sp. adheridas (4000x); **Izda.:** Rotura de la cubierta de un huevo de *Baylisascaris* provocada por *M. circinelloides* (20000x) (Hernández Malagón, 2014).

El mecanismo de penetración de los hongos ovicidas a través de la cubierta de huevos no se ha aclarado completamente. Algunos autores manifiestan que consiste principalmente en un proceso mecánico donde la actividad de ciertas enzimas participa como un factor complementario (Stirling *et al.*, 1979). En diferentes experimentos se ha indicado que se necesita una mezcla de proteasas y quitinasas para iniciar este proceso, y también se han caracterizado las proteasas que actúan frente a nematodos parásitos, incluyendo *V. suchlasporium* (López-Llorca y Robertson, 1992) y *P. chlamydosporia* (Segers *et al.*, 1996, 1998).

Se ha demostrado que una sola hifa no es capaz de romper la capa de quitina de los huevos (Lýsek y Štěrba, 1991), posibilidad que no descarta que el hongo pueda ejercer cierta presión mediante el appresorio, originando la formación de pequeñas invaginaciones en la superficie de los huevos (Jatala, 1986). Estas invaginaciones producidas por la presión ejercida por las hifas de penetración, aunque sea débil, estimula la formación de un *haustorium* o *haustorio* cónico en cuya proximidad se liberan quitinasas que contribuyen a la desintegración de la cubierta. En esta fase el haustorio es el extremo de las hifas infectivas que sirve para absorber nutrientes. No es necesaria la penetración, sino que la invaginación de la cubierta aumenta la superficie de contacto. Otros autores observaron la formación de un órgano de penetración en forma de bastón de hockey en el punto de contacto con la cubierta de los huevos (Dunn, 1983), resultado descartado en recientes investigaciones (Blaszkowska *et al.*, 2014).

Lýsek y Štěrba (1991) no observaron invaginaciones en la cubierta de los huevos de *Ascaris lumbricoides*, y el área de contacto entre *Verticillium* y la cubierta se mantuvo lisa durante las fases de contacto y adhesión, lo que podría atribuirse a la participación conjunta del *appresorium* y la liberación de algunas enzimas (Dunn *et al.*, 1982; Lýsek y Krajčí, 1987).

No se ha determinado completamente si los hongos ovicidas son capaces de colonizar los huevos de nematodos en todos los estadios de desarrollo del embrión. Jatala (1986) indicó que *Paecilomyces lilacinus* coloniza los huevos del nematodo *Globodera pallida* más fácilmente en los estadios precoces de desarrollo, es decir antes de la mórula, en tanto que sobre fases más avanzadas, en especial cuando se desarrolla una larva en el interior, se reduce la actividad ovicida para la mayoría de los hongos. Kerry (1987) concluyó que los huevos antes de desarrollar la larva 2 son altamente sensibles a los hongos ovicidas. Por el contrario, otros estudios señalaron que *Verticillium* es capaz de colonizar los huevos de nematodos fitopatógenos y de animales en todos los estadios de desarrollo embrionario (Irving y Kerry, 1986; Lýsek y Štěřba, 1991; Blaszkowska *et al.*, 2014), de lo que se deduce que la explicación podría encontrarse en las diferentes cepas de hongos. En un estudio reciente, Flament Simon (2015) demostró que no existe diferencia en la actividad de *Mucor circinelloides* sobre huevos de *Toxocara canis* sin embrionar o con L2.

II) Hongos de actividad larvicida

Un grupo importante de antagonistas de parásitos está formado por hongos atrapa-nematodos. En la actualidad *Duddingtonia flagrans* es el hongo atrapa-nematodos más empleado en experiencias de control biológico de larvas de nematodos gastrointestinales. Se ha demostrado su eficacia prácticamente frente a todos las especies que desarrollan larvas de vida libre en el medio, en tanto que no parece ejercer efecto sobre los huevos de ascáridos (Mendoza de Gives *et al.*, 2006; Araújo *et al.*, 2008).



Fig. 15.- Clamidosporas de *D. flagrans* (10x).

Se ha investigado sobre el uso de control biológico en la descontaminación del medio ambiente de huevos y larvas de *Ancylostoma* y *Toxocara* spp. (Carvalho *et al.*, 2009). El empleo de hongos nematófagos disminuye la población de parásitos en el medio ambiente ya que se concentra su acción en el entorno fecal (Larsen y Roepstorff, 1999; Araújo *et al.*, 2004). *Duddingtonia flagrans* es un hongo nematófago que se caracteriza por la producción de varios conidios en los extremos de conidióforos, pero principalmente por la producción de

numerosas clamidosporas en hifas vegetativas (Oorschot, 1985; Scholler *et al.*, 1999) (Fig. 15). Estas esporas presentan paredes gruesas y pueden ser ovoides o elípticas, de tamaño aproximado de 25-

50 µm por 10-15 µm, dimensiones que pueden variar en función de la naturaleza y composición de los medios en los que crecen.

La actividad nematófaga está garantizada por la presencia de hifas y redes adhesivas tridimensionales (Larsen, 1999; Gómez-Rincón *et al.*, 2006) en las que quedan retenidas las larvas de diferentes nematodos, que finalmente constituyen el alimento de estos hongos (Mendoza de Gives *et al.*, 2006). Esta especie ha sido estudiada como un organismo de control biológico en experimentos *in vitro* y condiciones *in vivo* (Braga *et al.*, 2012; Tavela *et al.*, 2012). La eficacia larvicida de *D. flagrans* explica el elevado número de investigaciones desarrolladas, que se centran mayoritariamente en su posible empleo frente a parásitos que merman las producciones en animales de renta (Larsen *et al.*, 1995; Fernández *et al.*, 1999; Wright *et al.*, 2003; Madeira de Carvalho *et al.*, 2012; Arias *et al.*, 2013a).

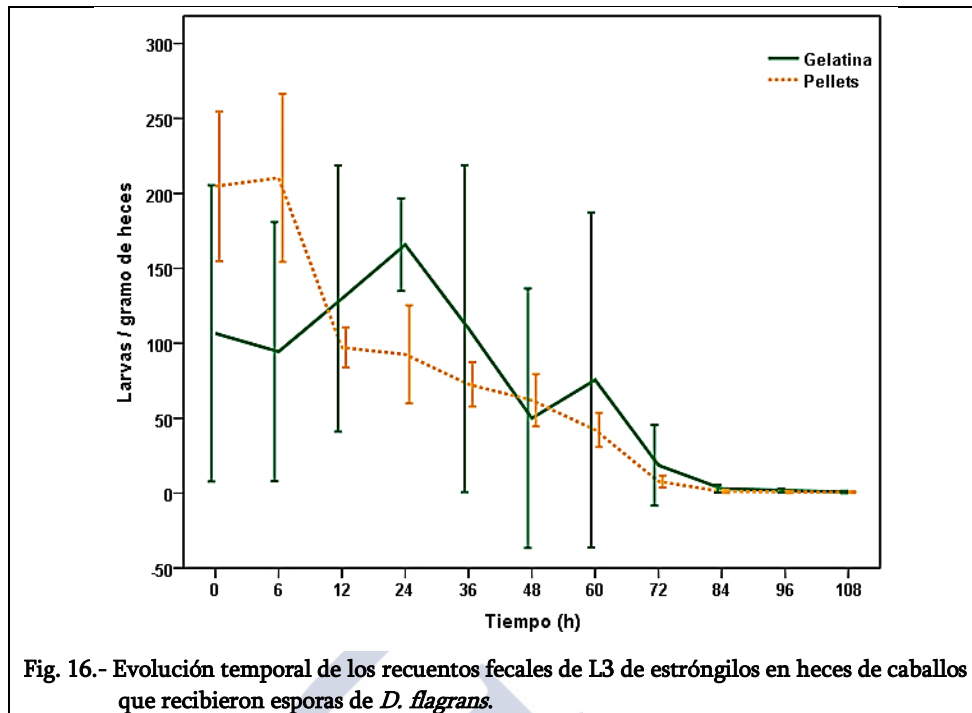
En la bibliografía se mencionan algunos estudios sobre el uso exitoso de hongos nematófagos en el control de potenciales geohelminfos zoonóticos, especialmente en un modelo experimental con perros (Araujo *et al.*, 2012; Carvalho *et al.*, 2009). Por otro lado, la mayoría de los estudios se llevan a cabo en condiciones de laboratorio o en condiciones parcialmente naturales, debido a la probada viabilidad de los hongos nematófagos tras su paso por el tracto gastrointestinal para la depredación de L3 de *Ancylostoma* spp. en condiciones de laboratorio (Carvalho *et al.*, 2009). En ese trabajo, la administración de 0,5 g / 10 kg de masa micelial de *D. flagrans* (AC001) fue eficaz en la reducción de los recuentos de huevos por gramo de heces y en la recuperación de larvas de *A. caninum* en animales tratados en comparación con el grupo control.

Respecto al uso de hongos nematófagos directamente sobre el medio ambiente, algunos autores señalan la necesidad de su inoculación en el suelo junto con un sustrato de crecimiento de los hongos, con el fin de promover su crecimiento y por lo tanto propiciar su establecimiento (De Mello *et al.*, 2014). Los resultados de este estudio confirman la eficacia del género *Duddingtonia* (CG768) en el control de larvas infectivas de *Ancylostoma* spp. presentes en la arena de playa. Sin embargo, en un ensayo que consistió en pulverizar una vez medio de cultivo líquido con esporas de *D. flagrans* directamente sobre el suelo de parcelas donde se encontraban caballos en pastoreo parasitados por estróngilos, Cazapal-Monteiro *et al.* (2012) comprobaron que la reinfección de los animales tenía lugar de forma más tardía (1 mes) que si no se distribuían las estructuras fúngicas.

Son escasos los estudios realizados directamente sobre heces de animales parasitados. En placas Petri con medio agar-agua, se demostró que *Duddingtonia* eliminaba el 98% de las L3 de *Ancylostoma* spp. (Maciel *et al.*, 2006). En heces de hámsteres infectados por ancylostómidos se demostró un porcentaje de reducción de L3 del 11-43%, y del 87% en perros (Carvalho *et al.*, 2009). Con la adición de clamidosporas de *Duddingtonia* a las heces de perros que eliminaban huevos de ancylostómidos se redujo la presencia de L3 respecto al grupo testigo en un 56% (Flament Simon, 2015). Los valores de reducción de L3 obtenidos en este estudio son similares a los obtenidos en muestras de heces con arena, en las que se observó que *Duddingtonia* disminuía la presencia de larvas de ancylostómidos entre el 4,5 y el 63% (De Mello *et al.*, 2014). En una prueba realizada con heces colocadas en macetas con tierra previamente esterilizada, la presencia de L3 se redujo entre el 57% y el 73% (Maciel *et al.*, 2012).

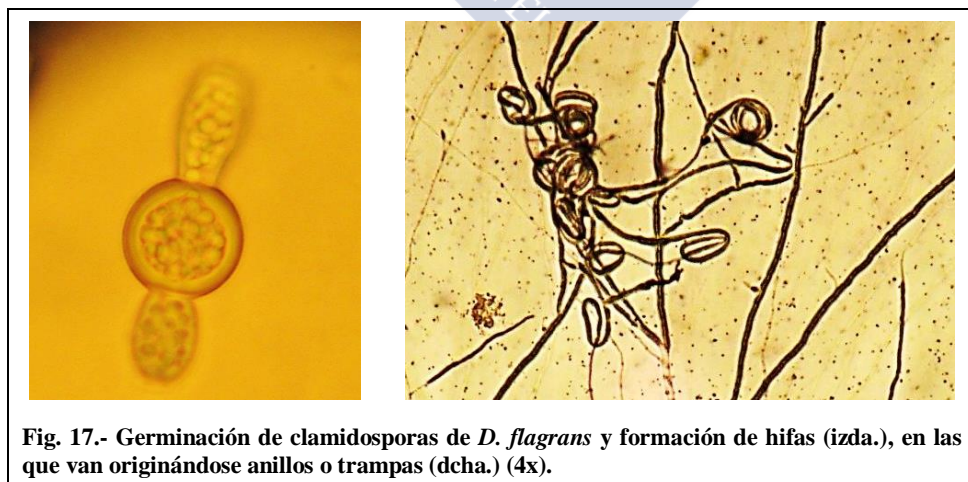
Maciel *et al.* (2010) emplearon con diferentes concentraciones de *D. flagrans* (5000, 10.000, 15.000, 20.000 y 25.000 clamidosporas por gramo de suelo). Con las concentraciones de 10.000-25.000 no se observaron diferencias significativas en su actividad predatora sobre las L3 de *Ancylostoma* spp. Sin embargo, estos resultados no coinciden con De Mello *et al.* (2014), quienes encontraron diferencias significativas con todas las concentraciones de clamidosporas.

En estudios previos se ha demostrado que *D. flagrans* es capaz incluso de adaptarse a la carga parasitaria (número de huevos de estróngilos) en las heces de los caballos, obteniéndose porcentajes de reducción de L3 superiores al 95% (Paz-Silva *et al.*, 2011). Recientemente, Pérez Anzúrez (2015) realizó un ensayo que consistió en producir esporas de *M. circinelloides* y *D. flagrans* en gelatina comestible comercial. A continuación se administraron a caballos en pastoreo durante 5 días, esporas en gelatina y en pellets nutricionales (4 Equus®, NANTA, Begonte, Lugo, España) recogiendo las heces directamente del recto para preparar los correspondientes coprocultivos, en los que se observó que la presencia de L3 se reducía con el tiempo, y prácticamente desaparecían en los 2 ensayos a partir de las 84 h de inicio del ensayo (Fig. 16).



a) Mecanismo de acción

Se ha intentado establecer el mecanismo que regula la transformación de hongos nematófagos de saprotróficos a zootróficos, estableciéndose que la formación de trampas en el caso de hongos atrapanematodos se produce en respuesta a la presencia de excretas de nematodos en el medio, mientras que la propagación de hongos en medios enriquecidos inhibe su desarrollo, que se vería estimulado por niveles bajos de C y N, y por el contacto del micelio con excretas de nematodos (Anan'ko y Teplyakova, 2011) (Fig. 17).



Durante años se ha venido indicando que se requiere el contacto directo de hongos atrapanematodos con nematodos vivos en movimiento, para estimular su morfogénesis (desarrollo de micelio, producción de trampas, esporas...) (Grønvold *et al.*, 1996; Bogués *et al.*, 2005). Sin embargo, la exposición de hongos a formas adultas de trematodos (*Fasciola hepatica* y *Calicophoron daubneyi*) representó un estímulo mayor para el desarrollo de *Duddingtonia flagrans* que nematodos intestinales adultos de *Parascaris equorum* y *Oesophagostomum* spp. (Arias *et al.*, 2013a), lo que contradice la necesidad de la presencia de nematodos vivos como estímulo para la morfogénesis fúngica. Estos resultados se confirmaron mediante la exposición de este hongo a antígenos de excreción / secreción de los trematodos indicados. En un estudio posterior, la adición de una proteína recombinante del tegumento de *F. hepatica* (FhrAPS) significó un notable estímulo para la morfogénesis de hongos de actividad ovicida (*Mucor circinelloides*) y larvicida (*Duddingtonia flagrans*) (Arias *et al.*, 2013b).

Se cree que atraen las larvas de los nematodos mediante la liberación de sustancias químicas, y una vez en contacto las inmovilizan con órganos especiales del micelio, como extremos adhesivos, trampas o anillos constrictores, y también se ha demostrado la participación de algunas enzimas. Por ejemplo, *Arthrobotrys oligospora* produce una serín-proteasa extracelular y una lectina (Ahman *et al.*, 2002), que favorecen la adherencia, inmovilización y penetración a los nematodos en menos de 1 hora (Tunlid y Jansson, 1991). Se ha señalado la producción de serín-proteasas, fosfolipasa C, lipasas, enzimas degradadoras de pectina (Meyer y Wiebe, 2003) y fosfatasa ácida, especialmente al interactuar con larvas de nematodos (Cruz *et al.*, 2009).

Cuando las clamidosporas de *D. flagrans* llegan al suelo, la existencia de materia orgánica en descomposición estimula su desarrollo hacia la formación de hifas, que enseguida originan el micelio (Barron, 1977).

En presencia de larvas de nematodos parásitos, tiene lugar la **fase de reconocimiento**, en la que los hongos detectan en la cutícula de las larvas unos compuestos que inicialmente recibieron el nombre de *nemina*, y que posteriormente se han relacionado con la lectina (Jansson y Nordbring-Hertz, 1979; Jansson y Thiman, 1992; López-Llorca, *et al.*, 2002). Esta fase se traduce en la rápida multiplicación de las hifas, en las que además se van intercalando *anillos* o *trampas*.

A diferencia de los hongos ovicidas, dado que las larvas de los parásitos están dotadas de movilidad, la **fase de adhesión** entre hongos y parásitos no tiene lugar de forma activa, sino que las larvas se van a encontrar con las trampas y quedan inmovilizadas. Una vez que se ha conseguido la paralización completa, se forman hifas invasivas, responsables de la **fase de penetración** de la

cutícula, proceso en el que también participan enzimas o metabolitos extracelulares secretadas por el hongo, y que facilitan la colonización posterior de la larva (Yang *et al.*, 2007).



Fig. 18.- Larva de ciatostomino atrapada en el micelio de *D. flagrans*, que finalmente es invadida por hifas que asimilan el contenido interior de la vaina, y de la L3 (10x).

Finalmente, se originan *hifas asimilativas*, que se encargan de la **fase de asimilación** de los nutrientes que se encuentran en el interior de la vaina, y posteriormente de la L3 (Fig. 18).

1.5.3.- Perspectivas del uso de hongos para el control biológico de zoonosis

En la Tabla 4 se citan algunos de los ensayos desarrollados para el control biológico de ciertos helmintos responsables de zoonosis, demostrándose una eficacia notable frente a huevos de ascáridos y tricúridos, y larvas de ancylostómidos.

Como se ha mencionado anteriormente, los ascáridos e incluso los tricúridos se transmiten por la ingestión de huevos infectivos, mientras que los ancylostómidos lo hacen por larvas. Esto implica que es necesario disponer de antagonistas frente a las diferentes formas parasitarias en el suelo, para reducir su presencia y de este modo el riesgo para animales y personas.

Existen algunos aspectos a tener en cuenta, como la producción conjunta de esporas de hongos de actividad diferente, y su conservación; la forma de distribución de los hongos para que actúen de forma adecuada sobre los estadios parasitarios en el suelo, y la frecuencia de aplicación. En este sentido, cobran gran importancia los estudios desarrollados por Maciel *et al.* (2009), quienes demostraron que las esporas de *Arthrobotrys robusta* sobrevivían a la liofilización. Araujo *et al.* (2012) probaron que las esporas del hongo ovicida *Pochonia chlamydosporia* son capaces de

atravesar el tracto intestinal de perros y mantener sus características biológicas en las heces de estos animales.

Tabla 4.- Ensayos de control biológico de helmintozoonosis.			
Autores	Parásito	Hongo	% Eficacia
Ciarmela <i>et al.</i> (2002)	<i>Toxocara canis</i>	<i>Fusarium pallidoroseum</i>	80%
		<i>Mucor hiemalis</i>	< 20%
Gortari <i>et al.</i> (2007)	<i>Toxocara canis</i>	<i>Fusarium</i> spp. <i>Mucor hiemalis</i> <i>Paecilomyces lilacinus</i>	
Maciel <i>et al.</i> (2009)	<i>Ancylostoma</i> spp.	<i>Arthrobotrys</i>	90,8
		<i>Duddingtonia</i>	98,9
Silva <i>et al.</i> (2010)	<i>Trichuris vulpis</i>	<i>Pochonia chlamydosporia</i>	2,5 – 94,8
Frassy <i>et al.</i> (2010)	<i>Toxocara canis</i>	<i>Pochonia chlamydosporia</i>	43,8
Carvalho <i>et al.</i> (2010)	<i>Toxocara canis</i>	<i>Pochonia chlamydosporia</i>	13,8 – 20,3
		<i>Paecilomyces lilacinus</i>	12,3 - 20
Carvalho <i>et al.</i> (2011)	<i>Ancylostoma</i> spp.	<i>Arthrobotrys robusta</i>	75,38
Maciel <i>et al.</i> (2012)	<i>Toxocara canis</i>	<i>Pochonia chlamydosporia</i>	
Araujo <i>et al.</i> (2013)	<i>Toxocara canis</i>	<i>Pochonia chlamydosporia</i>	68,5 – 70,5
Mazurkiewicz- Zapałowicz <i>et al.</i> (2014)	<i>Toxocara canis</i>	<i>Fusarium culmorum</i>	58
		<i>Metarhizium anisopliae</i>	49
		<i>Paecilomyces</i> <i>fumosoroseus</i>	54 69
		<i>Trichoderma viride</i>	55
De Mello <i>et al.</i> (2014)	<i>Ancylostoma</i> spp.	<i>Duddingtonia flagrans</i>	4,5 - 63

2. Objetivos



En base a los antecedentes expuestos, se plantea un estudio con los siguientes **OBJETIVOS**:

- 1.- Analizar la eficacia de distintos hongos ovidas para reducir en el suelo la viabilidad de huevos de *Baylisascaris procyonis*.
- 2.- Establecer la utilidad del restablecimiento de la biota del suelo para prevenir la infección por larvas de nematodos.
- 3.- Determinar la formulación más eficaz para la distribución de esporas de hongos fungicidas en el suelo.
- 4.- Estudiar la posibilidad de cultivar simultáneamente diferentes especies de hongos con distinta actividad parasiticida.



3. Unidad temática



En condiciones naturales, en el medio (suelo) existe un equilibrio basado en la actividad reguladora que ejercen algunos componentes de la microbiota telúrica (bacterias, hongos, ácaros) sobre organismos perjudiciales como algunos parásitos, principalmente nematodos.

El conocimiento de hongos de actividad helminticida frente a nematodos de especies vegetales data de más de un siglo (Zopf, 1888), en que se observaron en algunos cultivos hortícolas (tomate, lechuga, espárragos, pimientos, zanahorias), y se constató que su presencia se correlacionaba con la reducción de nematodos de los géneros *Meloydogine*, *Heterodera*, *Ditylonchus*, *Pratylenchus* y *Tylenchus*. Al observarse que aumentaba la presencia de estos hongos si se aplicaba abono orgánico (estiércol) procedentes de animales de renta, en un principio se consideró que la materia orgánica era la que estimulaba su desarrollo. Sin embargo, investigaciones posteriores demostraron que la presencia de larvas de nematodos parásitos presentes en las heces de los animales constituía el verdadero estímulo para *Arthrobotrys*, *Duddingtonia* o *Monacrosporium*, en tanto que los quistes o huevos lo eran para *Pochonia* o *Paecilomyces*.

Es importante destacar que todos estos hongos son INOCUOS para los mamíferos, como se desprende de su empleo en el cultivo de hortalizas, frutas. Se alimentan de materia orgánica del suelo, salvo cuando detectan estadios parasitarios en sus proximidades, que provocan su transformación en organismos predadores; en ausencia de formas parasitarias, retornan a un comportamiento saprofitico. Esta característica resulta de indudable interés porque acrecienta el equilibrio mencionado anteriormente en el suelo: si existen formas parasitarias el hongo incrementa su desarrollo porque encuentra aporte extra de Carbono y Nitrógeno, en tanto que cuando no existen, permanece en estado de latencia (ahorro energético).

La mayor parte de los nematodos entéricos intercalan una fase exógena en su ciclo biológico y estadios como huevos o larvas evolucionan en el suelo hasta convertirse en infectivas para el siguiente hospedador. La necesidad de disponer de acciones adecuadas para reducir la existencia de estas formas en el ambiente es indispensable para la prevención de las saprozoosis, puesto que la quimioterapia sólo elimina las formas parasitarias en los animales.

Los hongos *Arthrobotrys*, *Duddingtonia* y *Monacrosporium*, en presencia de larvas de nematodos en el suelo, forman trampas que las retienen y finalmente las destruyen. *Pochonia* es un hongo endoparásito cuyas hifas colonizan la superficie de huevos de los parásitos, se introducen en ellos y destruyen los embriones.



En diversos estudios realizados en España se comprobó que los nematodos intestinales que parasitan al perro con mayor frecuencia son *Toxocara canis*, ancylostómidos, *Trichuris vulpis* y *Toxascaris leonina*. De estos, *Toxocara canis* y *Ancylostoma caninum* cuentan con un mayor potencial zoonótico y representan un problema de salud pública.

Toxocara canis, *T. cati* y *Toxascaris leonina* son ascáridos que afectan a mascotas (perros y gatos) y a carnívoros silvestres (lince, etc.). Aunque inicialmente se consideró que sólo *Toxocara* tenía carácter zoonótico, estudios desarrollados en los últimos años han demostrado que otros ascáridos, como *Ascaris suum* puede afectar a personas, y han sembrado una duda razonable sobre *Toxascaris leonina*.

Existen numerosos estudios que alertan de la importancia de ascáridos como *Baylisascaris procyonis*, por la amplia distribución y gravedad de los cuadros que origina en personas. Se trata de un parásito que afecta principalmente a mapaches aunque también puede hacerlo a otras especies de mamíferos e incluso aves. Resulta una zoonosis de especial interés en Estados Unidos, donde en algunas zonas se describe que el 68-82% de los mapaches puedan estar parasitados por este ascárido, con el consiguiente riesgo para la población humana y en especial para los niños. El **control biológico de la baylisascariosis mediante hongos ovidas** significó la **primera publicación** en el presente trabajo (*Analysis of the effect of soil saprophytic fungi on the eggs of Baylisascaris procyonis*) en *Parasitology Research* (IF: 2,098, JCR® Index). En el Parque Zoológico “Marcelle Natureza” se recogieron heces de mapaches (*Procyonis lottor*), que tras ser analizadas mediante la técnica de flotación en solución salina resultaron positivas a la presencia de huevos de *Baylisascaris*

procyonis. A continuación, las heces se colocaron en cajas de plástico que se dividieron en diferentes lotes, testigo (sin tratamiento) y tratados, a los que se añadieron esporas de *M. circinelloides*, *Trichoderma* sp. y *Verticillium* sp.

No resulta fácil desarrollar investigaciones que involucren a mascotas (perros, gatos, etc.), por imperativos legales y condicionantes afectivos. Partiendo de la base de que la fase exógena del ciclo de los ancylostómidos transcurre de forma similar a la de los estróngilos, puesto que en ambos casos los huevos eliminados en las heces tienen que desarrollarse en el medio hasta alcanzar el estadio de larva 3 (L3), fase infectiva, se consideró más adecuado emplear caballos con estrongilosis como modelo para el estudio de la eficacia larvicida de hongos saprofitos.

En la **segunda publicación** (*Restoration of fungal biota in the soil is essential to prevent infection by endoparasites in grazing animals*, capítulo del libro Fungi: Types, environmental impact and role in disease) de este estudio se recoge precisamente esta idea, y se plantea la posibilidad de *restaurar la composición característica del suelo*, en prados en los que se alimentan caballos, centrándose en la flora fúngica, en concreto en la especie *Duddingtonia flagrans*, hongo filamentoso que en presencia de larvas de nematodos parásitos desarrolla un micelio en el que se originan *trampas* para capturar estas fases móviles parasitarias y cubrir de este modo sus necesidades energéticas y de nitrógeno. El mecanismo, además de sorprendente, ilustra el concepto señalado previamente acerca de la *predación* de las fases parasitarias del suelo. Es preciso tener en cuenta que al mismo tiempo, en el ambiente existen diferentes organismos (ácaros, otros hongos) que se nutren a partir de hongos como *Duddingtonia*, sustentando aún más la idea de equilibrio natural. En este ensayo conducido en la “Granja Gayoso - Castro” (Diputación Provincial de Lugo) (Castro Riberas de Lea), se mantuvieron 3 grupos de yeguas autóctonas Pura Raza Galega en una pradera de 15 Ha dividida en 3 parcelas valladas, que disponían de agua *ad libitum* y de comederos. Al inicio del estudio, las yeguas eliminaban huevos de nematodos estróngilos (*Cyathostomum* y *Gyalocephalus*). Un lote recibió una aplicación tópica de ivermectina, otro se alimentó además en una pradera en la que previamente se vertieron clamidosporas de *D. flagrans*, y al tercer grupo sólo se le administraron las esporas, pero no se desparasitaron.

Los Parques Zoológicos han experimentado en los últimos años notables modificaciones en sus objetivos y en su modo de trabajo, que se ha plasmado sobre todo en una concepción más moderna y respetuosa con el bienestar de los animales, dejando atrás la idea de estos Parques como meras colecciones de animales. Hoy en día han contraído la obligación de participar en actividades de I + D, que explica la inclusión del **tercero ensayo** (*Preliminary study of the biological control of strongyles affecting equids in a Zoological Park*) en esta Memoria de Tesis Doctoral, que se publicó en *Journal of Equine Veterinary Science* (IF: 0,871, JCR® Index). Entre las zoonosis que pueden afectar a las personas se encuentran las infecciones provocadas por individuos del género *Ancylostoma*. Se trata de nematodos gastrointestinales cuyos hospedadores definitivos son los carnívoros, detectándose con mayor frecuencia *Ancylostoma caninum*, *A. braziliense* y *Uncinaria stenocephala*, mientras que *A. tubaeforme*, *A. braziliense* y *U. stenocephala* infectan a gatos. *A. caninum* y *A. braziliense* son las especies que infectan con mayor frecuencia a las personas, y también *U. stenocephala*. La infección tiene lugar por la ingestión de larvas 3, o por su penetración a través de la piel. En perros se describe la infección por vía galactógena y por ingesta de hospedadores paraténicos que contiene larvas infectivas en estado de hipobiosis (roedores).

Los animales infectados eliminan huevos que salen al exterior con las heces, y ante condiciones favorables de temperatura y humedad, la mórula llega a L3 entre 2 y 9 días.

Para analizar el posible efecto de las clamidosporas de *D. flagrans* sobre las L3 de ancylostómidos del suelo, y en ausencia de mascotas parasitadas, se decidió plantear un ensayo sobre L3 de ciatostominos, estróngilos que afectan a los equinos y que desarrollan una fase externa de su ciclo biológico idéntica a la de los ancylostómidos. Este ensayo se realizó en el Parque Zoológico “Marcelle Natureza” (Outeiro de Rei, Lugo). Durante 2 años se tomaron muestras de heces de equinos silvestres (Cebra, Burro africano y Burro europeo) para determinar la cinética de eliminación de huevos de estróngilos. En el primer año los equinos se desparasitaron de forma convencional (en primavera y en otoño), mientras que en el segundo año se les proporcionaron además clamidosporas de *D. flagrans* en forma de premezcla alimentaria.

De la más que probable existencia de zoonosis provocadas por parásitos que se transmiten por huevos (ascáridos, *Capillaria*, *Trichuris*) y por larvas (ancylostómidos), se concluye que su prevención pasa obligatoriamente por el empleo combinado de esporas de hongos de actividad complementaria, ovicida y larvicida. En este sentido se planteó el **cuarto estudio**, cuyo objetivo

primordial consistió en **investigar las posibilidades de la producción mixta de esporas de *Mucor circinelloides* y *Duddingtonia flagrans*** (*Mixed production of filamentous fungal spores for preventing soil-transmitted helminth zoonoses: a preliminary analysis*; IF: 1,579, JCR® Index) para conseguir un único producto con el que hacer frente tanto a huevos como a larvas de parásitos que llegan al suelo en las heces de animales infectados. Para ello se optó por profundizar en la conveniencia de un medio de cultivo líquido, que resultaría más cómodo de distribuir con pulverizadores, en mezcla con alimento o mediante su adición durante la fabricación industrial de concentrado alimentario. En concreto se procedió a la valoración del crecimiento simultáneo de ambas especies de hongos, y a continuación a la evaluación de la actividad parasitocida de la mezcla final frente a huevos de *Toxocara canis* y a larvas 3 de ciatostominos.



4. Publicaciones

4.1.- ANALYSIS OF THE EFFECT OF SOIL SAPROPHYTIC FUNGI ON THE EGGS OF *Baylisascaris procyonis*. Parasitology Research (2015) 114: 2443-2450.

<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00436-015-4440-0>

4.2.- RESTORATION OF FUNGAL BIOTA IN THE SOIL IS ESSENTIAL TO PREVENT INFECTION BY ENDOPARASITES IN GRAZING ANIMALS. En "Fungi: Types, environmental impact and role in disease" (2012) (Eds. Adolfo Paz Silva & María Sol Arias)

https://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?products_id=36349&osCsid=39e60ccb02d8f7284ace9ebd3d041878

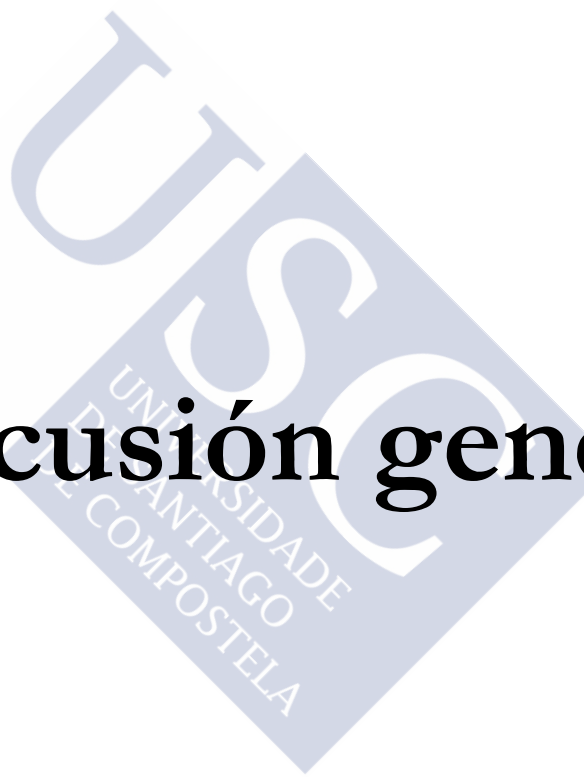
4.3.- A PRELIMINARY STUDY OF THE BIOLOGICAL CONTROL OF STRONGYLES AFFECTING EQUIDS IN A ZOOLOGICAL PARK. Journal of Equine Veterinary Science (2012) 33: 1115-1120.

http://ac.els-cdn.com/S0737080613003365/1-s2.0-S0737080613003365-main.pdf?_tid=44fe7bc0-7e52-11e5-a2d4-00000aab0f26&acdnat=1446132931_3cf1488535d7adcd2c1db69418501548

4.4.- MIXED PRODUCTION OF FILAMENTOUS FUNGAL SPORES FOR PREVENTING SOIL-TRANSMITTED HELMINTH ZOOSES: A PRELIMINARY ANALYSIS. BioMed Research International Volume 2014, Article ID567876, 7 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/567876>.

<http://dx.doi.org/10.1155/2013/567876>

5. Discusión general



Entre los helmintos responsables de saproozoonosis se encuentran aquellos que se transmiten por la ingestión de huevos infectivos, como los ascáridos o los tricúridos. En un plazo variable en función de las condiciones de humedad y temperatura, los huevos de estos nematodos se convierten en infectivos, y pueden sobrevivir durante al menos un año en circunstancias óptimas (Deplazes *et al.*, 2011). Otro grupo importante lo constituyen aquellos helmintos que se transmiten por la ingestión de larvas de tercer estadio (L3), o mediante la penetración de las L3 a través de la piel, como sucede con los ancylostómidos. El desarrollo de los huevos de *Ancylostoma* a L3 puede demorar varias semanas también en función de las condiciones ambientales (Lefkaditis, 2001).

La estrecha relación entre personas y animales de compañía proporciona beneficios como la socialización, salud mental o bienestar físico, pero más allá de estos provechos, existen riesgos potenciales para la salud que se asocian a la tenencia de animales (Overgaauw y Van Knapen, 2013). Además del riesgo de arañazos, mordeduras o alergias, las mascotas albergan con frecuencia helmintos entéricos que se pueden transmitir a personas. La infección tiene lugar normalmente por la ingestión de huevos o larvas que se encuentran en el suelo o que contaminan vegetales frescos. También se pueden adquirir estas infecciones parasitarias por la ingesta de carne insuficientemente cocinada o despojos de hospedadores paraténicos como pollos, rumiantes o cerdos (Hoffmeister *et al.*, 2007; Yoshikawa *et al.*, 2008). Se ha destacado el riesgo de infección a través del contacto directo con el pelaje de los perros (Roddie *et al.*, 2008), aunque existe la opinión de que este factor no es importante porque se precisan varias semanas para que los huevos de los helmintos se conviertan en infectivos (Keegan y Holland, 2012).

El control de helmintozoonosis transmitidas por el suelo debe integrar la desparasitación de los animales junto con alguna acción en contra de las formas infectivas en el suelo, puesto que en caso contrario, se repetirá la infección de animales o personas con relativa frecuencia. Existen numerosos antihelmínticos disponibles para el tratamiento de animales infectados por *Toxocara* spp., que incluyen milbemicina, nitroscanato, piperazina o pirantel, activos frente a las formas adultas (Macpherson, 2013). Con actividad también frente a las formas larvianas se puede aplicar emodepsida, ivermectina, moxidectina, elamectina y fenbendazol (Ramsey, 2011). Sin embargo, no existen antihelmínticos eficaces frente a larvas somáticas inhibidas.

La *European Scientific Counsel Companion Animal Parasites* (ESCCAP, y la *Companion Animal Parasite Council* (CAPC), promulgaron en 2010 y 2012, respectivamente, unas indicaciones para el control de ascariosis transmitidas por mascotas (perros, gatos), centrándose en la desparasitación de cachorros/gatitos, adultos y hembras preñadas. En concreto, se estableció que los cachorros

deberían recibir tratamiento antiparasitario a las 2, 4, 6 y 8 semanas; a continuación mensualmente hasta los 6 meses. En los gatitos ha de comenzarse a las 3 semanas de edad debido a que no existe transmisión transplacentaria (Overgaauw y Van Knapen, 2013), y posteriormente a las 5, 7, 9 semanas de edad. Para los perros adultos, se recomienda el tratamiento periódico (cada 3 meses como máximo) o basado en el resultado de análisis coprológicos. En las hembras preñadas, el consejo consiste en el tratamiento continuado desde el día 40 de preñez al día 2 post-parto. Para el control de ancylostómidos, se recomienda el tratamiento regular cada 4-6 semanas en áreas endémicas.

Las helmintozoonosis no se circunscriben a mascotas, sino que también se detallan en especies de renta. Es el caso, por ejemplo, de *Ascaris suum* que afecta principalmente a suidos, *Fasciola hepatica* a rumiantes, *Strongyloides westeri* a équidos... que son helmintos que se transmiten por huevos o por larvas.

Los individuos parasitados eliminan junto con las heces huevos de los parásitos, que una vez en el suelo completan una serie de fases hasta que se convierten en infectivos. En el suelo existen algunas especies de hongos saprofitos que en presencia de formas parasitarias se transforman en sus predadores, asegurándose así los aportes de C y N necesarios para sobrevivir. También en el suelo se encuentran ciertos organismos antagonistas de los hongos (virus, bacterias, ácaros, hongos) que limitan su supervivencia. De este modo, en condiciones naturales existe un equilibrio que se traduce en el mantenimiento de niveles bajos-moderados de parásitos en los animales, y de una cierta población parasitaria en el suelo.

Cuando se desequilibra la relación entre los diferentes agentes en el medio, surgen situaciones en las que se incrementa el riesgo de infección de animales y personas, ante las cuales se aconseja extremar las condiciones de higiene en relación con las mascotas, prevenir la defecación de los animales en zonas de esparcimiento, y sobre todo incidir en la educación de los propietarios. En relación con los animales de renta, el desequilibrio entre parásitos y antagonistas en el suelo se hace más palpable si se tiene en cuenta que la gran mayoría de las operaciones de laboreo agrícola conllevan la destrucción de la biota natural.

Se ha señalado que ciertas helmintozoonosis se producen por la ingestión de huevos que contienen una larva infectiva en su interior, como ocurre con ascáridos y tricúridos. *Baylisascaris procyonis* es el ascárido específico de mapaches (*Procyon lotor*), y también puede afectar a otras especies

animales como cánidos o coatíes. Es un nematodo con gran potencial patógeno, que puede causar el síndrome de *larva migrans* a varias especies (Murray y Kazacos, 2004), entre las que se encuentran los humanos, en los que puede provocar un cuadro de *larva migrans* neuronal, de fatales consecuencias en niños (Gavin *et al.*, 2002).

En el **primer ensayo** se planteó la posibilidad de reducir la viabilidad de huevos de ascáridos. En concreto, supone el primer análisis de la eficacia de hongos para destruir los huevos de *Baylisascaris*. El examen de las placas de Petri 28 días después de que los huevos se expusieron a aislados de *Mucor circinelloides*, *Paecilomyces lilacinus*, o *Verticillium* sp. mostraron que estos hongos podían adherirse a la cubierta del huevo, dañar la superficie y penetrar en el interior del huevo para destruir el embrión de *Baylisascaris* (actividad ovicida de tipo 3). Como resultado, los huevos se convierten en no viables y, por lo tanto, no infectivos. Estos resultados coinciden con investigaciones previas llevadas a cabo mediante el uso de *Pochonia chlamydosporia* (anteriormente *Verticillium chlamydosporium*) y *P. lilacinus* frente a huevos de *Toxocara* spp. (Carvalho *et al.*, 2010; Braga *et al.*, 2010). El género *Mucor* se compone de varias especies, y Ciarmela *et al.* (2002) demostraron que *M. hiemalis* no ejerce actividad sobre los huevos de *Toxocara canis*; más recientemente, De Souza Maia Filho *et al.* (2013) describieron un efecto de tipo 2 a los 14 días de la exposición de huevos de *T. canis* a un aislado de *Mucor*.

Cuando los huevos de *B. procyonis* eliminados en las heces se encuentran bajo condiciones ambientales adecuadas (temperatura y humedad), en su interior los embriones se desarrollan a larvas infectivas de segundo estadio (L2) (2-4 semanas) (Gavin *et al.*, 2005). La necesidad de actuar sobre los huevos de *B. procyonis* se explica si se tiene en cuenta que los mapaches infectados pueden excretar millones de huevos por día, que permanecen viables durante años en el suelo (Kazacos, 2001). También son capaces de resistir la acción de diferentes productos químicos (Morrondo *et al.*, 2006; Page *et al.*, 2009; Maya *et al.*, 2010). Pese a que se ha demostrado que se puede conseguir destruir los huevos de *B. procyonis* con una mezcla 50/50 de xileno y alcohol absoluto, o mediante el flameado directo (Blizzard, 2010), estas medidas resultan muy perjudiciales para el medio ambiente, y supondrían un riesgo de incendio muy elevado. En ensayos *in vitro* basados en verter agua a $\geq 61^{\circ}\text{C}$ sobre huevos de *Baylisascaris* se obtuvieron buenos resultados de disminución de su viabilidad (Murray, 2002).

En el presente estudio, mediante la pulverización de esporas de los hongos ovicidas *M. circinelloides*, *P. lilacinus* y *Verticillium* sp. se redujo la viabilidad de los huevos del ascárido en un 66% en las heces de mapaches, y en un 50% en las de coatíes. Asimismo, también se detectó una disminución significativa (aproximadamente 50%) de los recuentos de huevos infectivos (con

larvas L2 viable en el interior), lo que parece indicar que el desarrollo embrionario de los huevos de *Baylisascaris* se retrasa en presencia de los aislados fúngicos, en coincidencia con lo observado previamente frente a huevos de *Ascaris suum* expuestos a *Paecilomyces fumosoroseus*, *Metarhizium anisopliae* y *Trichoderma viride* (Blaszkowska *et al.*, 2013; Mazurkiewicz-Zapalowicz *et al.*, 2014). El empleo de hongos ovicidas se ha recomendado como una herramienta para prevenir la infección por otros ascáridos como *T. canis* o *A. suum* (De Souza Maia Filho *et al.*, 2013).

En base a los resultados anteriormente descritos, surgen algunos aspectos que precisan de una reflexión importante. En primer lugar, determinar si la distribución de las esporas de los hongos ha de realizarse en las heces de animales parasitados, o si podría hacerse directamente sobre el suelo. Otra cuestión interesante es conocer si los hongos, una vez distribuidos en el ambiente (heces, suelo), tienen capacidad para perdurar y desarrollarse hasta asegurar una actividad parasiticida importante.

Con objeto de determinar si el restablecimiento de algunos hongos presentes de forma natural en el suelo podría contribuir a prevenir el riesgo de infección por helmintos que se transmiten por larvas, se desarrolló un **segundo ensayo** que consistió en pulverizar un medio líquido con esporas del hongo nematófago *Duddingtonia flagrans* en una parcela en la que se alimentaban caballos autóctonos raza PRG (Pura Raza Galega) que al inicio habían sido desparasitados con ivermectina por vía tópica. También se dispuso de un grupo tratado de idéntico modo pero que se alimentaba en un prado sin esporas. Se decidió emplear equinos por 2 razones fundamentalmente, la primera porque se encontraban en instalaciones de la Diputación Provincial de Lugo, y existe un convenio de colaboración científica entre esta institución y el grupo de investigación COPAR (GI-2120; USC); la segunda porque los equinos estaban parasitados por nematodos estrogílicos, que presentan un ciclo similar (fase externa) al de ancylostómidos, de modo que se disponía de un modelo experimental próximo al de las nematodosis por estrogílicos en carnívoros.

Los resultados mostraron que la distribución de esporas mediante pulverización en el suelo reducía los niveles de infección en los caballos, que a los 3 meses aun no precisaban de un nuevo tratamiento. Por el contrario, en el otro grupo de caballos resultó necesaria una nueva desparasitación a los 3 meses. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Braga *et al.* (2009), quienes señalaron una reducción del 35-73% en la eliminación de huevos de estrogílicos tras administrar pellets que contenían micelio de *D. flagrans* a caballos en pastoreo. Sin embargo, en un

estudio posterior De Almeida *et al.* (2012) señalaron que la alimentación de caballos en pastoreo con esporas de *D. flagrans* en premezcla provocaba una reducción del 75% de las L3 en el pasto, pero no alteraba el nivel de parasitación de los equinos.

La pulverización de esporas en medio líquido proporciona una medida muy útil y eficaz para la distribución de hongos parasitocidas en el suelo, pero también entraña algunos inconvenientes entre los que destaca la necesidad de realizarlo con cierta periodicidad, disponer de personal, limitaciones en la superficie a tratar... Por ello, la administración de las esporas en el alimento podría resultar ventajosa, puesto que aseguraría el contacto con las formas parasitarias en las heces, evitando su desarrollo hasta estadios infectivos. Por este motivo, se desarrolló un **tercer ensayo** con équidos salvajes mantenidos en praderas en un Parque Zoológico. Al igual que en el ensayo anterior, se tuvo en cuenta la similitud en la transmisión de algunos parásitos responsables de zoonosis (ancylostómidos) y de los estrongílicos de los equinos.

En la primera parte se administró una mezcla granulada de ivermectina + praziquantel mezclada con el pienso. Sin embargo, a los 2-3 meses se volvieron a detectar huevos de estróngilos en las heces de burros y cebras, tal como sucedió en estudios previos realizados con caballos domésticos (Rehbein *et al.*, 2003). Para evitar el tratamiento indiscriminado, se ha propuesto la desparasitación de aquellos individuos que superan un nivel de eliminación de huevos de estróngilos por gramo de heces (HPG) (Uhlinger, 2007). Estableciendo el punto de corte en 300 HPG, los animales precisaron de 2 tratamientos adicionales.

El incremento en la frecuencia de aplicación de antihelmínticos se ha asociado al desarrollo de resistencia antihelmíntica (Eysker *et al.*, 2007), que se ha demostrado incluso en jirafas cautivas (Garretson *et al.*, 2009). A este inconveniente se suma el efecto ecotóxico que supone la reducción de la actividad de insectos coprófagos a consecuencia del tratamiento con ivermectina, que provoca el retraso en la degradación de estiércol y con ello su acumulación en pastos, perjudicando el crecimiento de las especies forrajeras y disminuyendo su calidad (Floate, 2006).

Se han sugerido algunas medidas para el control de las larvas de estrongílicos en los pastos, que incluyen la rotación de praderas o la retirada periódica de heces. La primera opción puede no ser viable en un parque zoológico, en el que sí se lleva a cabo la retirada diaria de las heces por los cuidadores de animales.

En la última década se han conseguido grandes avances en la reducción de la contaminación de pastos a través de métodos de control biológico (Chandrawathani *et al.*, 2002). Teniendo en cuenta que el tratamiento convencional realmente significaba una solución temporal al problema, se desarrolló una segunda prueba que consistió en un tratamiento antihelmíntico seguido de la

administración quincenal de clamidiosporas *D. flagrans* en premezcla alimentaria. Con esta estrategia se consiguió que los valores de eliminación de huevos de estróngilos no superasen los 300 HPG durante 1 año, y se concluyó que no era preciso volver a desparasitar los animales.

Los resultados obtenidos en los 3 ensayos previos demuestran que la propagación de esporas de hongos saprófitos podría convertirse en una herramienta muy útil para restablecer la biota telúrica, y prevenir la infección por helmintos que se transmiten por huevos (ascáridos) o larvas L3 (ancylostómidos). Para lograr este efecto, es necesario emplear esporas de hongos con actividad complementaria, ovicida y larvicida.

La mayoría de los ensayos sobre control biológico se han centrado en un grupo de parásitos, siendo ascáridos y estrongílicos los que han suscitado mayor interés. Sin embargo, las infecciones mixtas son muy frecuentes, lo que refuerza la necesidad de disponer de una estrategia común para luchar frente a diferentes agentes parasitarios que cuentan con distintas fases de transmisión. Con este motivo, en el **cuarto ensayo** se analizaron las posibilidades del control biológico basado en la combinación de diferentes hongos parasiticidas. En primer lugar, se cultivaron simultáneamente dos especies de hongos, *Mucor circinelloides* (ovicida) y *Duddingtonia flagrans* (larvicida) en placas Petri y después en medio de cultivo líquido. No se observaron signos de antagonismo entre estos hongos, y se logró un crecimiento notable para ambos. Estos resultados concuerdan con los observados en estudios previos (Ainbikaphy *et al.*, 2002).

Además de producir esporas de diferentes hongos de forma conjunta, también es preciso determinar si la actividad de los hongos se mantiene inalterada. Al añadir el cultivo mixto de *Mucor + Duddingtonia* a las heces de perros que eliminaban huevos de *T. canis* se observó que la viabilidad descendía al 50%; en un ensayo similar con heces de caballos parasitados por ciatostominos se obtuvo una reducción de las L3 del 96% (Paz-Silva *et al.*, 2011).

Varios parecen los puntos que requieren consideración para la utilización práctica de los hongos en el control biológico de estadios parasitarios en el suelo. En primer lugar, la producción a gran escala de esporas y su distribución adecuada (Brand, 2006). No existe demasiada información disponible sobre la aplicación de las esporas de hongos en el suelo. La pulverización se ha considerado muy interesante para los procedimientos a gran escala, de aplicación directa en superficies ajardinadas, lugares de recreo infantil (areneros) que podrían suponer un riesgo para la salud de personas, en especial los niños. No obstante, la pérdida de esporas por un efecto *rebote* o por escorrentía, así como la propagación no homogénea de la pulverización, podrían reducir su

efecto (Farenhost y Knols, 2010). Los métodos para la producción comercial de esporas se realizan generalmente sobre sustratos orgánicos sólidos (granos de cereales) o soportes inertes (sustratos a base de almidón, agar). En este último caso, un medio nutritivo líquido debe absorber los sustratos inertes (Ramachandran *et al.*, 2007). La producción de esporas en cultivos sumergidos parece más apropiada para su pulverización, riego, proporcionando herramientas muy útiles para la difusión de las esporas en las zonas de arena (playas) e instalaciones de recreación.

Los hongos utilizados en la investigación actual se aplican al suelo en forma de esporas, y existe relación entre esporogénesis y la cantidad y naturaleza de las fuentes de carbono y nitrógeno disponibles en un medio de cultivo (Barron, 2003). En base al efecto beneficioso del nitrógeno sobre el crecimiento micelial, necesario para la esporulación óptima (Steyaert *et al.*, 2010), se añadió una proteína recombinante del tegumento de *Fasciola hepatica* (FhrAPS) al cultivo sumergido, y se obtuvo un mayor rendimiento, en coincidencia con los datos obtenidos previamente en placas Petri con antígenos de diferentes helmintos (Paz-Silva *et al.*, 2011).

La desparasitación de los animales domésticos siguiendo la prescripción veterinaria (Habluetzel *et al.*, 2003), una mejor educación de los dueños de mascotas para evitar la presencia de heces en zonas comunes, y la recogida rápida de las mismas son medidas sugeridas para limitar las posibilidades de desarrollo de helmintos en el suelo. Otras medidas posibles para prevenir la infección humana podrían radicar en la difusión de esporas de hongos durante el riego o la fertilización de las plantas. Debe tenerse en cuenta que tanto *Mucor* y *Duddingtonia* no son especímenes peligrosos para animales, plantas ni personas, y que también presentan eficacia frente a ciertos parásitos de especies vegetales.

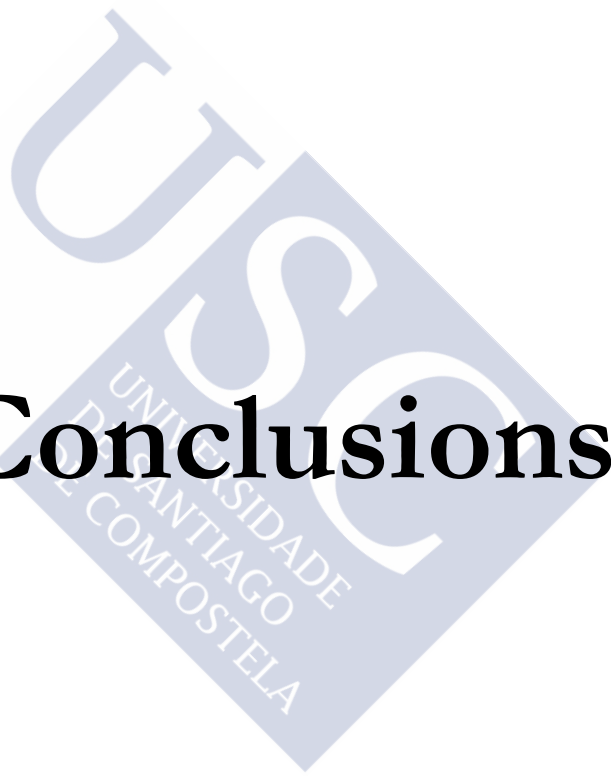
6. Conclusiones



De los resultados obtenidos en el presente estudio se ha concluido que:

- 1.- El restablecimiento de la biota telúrica disminuye la presencia en el suelo de las fases de los helmintos responsables de zoonosis.
- 2.- *Mucor circinelloides*, *Paecilomyces* sp., *Trichoderma* sp. y *Verticillium* sp. son hongos capaces de disminuir la viabilidad de huevos de ascáridos que se encuentran en el medio, sobre los que ejercen un efecto ovicida de tipo 3.
- 3.- *Duddingtonia flagrans* es un hongo atrapanematodos idóneo para el control de larvas 3 que se encuentran en el suelo por lo que su presencia limita el riesgo de infección para animales y personas, lo que supone una reducción de la frecuencia de aplicación de fármacos antihelmínticos sobre animales.
- 4.- La obtención de forma simultánea de esporas de hongos del suelo con actividad ovicida y larvicida proporciona una estrategia eficaz para reducir la viabilidad de huevos y larvas de parásitos que se encuentran en el medio.
- 5.- La pulverización de esporas de hongos parasitocidas directamente sobre las heces de animales constituye un recurso válido para el control de formas parasitarias, aplicable a la higienización de caniles, parques o zonas de recreo en las que puede existir riesgo de transmisión de zoonosis a partir de las heces de mascotas infectadas.
- 6.- Mediante la elaboración de premezclas alimentarias con esporas de hongos parasitocidas se asegura la presencia en las heces de animales con helmintosis de las formas parasitarias y de sus antagonistas, lo que favorece la acción de estos últimos.
- 7.- El empleo de esporas de hongos ovicidas y larvicidas constituye una estrategia ideal a implementar en programas de control integrado de saprozoosis.

7. Conclusions



From the results obtained in this study has concluded that:

- 1.- Restoration of the telluric biota is essential for the control of free-living stages from helminths responsible for zoonoses.
- 2.- *Mucor circinelloides*, *Paecilomyces* sp., *Trichoderma* sp. and *Verticillium* sp. are ovicidal fungi capable of carrying out a significant activity to reduce the viability of eggs of roundworms, due to their ability to exert a type - 3 effect on them.
- 3.- *Duddingtonia flagrans* is a nematode-trapping fungus very appropriate for the control of third stage larvae of nematodes in the soil, thereby limiting the risk of infection for humans and animals.
- 4.- The possibility of simultaneously culturing spores of soil fungi with ovicidal and larvicidal activity provides an effective strategy to reduce the viability of parasites in the environment (eggs and larvae) based on the combined use of different fungal species.
- 5.- Spraying of fungal spores directly onto the faeces of animals constitutes a valid procedure for the control of parasitic stages, practical for the hygienization of kennels, parks or recreation areas where there is a risk of transmission of zoonoses from the faeces of infected pets.
- 6.- Addition of fungal spores in premix feed ensures the presence of helminths and their antagonists in the faeces of infected animals, which favors the action that fungi can develop on the parasites.
- 7.- The application of spores from ovicide and larvicide fungi results an ideal strategy to apply integrated control programs against helminthzoonoses with the aim to prevent their soil transmission.

8. Resumen



Entre las helmintozoonosis más importantes en Galicia por su distribución, prevalencia y patogenicidad destacan las ascariosis, responsables de cuadros de *larva migrans* en personas que pueden llegar incluso a afectar el Sistema Nervioso Central. Los nematodos ascáridos eliminan huevos en las heces que tienen elevada resistencia ante condiciones ambientales adversas. Con el propósito de proporcionar mayor conocimiento sobre la utilidad del empleo de hongos con actividad ovicida, se llevó a cabo un **primer estudio** en el que se ensayó el efecto de *Mucor circinelloides*, *Paecilomyces* sp., *Trichoderma* sp. y *Verticillium* sp., hongos aislados por el Grupo de Investigación COPAR (GI-2120, USC) a partir de heces de animales y de muestras de suelo, sobre huevos de *Baylisascaris procyonis*, ascárido específico de mapaches (*Procyon lotor*) que también se ha descrito en otras especies animales e incluso en el hombre. El ensayo consistió en añadir esporas de los hongos mencionados sobre huevos del ascárido y sobre heces de mapaches alojados en el Parque Zoológico “Marcelle Natureza” (Outeiro de Rei, Lugo).

Las pruebas *in vitro* en placas Petri mostraron que los cuatro hongos eran capaces de desarrollar un efecto ovicida de tipo 3, porque penetraban los huevos, colonizaban su interior y eliminaban el embrión. Al exponer las heces de mapaches con huevos de *B. procyonis* a los hongos durante 28 días, se observó que su viabilidad disminuía un 67%, y el porcentaje de huevos con L2 se cifraba en torno al 33%, por el 60% en los testigos. Finalmente, en muestras de heces en arena se obtuvo una reducción de la viabilidad del 58-74%. Teniendo en cuenta que en el suelo la embrionación de los huevos de ascáridos se prolonga durante un mínimo de 2-5 semanas, la pulverización de esporas de los hongos directamente sobre las heces de animales parasitados ofrece una posibilidad muy interesante y eficaz para disminuir la viabilidad de huevos de ascáridos en el suelo, y limitar así el riesgo de infección de animales y personas. Estos resultados cobran especial relevancia en el control de la baylisascariosis, enfermedad que cursa con graves alteraciones sobre todo en niños.

Con objeto de conocer el grado de utilidad que supone restablecer la biota del suelo, en concreto la presencia de hongos con actividad frente a larvas de helmintos, se desarrolló un **segundo estudio** que consistió en mantener a 3 grupos de caballos autóctonos Pura Raza Galega (PRG) en 3 parcelas diferentes de 1 Ha aproximadamente. Mediante la técnica de flotación, se demostró que todos los animales eliminaban huevos de estróngilos en las heces, y con la realización de coprocultivos se identificaron ejemplares de *Cyathostomum* y *Gyalocephalus*. No se observaron protozoos, trematodos, cestodos ni nematodos pulmonares.

Dos de los grupos se desparasitaron con una dosis de ivermectina *pour on*, y el tercero permaneció sin tratamiento como testigo del ensayo. Además, uno de los grupos tratados se mantuvo en una

parcela en la que se distribuyeron esporas del hongo nematófago larvicida *Duddingtonia flagrans* mediante pulverización directa sobre el suelo.

Con la prueba de reducción fecal de huevos (en inglés *FECRT, Fecal Egg Count Reduction Test*) se demostró la completa eficacia de la ivermectina frente a *Parascaris equorum* y estróngilos. Además, la estimación del porcentaje de reducción de caballos positivos a coprología (en inglés *PHR, Positive Horse Reduction*) también resultó del 100%.

El periodo de reaparición de huevos de estróngilos en heces fue de 8 semanas en los 2 grupos de equinos desparasitados, pero en el lote que se alimentaba en una pradera en la que se distribuyeron esporas de *D. flagrans* se obtuvieron niveles de eliminación de huevos inferiores a los 300 HPG (huevos por gramo de heces), al contrario de lo que sucedió en el otro grupo tratado al inicio de la prueba. Esto indica que sería preciso volver a administrarles un tratamiento antiparasitario a estos caballos. Los resultados muestran que el tratamiento convencional en animales en pastoreo constituye una solución temporal al problema, y que se requiere la administración repetida de antihelmínticos. Con el restablecimiento de la biota telúrica mediante la pulverización de esporas de *D. flagrans* en el suelo se consigue reducir el riesgo de infección por helmintos, y disminuir la frecuencia de aplicación de antiparasitarios.

La pulverización de esporas de hongos constituye un método eficaz para asegurar su presencia en el suelo. Sin embargo, esta opción podría llegar a suponer una tarea ardua, si se tiene en cuenta la extensión a tratar. En la convicción de que el contacto entre los hongos y las formas parasitarias en las heces aportaría una mayor eficacia parasitocida, y evitaría la contaminación del suelo al impedir el desarrollo de los helmintos, se desarrolló un **tercer estudio** sobre équidos salvajes (cebra, burro africano y burro común) del Parque Zoológico “Marcelle Natureza” que eliminaban huevos de nematodos estrongilados en las heces. En el primer año de estudio, se mantuvo la estrategia de control parasitario que se venía realizando hasta el momento, y que consistía en el tratamiento de los équidos con antihelmínticos convencionales. Pese a que los recuentos disminuyeron significativamente, la reaparición de tasas elevadas de huevos a los 2-3 meses confirmó la necesidad de actuar sobre las formas de vida libre que se encontraban en las parcelas, para reducir el riesgo de infección y de este modo la frecuencia de aplicación de los antihelmínticos.

En el segundo año de estudio, se desparasitaron todos los équidos y además se les proporcionaron 2 veces / semana esporas del hongo nematófago *D. flagrans* en premezcla alimentaria, que se preparaba mezclando las esporas con el concentrado alimentario (pienso) justo antes de su administración a los animales. Con este procedimiento de control parasitario integrado se

consiguió mantener los valores de eliminación fecal de huevos de estróngilos en torno a 100-200 HPG durante todo el año, por lo que no se volvió a aplicar tratamiento antihelmíntico. Estos datos confirman la utilidad de las esporas de *D. flagrans* para disminuir la presencia de larvas de tercer estadio en el suelo. La alimentación de los équidos con concentrado al que previamente se han añadido las esporas proporciona un procedimiento muy útil y práctico para asegurar su presencia en las heces de los animales, donde entrarán en contacto con huevos de helmintos, y limitarán su desarrollo hasta L3, así como su supervivencia.

En el suelo, los principales estadios de helmintos responsables de zoonosis son huevos y larvas, aspecto que favorece que en numerosas ocasiones tengan lugar infecciones mixtas. Por esta razón se hace imprescindible disponer de una sola herramienta con la que hacer frente a diferentes estadios de formas parasitarias. En el **cuarto ensayo** se analizó la posibilidad de cultivar de forma conjunta 2 especies de hongos, *Mucor circinelloides* (ovicida) y *Duddingtonia flagrans* (larvicida), para conseguir un medio con el que reducir en el suelo la viabilidad de huevos y larvas de helmintos. Los resultados mostraron que no existía antagonismo entre los hongos, y que crecían en un medio líquido al que se añadió una proteína recombinante del tegumento del trematodo de *Fasciola hepatica* (FhrAPS) para aumentar su rendimiento (producción de esporas). Al añadir este medio a las heces de cachorros que eliminaban huevos de *T. canis*, después de 30 días se observó que la viabilidad descendía en un 51%; cuando se pulverizó el medio sobre las heces de caballos infectados por ciatostominos se obtuvo una reducción de las L3 del 96%. Es importante resaltar que los ancylostómidos desarrollan en el medio un ciclo similar al de los ciatostominos, y las fases infectivas también son las larvas de tercer estadio (L3).

Las parcelas de tierra de parques públicos en áreas urbanas o suburbanas pueden estar altamente contaminados con huevos de *T. canis* o larvas de *Ancylostoma*, probablemente debido a que casi todo el suelo está pavimentado por lo tanto los animales domésticos frecuentan las zonas de suelo de tierra como jardines.

La novedad e importancia de los resultados obtenidos llevó a la solicitud de 2 patentes para cubrir la propiedad intelectual del medio para el cultivo mixto de hongos (COPFr) y para el empleo de combinaciones de hongos de diferente actividad.

9. Summary



Infections by ascarids highlight among the helminthzoonoses in Galicia due to their distribution, prevalence and pathogenicity. These are diseases responsible for larva migrans syndrome in people, affecting even the central nervous system. The eggs passed of roundworms passed in the faeces are highly resistant to adverse environmental conditions and can remain viable for years. In order to provide an updated knowledge on the usefulness of fungi with ovicidal activity, a **first assay** was conducted in which the effect of *Mucor circinelloides*, *Paecilomyces* sp., *Trichoderma* sp. and *Verticillium* sp., fungal specimens isolated from animal faeces and soil samples by the COPAR (GI-2120, USC) Research Group, was tested on eggs from *Baylisascaris procyonis*, the specific roundworm of raccoons (*Procyon lotor*) but also described in other animal species and even in humans. The test consisted of adding the aforementioned fungal spores on both roundworm eggs and faeces of raccoons from the "Marcelle Natureza" Zoological Park (Outeiro de Rei, Lugo).

In vitro tests on Petri dishes showed that the four fungi could develop a type 3 ovicidal effect because of their ability to penetrate the eggs, colonize and eliminate the inner embryo. By exposing the faeces of raccoons with eggs *B. procyonis* to the fungi for 28 days, viability decreased by 67%, and the percentage of eggs with L2 to 33%. Finally, the eggs viability reduced to 58-74% in sand stool samples. Considering that embryonation of roundworm eggs takes a minimum of 2-5 weeks on the soil, spraying spores of the fungus directly onto the faeces of parasitized animals provides an interesting and effective possibility to reduce the viability of roundworm eggs, and so limits the risk of infection for animals and people. These results are especially important in controlling the baylisascariosis, disease characterized by severe damage especially in children.

In order to determine the degree of effectiveness that could be reached by restoring the soil biota, particularly the presence of fungi with activity against larvae of helminths, a **second assay** was carried out involving the maintenance of 3 groups of indigenous Pura Raza Galega horses (PRG) in 3 different plots of 1 Ha approximately. By means of the flotation technique, the presence of strongyle eggs was detected in the faeces of all horses, and *Cyathostomum* and *Gyalocephalus* were identified in the coprocultures. *Parascaris equorum* eggs were observed in the faeces of some horses. No protozoa, flukes, tapeworms or lungworms were observed.

Two groups received a dose of topical ivermectin, and the third remained untreated as control. In addition, one of the treated groups was fed on a plot in which chlamydospores of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* were distributed on the ground by direct spraying. The administration of the ivermectin was fully effective and a percentage of 100% was achieved for the FECR (Fecal Egg Count Reduction) both against strongyles and *Parascaris equorum*.

Besides this, the estimation of the percentage of reduction of positive horses to the coprology (PHR) was also 100%.

The period of reappearance of faecal eggs strongyles was 8 weeks in the 2 dewormed groups, but in the lot receiving spores of *D. flagrans*, lower levels than 300 EPG (eggs per gram of feces) were obtained, unlike what happened in the other treated group. This indicates that these latter horses need to receive a new anti-parasite dosage. The results show that conventional treatment in grazing animals offers a temporary solution to the problem, and that repeated administration of anthelmintics is required. With the restoration of the telluric biota by spraying *D. flagrans* spores in the soil it is possible to reduce the risk of helminth infection, and thus decrease the frequency of application of antiparasitic drugs.

Spraying of fungal spores is an helpful method to ensure their presence on the soil. However, this option could involve an arduous task, taking into account the surface to be treated. In the conviction that the contact between fungal and parasitic forms in the faeces could provide greater parasiticide efficiency, and prevent soil contamination by avoiding the development of helminths, a **third study** was developed on wild horses (zebra, African donkey and European donkey) belonging to the "Marcelle Natureza" Zoological Park. These were donkeys shedding eggs of strongyles in faeces. During the first year of study, a parasite control strategy involving the application of conventional anthelmintics to the equines was observed. Although the egg faecal counts decreased significantly, the observation of high levels at 2-3 months after treatment confirmed the need for action on free-living stages in the fields, to reduce the risk of infection.

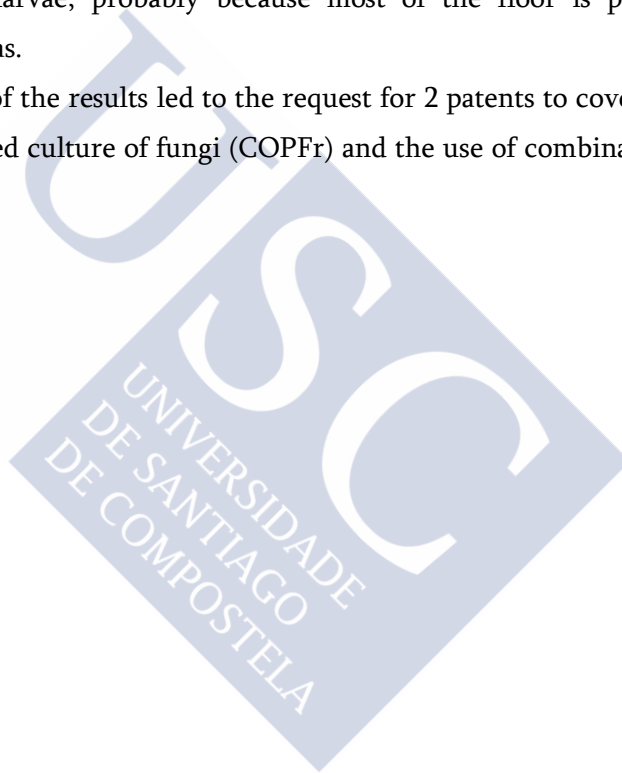
In the second year of study, all horses were dewormed and also provided 2 times / week spores of the nematophagous fungus *D. flagrans* in a food premix, which was prepared by mixing the spores with the food concentrate (feedstuff) just prior to their administration to the animals. This integrated procedure of parasite control was able to maintain the values of faecal excretion of strongyles eggs around 100-200 EPG throughout the year, therefore deworming was not reapplied. These data confirm the success of spores of *D. flagrans* to reduce the presence of nematode third larvae in the soil. By manufacturing a concentrate with spores from a parasitocidal fungus, a very useful and practical tool to ensure their presence in the faeces of animals is available, where they come into contact with worm eggs, limit their development to L3 and their survival.

The main stages of helminths responsible of zoonoses present on the ground are eggs and larvae, which favor the frequent appearance of mixed infections. In the **fourth probe** the possibility of growing together two fungal species, *Mucor circinelloides* (ovicidal) and *D. flagrans* (larvicide), in

a submerged medium to improve the reduction of the viability of helminth eggs and larvae in the soil was analyzed. The results showed that there was not antagonism between the fungi, and their growing rates were increased by adding a recombinant protein from the tegument of the liver fluke *Fasciola hepatica* (FhrAPS). In this way, the faecal puppies eliminated *T. canis* eggs, and after 30 days it was observed that viability fell by 51%; when the medium was sprayed onto the faeces of horses infected by cyathostomin, an L3 reduction of 96% was obtained. Importantly, ancylostomids also develop a similar cycle in the environment than cyathostomins, being the L3 stages the infective ones.

The plots of land for public parks in urban or suburban areas may be highly contaminated with *T. canis* eggs or *Ancylostoma* larvae, probably because most of the floor is paved so pets are frequently brought to dirt areas.

The novelty and importance of the results led to the request for 2 patents to cover the intellectual property of the means of mixed culture of fungi (COPFr) and the use of combinations of different fungi activity.





10. Bibliografía

- Ahman J, Johansson T, Olsson M, Punt PJ, van den Hondel CA, Tunlid A. (2002). Improving the pathogenicity of a nematode-trapping fungus by genetic engineering of a subtilisin with nematotoxic activity. *Appl Environ Microbiol.* 68: 3408-3415.
- Alonso JM, Stein M, Chamorro MC, Bojanich MV. (2001). Contamination of soils with eggs of *Toxocara* in a subtropical city in Argentina. *J Helminthol.* 75: 165-168.
- Ambikapathy V, Panneerselvam A, Saravanamuth R. (2002). Antagonistic effect of soil fungi to *Fusarium solani*, Appel and Willenweher. *Agricultural Science Digest.* 22: 14-17.
- Anan'ko G, Teplyakova T. (2011). Factors responsible for transition of the *Duddingtonia flagrans* carnivorous fungus from the saprotrophic to the zootrophic nutrition type. *Microbiology.* 80: 188-193.
- Angulo-Madero R, Puente CA de la, Guillén-Llera JL, De la Puente CA, Águila de la Puente C. (1987). Contamination of the soils of public parks with *Toxocara canis*. *Rev Iber Parasitol.* Vol. Extraord.: 165-171.
- 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. *Rev Bras Parasitol Vet.* 22: 171-174.
- Araujo JM, Araújo JV, Braga FR, Soares FEF, Ferreira SR, Tavela AO, Frassy LN, Alves CDF, Carvalho GR. (2012) Control of *Strongyloides westeri* by nematophagous fungi after passage through the gastrointestinal tract of donkeys. *Rev Bras Parasitol.* 21: 157-160.
- Araújo JV, Braga FR, Silva AR, Araujo JM, Tavela AO. (2008). *In vitro* evaluation of the effect of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium sinense*, and *Pochonia chlamydosporia* on *Ascaris suum* eggs. *Parasitol Res.* 102: 787-790.
- Araújo JV, Pezzi Guimarães M, Kanadani Campos A, Chaves De Sá N, Sarti P, Lopes Assis RC. (2004). Control of bovine gastrointestinal nematode parasites using pellets of the nematodetrapping fungus *Monacrosporium thaumasium*. *Cienc Rural.* 34: 457-463.
- Araujo Z, Brandes S, Pinelli E, Bochichio MA, Palacios A, Wide A, Rivas-Santiago B, Jiménez JC. (2015). Seropositivity for ascariasis and toxocarosis and cytokine expression among the indigenous people in the Venezuelan Delta region. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 57: 47-55.
- 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. (2013b). Mixed production of filamentous

- fungal spores for preventing soil-transmitted helminth zoonoses: a preliminary analysis. *Biomed Res Int.* doi: 10.1155/2013/567876
- Arias MS, Suárez J, Cazapal-Monteiro CF, Francisco I, López-Arellano ME, Piñeiro P, Suárez JL, Sánchez-Andrade R, Mendoza De Gives P, Paz-Silva A. (2013a). Trematodes enhance the development of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys (Duddingtonia) flagrans*. *Fungal Biol.* 117: 540-544.
- Astrup I, Prag J. (2001). Ascariasis in Denmark. *Ugeskr. Laeg.* 80: 1741-1747.
- Barron GL. (1977). The nematode-destroying fungi. *Topics in Mycobiology*, No. 1. Canadian Biological Publications, Guelph, Canada. 140 pp.
- Barron GL. (2003). Predatory fungi, wood decay, and the carbon cycle. *Biodiversity.* 4: 3-9.
- Basualdo JA, Ciarmela ML, Sarmiento PL, Minvielle MC. (2000). Biological activity of *Paecilomyces* genus against *Toxocara canis* eggs. *Parasitol Res.* 86: 854-859.
- Bauer C. (2013). Baylisascariosis-infections of animals and humans with 'unusual' roundworms. *Vet Parasitol.* 193: 404-412.
- Beaver PC, Snyder CH, Carrera GM, Dent JH, Lafferty JW. (1952). Chronic eosinophilia due to visceral larva migrans; report of three cases. *Pediatrics.* 9: 7-19.
- Bergstrom K, Langeland G. (1981). Survival of *Ascaris* eggs, *Salmonella* and fecal coli in soil and on vegetables grown in infected soil. *North Vet Med.* 33: 23-32.
- Black M, Scarpino P, O'Donnell C, Meyer K, Jones J, Kaneshiro E. (1982). Survival rates of parasite eggs in sludge during aerobic and anaerobic digestion. *Appl Environ Microbiol.* 44: 1138-1143.
- Black MD, Grove DI, Butcher AR, Warren LJ. (2010). Cutaneous *larva migrans* in infants in the Adelaide Hills. *Australas J Dermatol.* 51: 281-284.
- Blaszkowska J, Kurnatowski P, Wojcik A, Goralska K, Szwabe K. (2014). *In vitro* evaluation of the ovistatic and ovicidal effect of the cosmopolitan filamentous fungi isolated from soil on *Ascaris suum* eggs. *Vet Parasitol.* 199: 165-171.
- Blaszkowska J, Wojcik A, Kurnatowski P, Swabe K. (2013). Geohelminth egg contamination of children's play areas in city of Lodz (Poland). *Vet Parasitol.* 192: 228-233.
- Blizzard EL, Yabsley MJ, Beck MF, Harsch S. (2010). Geographic expansion of *Baylisascaris procyonis* roundworms, Florida, USA. *Emerg Infect Dis.* 16: 1803-1804.
- Boguś MI, Czygier M, Kedra E, Samborski J. (2005). *In vitro* assessment of the influence of nutrition and temperature on growing rates of five *Duddingtonia flagrans* isolates, their

- insecticidal properties and ability to impair *Heligmosomoides polygyrus* motility. *Exp Parasitol.* 109: 115-123.
- Bojar H, Kłapeć T. (2012). Contamination of soil with eggs of geohelminths in recreational areas in the Lublin region of Poland. *Ann Agric Environ Med.* 19: 267-270.
- Botero D. (1998). *Parasitosis humanas*. 3 ed. Medellín, Colombia. Ediciones Rojo. pp. 105-115.
- Bowman D, Montgomery S, Zajac A. (2010). Hookworms of dogs and cats as agents of cutaneous *larva migrans*. *Trends Parasitol.* 26: 162-167.
- Braga FR, Araújo JV, Campos AK, Carvalho RO, Silva AR, Tavela AO, Maciel AS. (2007). *In vitro* observation of the action of isolates of the fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* and *Verticillium chlamydosporium* on the eggs of *Ascaris lumbricoides* (Linnaeus, 1758). *Rev Soc Bras Med Trop.* 40: 356-358.
- Braga FR, Araújo JV, Silva AR, Araújo JM, Carvalho RO, Tavela AO. (2009). Biological control of horse cyathostomin using the nematophagous fungus *D. flagrans* in tropical southeastern Brazil. *Vet Parasitol.* 163: 335-340.
- Braga FR, Araújo JV, Soares FEF, Araujo JM, Ferreira SR, Queiroz JH. (2012). Use of statistical tools in the study of the conditions of predation of *Duddingtonia flagrans* versus *Panagrellus* sp. *Biochem Sci Technol.* 22: 559-565.
- Braga FR, Ferreira SR, Araújo JV, Araújo JM, Silva AR, Carvalho RO, Campos AK, Freitas LG. (2010). Predatory activity of *Pochonia chlamydosporia* fungus on *Toxocara* (syn. *Neoascaris*) *vitulorum* eggs. *Trop Anim Health Prod.* 42: 309-314.
- Brand, D. (2006). Thèse Doctorat de l'Université de Provence, Marseille, France. 188 pp.
- Brunori A, Buischio A, Cassinis A. (1985). *Introduzione allo studio dei funghi*. Casa Editrice "Il Libro" – Italia.
- Bryan HM, Darimont CT, Paquet PC, Ellis JA, Goji N, Gouix M, Smits JE. (2011). Exposure to infectious agents in dogs in remote coastal British Columbia: Possible sentinels of diseases in wildlife and humans. *Can J Vet Res.* 75: 11-17.
- Caballero-Hernández AI, Castrejón-Pineda F, Martínez-Gamba R, Angeles-Campos S, Pérez-Rojas M, Buntinx SE. (2004). Survival and viability of *Ascaris suum* and *Oesophagostomum dentatum* in ensiled swine faeces. *Bioresour Technol.* 94: 137-142.
- Cabaret J, Bouilhol M, Mage C. (2002). Managing helminths of ruminants in organic farming. *Vet Res.* 33: 625-640.

- Carvalho RO, Araújo JV, Braga FR, Araújo JM, Alves CD. (2010). Ovicidal activity of *Pochonia chlamydosporia* and *Paecilomyces lilacinus* on *Toxocara canis* eggs. *Vet Parasitol.* 169: 123-127.
- Carvalho RO, Araújo JV, Braga FR, Ferreira SR, Araújo JM, Silva AR, Frassy L.N., Alves CDF. (2009). Biological control of Ancylostomosis in dogs using the nematode-trapping fungus *Monacrosporium thaumasium* in southeastern Brazil. *Vet Parasitol.* 165: 179-183.
- 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. *Vet Parasitol.* 176: 236-239.
- Caumes E, Danis M. (2004). From creeping eruption to hookworm-related cutaneous *larva migrans*. *Lancet Infect Dis.* 4: 659-660.
- Caumes E. (2000). Treatment of cutaneous *larva migrans*. *Clin Infect Dis.* 30: 811-814.
- Cazapal-Monteiro C, Arias M, Suárez J, Rodríguez MI, Francisco I, Cortiñas FJ, Madeira De Carvalho LM, Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A. (2012). Effect of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores on the control of parasite infection in grazing horses. *Forag Graz Horse Nutrit.* 132: 419-423.
- Chandrawathani P, Brelín D, Nor Fasihah S, Adnan M, Jamnah O, Sani RA, Hoglund J, Waller PJ. (2002). Evaluation of the Neem tree (*Azadirachta indica*) as a herbal anthelmintic for nematode parasite control in small ruminants in Malaysia. *Tropical Biomedicine.* 19: 41-48.
- Ciarmela ML, Minvielle MC, Lori G, Basualdo JA. (2002). Biological interaction between soil fungi and *Toxocara canis* eggs. *Vet Parasitol.* 103: 251-257.
- Colley DG, LoVerde PT, Savioli L. (2001). Infectious disease. Medical helminthology in the 21st century. *Science.* 29: 1437-1438.
- Conde García L, Muro Álvarez A, Simón Martín F. (1989). Epidemiological studies on toxocaríasis and visceral *larva migrans* in a zone of western Spain. *Ann Trop Med Parasitol.* 83: 615-620.
- Cordero del Campillo M. (1999). *Parasitología Veterinaria.* 1 ed. Madrid, E. Editorial McGraw-hill-interamericana de España, S. A. U. pp. 642-646.
- Córdoba A, Ciarmela ML, Pezzani B, Gamboa MI, De Luca M, Minvielle M, Basualdo JA. (2002). Presencia de parásitos intestinales en paseos públicos urbanos en La Plata, Argentina. *Parasitol Latinoam.* 57: 25-29.

- Croese J, Fairley S, Loukas A, Hack J, Stronach P. (1996). A distinctive apthous ileitis linked to *Ancylostoma caninum*. J Gastroenterol Hepatol. 11: 524-531.
- Cruz DG, Silva CP, Carneiro CNB, Retamal CA, Thiébaud JTL, Damatta RA, Santos CP. (2009). Acid phosphatase activity during the interaction of the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* with the nematode *Panagrellus* sp. J Invertebr Pathol. 102: 238-244.
- 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 Hlth. 59: 23-28.
- De Almeida GL, Santurio JM, Filho JO, Zanette RA, Camillo G, Flores AG, da Silva JH, de la Rue ML. (2012). Predatory activity of the fungus *Duddingtonia flagrans* in equine strongyle infective larvae on natural pasture in the Southern Region of Brazil. Parasitol Res. 110: 657-662.
- De Carvalho LM, Braga FR, Domingues RR, Araujo JM, Lelis RT, de Paula AT, da Silveira WF, de Araújo JV. (2013). Interaction of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* and *Parascaris equorum* eggs in different culture media. J Basic Microbiol. doi: 10.1002/jobm.201300586
- De Mello IN, Braga FR, Avelar Monteiro TS, Freitas LG, Araujo JM, Freitas Soares FE, Araújo JV. (2014). Biological control of infective larvae of *Ancylostoma* spp. in beach sand. Rev Iberoam Micol. 31: 114-118.
- De Souza Maia Filho F, Nunes Vieira J, Aires Berne ME, Stoll FE, Da Silva Nascente P, Pötter L, Brayer Pereira DI. (2013). Fungal ovicidal activity on *Toxocara canis* eggs. Rev Iberoam Micol. 30: 226-230.
- Degouy A, Menat C, Aubin F, Piarroux R, Woronoff-Lemsi MC, Humbert P. (2001). Toxocariasis. Presse Med. 30: 1933-1938.
- Del Giudice F, Desalvador P, Bernard E, Caumes E, Vandebos F, Marty P, Le Fichoux Y, Dellamonica P. (2002). Loeffler's syndrome and cutaneous *larva migrans*: a rare association. Brit J Dermatol. 147: 386.
- Deplazes P, Van Knapen F, Schweiger A, Overgaauw PAM. (2011). Role of pet dogs and cats in the transmission of helminthic zoonoses in Europe, with a focus on echinococcosis and toxocarosis. Vet. Parasitol. 182: 41-53.

- Despommier D. (2003). Toxocariasis: clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular aspects. *Clin Microbiol Rev.* 16: 265-272.
- DeStefano S, DeGraaf RM. (2003). Exploring the ecology of suburban wildlife. *Front Ecol Environ.* 1: 95-101.
- Devera R, Blanco Y, Hernández H, Simoes D. (2008). *Toxocara* spp. y otros helmintos en plazas y parques de Ciudad Bolívar, estado Bolívar (Venezuela). *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 26: 23-26.
- Dos Santos MA, Ferraz S, Muchovez JJ. (1992). Evaluation of 20 species of fungi from Brazil for biocontrol of *Meloidogyne incognita* race - 3. *Nematropica* 22: 183-192.
- Dunn MT, Sayre RM, Carrell A, Wergin WP. (1982). Colonization of nematode eggs by *Paecilomyces lilacinus* (Tom) Samson as observed with scanning electron microscope. *Scan Electron Microsc.* 3: 1351-1357.
- Dunn MT. (1983). *Paecilomyces nostocoides*: a new hyphomycete isolated from cysts of *Heterodera zea*. *Mycologia* 75: 179-182.
- Escalante H, Liñan R, Díaz E, Davelois K, Huamanchay O. (2005). Antígenos de larvas pulmonares de *Ascaris suum* reconocidos por anticuerpos producidos en *Oryctolagus cuniculus*. *Parasitol Latinoam.* 60: 132-137.
- Eysker M, Bakker J, Berg M, van de Doorn DCK, van Ploeger HW. (2007). The use of age-clustered pooled faecal samples for monitoring worm control in horses. *Vet Parasitol.* 151: 249-255.
- Fairbairn D. (1960). In Stauber L.A. Ed. Host influence on parasite physiology. Rutgers Univ. Press, New Brunswick, N.J. pp. 50-64.
- Fairbairn D. (1961). The *in vitro* hatching of *A. lumbricoides* eggs. *Can J Zool.* 39: 153-162.
- Farenhorst M, Knols BGJ. (2010). A novel method for standardized application of fungal spore coatings for mosquito exposure bioassays. *Malar J.* 9: 27.
- Feldmeier H, Schuster A. (2012). Mini review: Hookworms-related cutaneous *larva migrans*. *Eur J Microbiol Infect Dis.* 31: 915-918.
- Fernández AS, Larsen M, Nansen P, Grønvold J, Henriksen A, Bjørn H, Wolstrup J. (1999). The efficacy of two isolates of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* against *Dictyocaulus viviparus* larvae in faeces. *Vet Parasitol.* 85: 289-304.
- Fernández CF, Cantó AG. (2002). Frecuencia de helmintos en intestinos de perros sin dueño sacrificados en la ciudad de Querétaro, Querétaro, México. *Vet Méx.* 33: 247-253.

- Ferreira SR, Araújo JV, Braga FR, Araujo JM, Carvalho RO, Silva AR, Frassy LN, Freitas LG. (2010). Ovicidal activity of seven *Pochonia chlamydosporia* fungal isolates on *Ascaris suum* eggs. Trop Anim Health Prod. 43: 639-642.
- 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.
- Floate KD. (2006). Endectocide use in cattle and fecal residues: environmental effects in Canada. Can J Vet Res. 70: 1-10.
- Frassy LN, Braga FB, Silva AR, Araújo JV, Ferreira SR, Freitas LG. (2010). Destruction of *Toxocara canis* eggs by the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia*. Rev Soc Bras Med Trop. 43: 102-104.
- Gaasenbeek CP, Borgsteede FH. (1998). Studies on the survival of *Ascaris suum* eggs under laboratory and simulated field conditions. Vet Parasitol. 75: 227-234.
- Gállego Berenguer J. (1998). Manual de Parasitología. 1ª ed. Barcelona, España: Edicions de la Universitat de Barcelona. pp. 315.
- García JT, García FJ, Alda F, González JL, Aramburu MJ, Cortés Y, Prieto B, Pliego B, Pérez M, Herrera J, García-Román L. (2012). Recent invasion and status of the raccoon (*Procyon lotor*) in Spain. Biol. Invasions. 14: 1305-1310.
- García Reyna T. (2006). Detección de la infección por *Giardia lamblia* en perros capturados en el Centro de Control Canino de Iztapalapa, D.F. Tesis Licenciatura Médico Veterinario Zootecnista. Edo. Universidad Nacional Autónoma de México. 67 pp.
- Garretson PD, Hammond E, Craig TM, Holman PJ. (2009). Anthelmintic resistant *Haemonchus contortus* in a giraffe (*Giraffa camelopardalis*) in Florida. J Zoo Wildl Med. 40: 131-139.
- Gates M, Nolan T. (2009). Endoparasites prevalence and recurrence across different age groups of dogs and cats. Vet Parasitol. 166: 153-158.
- Gautret P, Cramer JP, Field V, Caumes E, Jensenius M, Gkrania-Klotsas E. (2012). Infectious diseases among travellers and migrants in Europe, Euro Trav Net 2010. Euro Surveill. 17: 26.
- Gavin PJ, Kazacos KR, Shulman ST. (2005). Baylisascariasis. Clin Microbiol Rev. 18: 703-718.
- Gavin PJ, Kazacos KR, Tan TQ, Brinkman WB, Byrd SE, Mets MB, Shulman ST. (2002). Neural larva migrans caused by the raccoon roundworm *Baylisascaris procyonis*. Pediatr Infect Dis J. 21: 971-975.

- Geenen PL, Bresciani J, Boes, J, Pedersen A, Eriksen L, Fagerholm HP, Nansen P. (1999). The morphogenesis of *Ascaris suum* to the infective third-stage larvae within the egg. J Parasitol. 85: 616-622.
- Gey AB. (1998). Synopsis der Parasitenfauna des Waschbaren (*Procyon lotor*) unter Berücksichtigung von Befunden aus Hessen. Thesis. Justus Liebig Universität, Fachbereich Veterinärmedizin, Giessen, Germany. 203 pp.
- Gilman J. (1957). A Manual of Soil Fungi. 2nd ed. Iowa State College Press, Ames.
- Goffette S, Jeanjean AP, Duprez TP, Bigaignon G, Sindic CJ. (2000). Eosinophilic pleocytosis and myelitis related to *Toxocara canis* infection. Eur J Neurol. 7: 703-706.
- Gomes JF, Hoshino-Shimizu S, Dias LC, Araujo AJ, Castilho VL, Neves FA. (2004). Evaluation of a novel kit (TF-test) for the diagnosis of intestinal parasitic infections. J Clin Lab Anal. 18: 132-138.
- Gómez-Rincón C, Uriarte J, Valderrábano J. (2006). Efficiency of *Duddingtonia flagrans* against *Trichostrongyle* infections of sheep on mountain pastures. Vet Parasitol. 141: 84-90.
- Gortari C, Cecilia Cazau C, Roque Hours R. (2007). Hongos nematófagos de huevos de *Toxocara canis* en un paseo público de La Plata, Argentina. Rev Iberoam Micol. 24: 24-28.
- Gortari MC, Galarza BC, Cazau MC, Hours RA. (2008). Comparison of the biological properties of two strains of *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson associated to their antagonistic effect onto *Toxocara canis* eggs. Malays J Microbiol. 4: 35-41.
- Grønvold J, Henriksen SA, Larsen M, Nansen P, Wolstrup J. (1996) Aspects of biological control with special reference to arthropods, protozoans and helminths of domesticated animals. Vet Parasitol. 64: 47-64.
- Guay DR. (2001). Pet-assisted therapy in the nursing home setting: potential for zoonosis. Am J Infect Control. 29: 178-186.
- Guimarães AM, Alves ECLA, Rezende GF, Rodrigues MC. (2005). Ovos de *Toxocara* sp. e larvas de *Ancylostoma* sp. em praça pública de Lavras, MG. Rev Saude Publica. 39: 293-295.
- Habluetzel A, Traldi G, Riggieri S, Attili AR, Scuppa P, Marchetti R, Menghini G, Esposito F. (2003). An estimation of *Toxocara canis* prevalence in dogs, environmental egg contamination and risk of human infection in the Marche region of Italy. Vet Parasitol. 113: 243-252.
- Habluetzel A, Traldi G, Ruggieri S, Attili AR, Scuppa P, Marchetti R, Menghini G, Esposito F. (2003). An estimation of *Toxocara canis* prevalence in dogs, environmental egg

- contamination and risk of human infection in the Marche region of Italy. *Vet Parasitol.* 113: 243-252.
- Hall VC, Goyal S, Davis MD, Walsh JS. (2004). Cutaneous hyalohyphomycosis caused by *Paecilomyces lilacinus*: report of three cases and review of the literature. *Int J Dermatol.* 43: 648-653.
- Haran S, Schickler H, Oppenheim A, Chet I. (1996). Differential expression of *Trichoderma harzianum* chitinases during mycoparasitism. *Phytopathology.* 86: 980-985.
- Hayashi K, Tahara H, Yamashita K, Kuroki K, Matsushita R, Yamamoto S, Hori T, Hirono S, Nawa Y, Tsubouchi H. (1999). Hepatic imaging studies on patients with visceral *larva migrans* due to probable *Ascaris suum* infection. *Abdom Imaging* 24: 465-469.
- Hegglin D, Deplazes P. (2004). Control strategy for *Echinococcus multilocularis*. *Emerg Infect Dis.* 14: 1626-1628.
- Herbinger KH, Drerup L, Alberer M, Nothdurft HD, Sonnenburg, F, Loscher T. (2012). Spectrum of imported infectious diseases among children and adolescents returning from the tropics and subtropics. *J Travel Med.* 19: 150-157.
- Hernández Malagón, JA. (2014). Posibilidades de control de helmintozoonosis por ascáridos mediante el uso de hongos telúricos. Memoria de Licenciatura. Departamento de Patología Animal, Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela. Lugo.
- Heukelbach J, Feldmeier H. Review. (2008). Epidemiological and clinical characteristics of hookworm-related cutaneous *larva migrans*. *Lancet Infect Dis* 8: 302-309.
- Heukelbach J, Hengge UR. (2009). Bed bugs, leeches and hookworm larvae in the skin. *Clinics in Dermatology.* 27: 285-290.
- Heukelbach J, Wilcke T, Feldmeier H. (2004). Cutaneous *larva migrans* (creeping eruption) in an urban slum in Brazil. *Int J Dermatol.* 43: 511-515.
- Heukelbach J, Wilcke T, Meier A, Feldmeier H. (2003). A longitudinal study on cutaneous *larva migrans* in an impoverished Brazilian township. *Travel Med Infect Dis.* 1: 213-218.
- Hochedez P, Caumes E. (2007). Hookworm-related cutaneous *larva migrans*. *J Travel Med.* 14: 326-333.
- Hoffmeister B, Glaeser S, Flick H, Pornschlegel S, Suttorp N, Bergmann F. (2007). Cerebral toxocariasis after consumption of raw duck liver. *Am J Trop Med Hyg.* 76: 600-602.
- Humbert P, Buchet S, Barde T. (1995). Toxocariasis. A cosmopolitan parasitic zoonosis. *Allerg Immunol.* 27: 284-291.

- Humbert P, Niezborala M, Salembier R, Aubin F, Piarroux R, Buchet S, Barale T. (2000). Skin manifestations associated with toxocaríasis: a case - control study. *Dermatology*. 201: 230-234.
- Husak AL, Grado SC. (2002). Monetary benefits in a southern silvopastoral system. *South J Appl For*. 26: 159-164.
- Inatomi Y, Murakami T, Tokunaga M, Ishiwata K, Nawa Y, Uchino M. (1999). Encephalopathy caused by visceral larva migrans due to *Ascaris suum*. *J Neurol Sci*. 164: 195-199.
- Iñiguez-Rodríguez L. (2015). Prevalencia de parásitos digestivos en perros del municipio de Lugo. Lugo, Galicia, España: Trabajo de fin de Máster. Universidade de Santiago de Compostela, Facultade de Veterinaria de Lugo.
- Irving F, Kerry BR. (1986). Variation between strains of the nematophagous fungus, *Verticillium chlamydosporium* Goddard. II. Factors affecting parasitism of cyst nematode eggs. *Nematologica*. 32: 474-485.
- Jansson HB, Nordbring-Hertz B. (1979). Attraction of nematodes to living mycelium of nematophagous fungi. *J Gen Microbiol*. 112: 89-93.
- Jansson HB, Thiman L. (1992). A preliminary study of chemotaxis of zoospores of the nematode-parasitic fungus *Catenaria anguillulae*. IWF Wissen und Medien, Göttingen, Germany. Film No. C. 1868.
- Jatala P. (1986). Biological control of plant-parasitic nematodes. *Ann Rev Phytopathol*. 24: 453-489.
- Juris P, Tóth F, Lauková A, Plachý P, Dubinský P, Sokol J. (1996). Survival of model bacterial strains and helminth eggs in the course of mesophilic anaerobic digestion of pig slurry. *Vet Med*. 41: 149-153.
- Kahn LH. (2006). Confronting zoonoses, linking human and veterinary medicine. *Emerg Infect Dis*. 12: 556-561.
- Kannathasan S, Muruganathan A, Rajeshkannan N, de Silva NR. (2012). Cutaneous *larva migrans* among devotees of the Nallur temple in Jaffna, Sri Lanka. *PLoS One*. 7.
- Kassai T. (1998). *Helmintología Veterinaria*. Acribia (ed.), Zaragoza (España).
- Kazacos KR, Boyce, WM. (1989). *Baylisascaris larva migrans*. *J Am Vet Med Assoc*. 195: 894-903.
- Kazacos KR. (1986). Raccoon ascarids as a cause of *larva migrans*. *Parasitol Today* 2: 253-255.
- Kazacos KR. (1991). Visceral and ocular *larva migrans*. *Semin Vet Med Surg*. 6: 227-235.
- Kazacos KR. (2000). Protecting children from helminthic zoonoses. *Contemp Pediatr*. 17: 1-24.

- Kazacos KR. (2001). *Baylisascaris procyonis* and related species. In: Samuel WM, Pybus MJ, Kocan AA, eds. Parasitic diseases of wild mammals. 2nd ed. Ames, IA: Iowa State University Press, 301-341.
- Keegan JD, Holland CV. (2012). A comparison of *Toxocara canis* embryonation under controlled conditions in soil and hair. J Helminthol. 16: 1-7.
- Kerry BR. (1987). Biological control. In: Principles and practice of nematode control in crops. Academia Press Australia, Chapter 7, pp. 233-263.
- Khademvatan S, Rahim F, Tavalla M, Abdizadeh R, Hashemitabar M. (2013). PCR-based molecular characterization of *Toxocara* spp. using feces of stray cats: a study from Southwest Iran. PLoS One 8(6):e65293. doi: 10.1371/journal.pone.0065293
- Khan MR, Zaidi B, Haque Z. (2012). Nematicides control rice root-knot, caused by *Meloidogyne graminicola*. Phytopathol Mediterr. 51: 298-306.
- Kłapeć T, Borecka A. (2012). Contamination of vegetables, fruits and soil with geohelminths eggs on organic farms in Poland. Ann Agric Environ Med. 19: 421-425.
- Kubicek CP, Komon-Zelazowska M, Druzhinina IS. (2008). Fungal genus *Hypocrea/Trichoderma*: from barcodes to biodiversity. J Zhejiang Univ Sci B. 9: 753-763.
- Lalosević D, Oros A, Lalosević V, Knezević K, Knezević S, Bozić K, Vlajković K, Gebauer E. (2001). Manifestations of visceral and ocular symptoms of toxocariasis in a 6-year - old boy. Med Pregl. 54: 51-53.
- Larsen M, Nansen P, Wolstrup J, Grønvold J, Henriksen SA, Zorna A. (1995). Biological control of trichostrongyles in calves by the fungus *Duddingtonia flagrans* fed to animals under natural grazing conditions. Vet Parasitol. 60: 321-330.
- Larsen MN, Roepstorff A. (1999). Seasonal variation in development and survival of *Ascaris suum* and *Trichuris suis* eggs on pastures. Parasitology. 119: 209-220.
- Lefkaditis M. (2001). Ancylostomosis in dogs. Scientia Parasitologia. 1: 15-22.
- López Díaz JE, González Arráez E, Oliveira Prendes JA. (2009). Cyanogenic and agronomic variability in wild populations of white clover collected at the Cantabrian range. In: Reiné R., Barrantes O., Broca A., Ferrer C. (eds): The Multifunctionality of the Grassland: sustainable livestock production and ecosystem management. Spanish Grassland Society (SEEP), Huesca. Pp. 177-183.
- López-Llorca LV, Claugher, D. (1990). Appressoria of the nematophagous fungus *Verticillium suchlasporium*. Micron Microsc Acta. 21: 125-130.

- López-Llorca LV, Olivares-Bernabeu C, Salinas J, Jansson HB, Kolattukudy, PE. (2002). Pre-penetration events in fungal parasitism of nematode eggs. *Mycol Res.* 106: 499-506.
- López-Llorca LV, Robertson W. (1992). Immunocytochemical localization of a 32 kDa protease from the nematophagous fungus *Verticillium suchlasporium* in infected nematode eggs. *Exp Mycol.* 16: 261-267.
- Lýsek H, Krajčí D. (1987). Penetration of oivicidal fungus *Verticillium chlamydosporium* through the *Ascaris lumbricoides* egg - shells. *Folia Parasitol.* 34: 57-60.
- Lýsek H, Štěřba J. (1991). Colonization of *Ascaris lumbricoides* eggs by the fungus *Verticillium chlamydosporium* Goddard. *Folia Parasitol.* 38: 255-259.
- Maciel AS, Araújo JV, Campos AK, Lopes E, Freitas LG. (2009). Predation of *Ancylostoma* spp. dog infective larvae by nematophagous fungi in different conidial concentrations. *Vet Parasitol.* 161: 239-247.
- Maciel AS, Araújo JV, Cecon PR. (2006). Atividade predatória *in vitro* dos fungos *Arthrobotrys robusta*, *Duddingtonia flagrans* e *Monacrosporium thaumasium* sobre larvas infectantes de *Ancylostoma* spp. de cães. *Rev Bras Parasitol Vet.* 15: 71-75.
- Maciel AS, Freitas LG, Campos AK, Lopes E, Araújo JV. (2010). The biological control of *Ancylostoma* spp. dog infective larvae by *Duddingtonia flagrans* in a soil microcosm. *Vet Parasitol.* 173: 262-270.
- 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: 1074-1085.
- Macpherson CN. (2013). The epidemiology and public health importance of toxocariasis: A zoonosis of global importance. *Int J Parasitol.* 43: 999-1008.
- Madeira De Carvalho LM, Arias M, Bernardo FMA, Serra P, Farrim C, Paz-Silva A. (2012). Addition of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores to the concentrate feed can improve the successful of control measures against strongyle infection in horses. *Forag Graz Horse Nutrit.* 132: 433-436.
- Magnaval JF, Berry A, Fabre R, Morassin B. (2001). Eosinophil cationic protein as a possible marker of active human *Toxocara* infection. *Allergy.* 56: 1096-1099.
- Maikai BV, Umoh JU, Ajanusi OJ, Ajogi I. (2008). Public health implications of soil contaminated with helminth eggs in the metropolis of Kaduna, Nigeria. *J Helminthol.* 82: 113-118.

- Malgor R, Oku Y, Gallardo R, Yarzabal I. (1996). High prevalence of *Ancylostoma* spp. infection in dogs, associated with endemic focus of human cutaneous *larva migrans*, in Tacuarembó, Uruguay. *Parasite*. 3: 131-134.
- Marques JP, Guimarães CR, Boas AV, Carnaúba PU, Moraes JD. (2013). Contamination of public parks and squares from Guarulhos (São Paulo State, Brazil) by *Toxocara* spp. and *Ancylostoma* spp. *Int J Parasitol*. 43: 999-1008.
- Martínez-Moreno FJ, Hernández S, López-Cobos E, Becerra C, Acosta I, Martínez-Moreno A. (2007). Estimation of canine intestinal parasites in Córdoba (Spain) and their risk to public health. *Vet Parasitol*. 43: 7-13.
- Maruyama H, Nawa Y, Noda S, Mimori T, Choi WY. (1996). An outbreak of visceral larva migrans due to *Ascaris suum* in Kyushu, Japan. *Lancet* 347: 1766-1767.
- Maya C, Ortiz M, Jiménez B. (2010). Viability of *Ascaris* and other helminth genera non larval eggs in different conditions of temperature, lime (pH) and humidity. *Water Sci Technol*. 62: 2616-2624.
- Mazurkiewicz-Zapałowicz K, Jaborowska-Jarmoluk M, Kołodziejczyk L, Kuźna-Grygiel W. (2014). Comparison of the effect of the chosen species of saprotrophic fungi on the development of *Toxocara canis* and *Ascaris suum* eggs. *Ann Parasitol*. 58: 215-220.
- Mejer H, Roepstorff A. (2006). *Ascaris suum* infections in pigs born and raised on contaminated paddocks. *Parasitology*. 133: 305-312.
- Mendoza de Gives P, Zapata Nieto C, Liébano Hernández E, López Arellano ME, Herrera Rodríguez D, González-Garduño R. (2006). Biological control of gastro - intestinal parasitic nematodes using *Duddingtonia flagrans* in sheep under natural conditions in Mexico. *Ann NY Acad Sci*. 1081: 355-359.
- Mercado R, Ueta MT, Castillo D, Muñoz V, Schenone H. (2004). Exposure to *larva migrans* syndromes in squares and public parks of cities in Chile. *Rev Saude Publica*. 38: 729-731.
- Meyer WJ, Wiebe MG. (2003). Enzyme production by the nematode-trapping fungus, *Duddingtonia flagrans*. *Biotechnol Lett*. 25: 791-795.
- Minvielle MC, Pezzani BC, Basualdo JA. (1993). Frequency of finding helminths eggs in canine stool samples collected in public places from La Plata city, Argentina. *Bol Chileno de Parasit*. 48: 63-65.
- Miró G, Alonso A, Rupérez C, Sagredo P. (1995). Nematodosis intestinales. *Canis et Felis*. 27: 66.

- Mizgajska-Wiktor H, Uga S. (2006). Exposure and environmental contamination. In *Toxocara - the Enigmatic Parasite*. Holland C. V. & Smith H. V. Wallingford, CABI Publishing. pp 211-227.
- Moertel CL, Kazacos KR, Butterfield JH, Kita H, Watterson J, Gleich GJ. (2001). Eosinophil-associated inflammation and elaboration of eosinophil-derived proteins in 2 children with raccoon roundworm (*Baylisascaris procyonis*) encephalitis. *Pediatrics*. 108: E93.
- Morrondo P, Díez-Morrondo C, Pedreira J, Díez-Baños N, Sánchez-Andrade R, Paz-Silva A, Díez-Baños P. (2006). *Toxocara canis* larvae viability after disinfectant - exposition. *Parasitol Res*. 99: 558-561.
- Morse SS. (2004). Factors and determinants of disease emergence. *Rev Sci Tech*. 23: 443-451.
- Mozgovoi AA. (1968). Ascaridata of animals and man and the diseases caused by them. In *essentials of Nematodology*. Skrjabin (ed), K.I. Vol. II.
- Mukhtar T, Kayani MZ, Hussain MA. (2013a). Nematicidal activities of *Cannabis sativa* L. and *Zanthoxylum alatum* Roxb. against *Meloidogyne incognita*. *Ind Crop Prod*. 42: 447-453.
- Murray WJ, Kazacos KR. (2004). Raccoon roundworm encephalitis. *Clin Infect Dis*. 39: 1484-1492.
- Murray WJ. (2002). Human infections caused by the raccoon roundworm, *Baylisascaris procyonis*. *Clin Microbiol. News*. 24: 1-7.
- Nansen P, Roepstorff A. (1999). Parasitic helminths of the pig: factors influencing transmission and infection levels. *Int J Parasitol*. 29: 877-891.
- Nathwani D, Laing RB, Currie PF. (1992). Covert toxocariasis-a cause of recurrent abdominal pain in childhood. *Br J Clin Pract*. 46: 271.
- Nejsum P, Betson M, Bendall RP, Thamsborg SM, Stothard JR. (2012). Assessing the zoonotic potential of *Ascaris suum* and *Trichuris suis*: looking to the future from an analysis of the past. *J Helminthol*. 86: 148-155.
- Nejsum P, Parker ED Jr, Frydenberg J, Roepstorff A, Boes J, Haque R, Astrup I, Prag J, Skov Sørensen UB. (2005). Ascariasis is a zoonosis in Denmark. *J Clin Microbiol*. 43: 1142-1148.
- Ngui R, Lim YA, Ismail WH, Lim KN, Mahmud R. (2014). Zoonotic *Ancylostoma ceylanicum* infection detected by endoscopy. *Am J Trop Med Hyg*. 91: 86-88.
- Okulewicz A, Buńkowska K. (2009). Baylisascariasis-a new dangerous zoonosis. *Wiad Parazytol*. 55: 329-334.

- Olivares-Bernabéu CM, López-Llorca LV. (2002). Fungal egg-parasites of plant-parasitic nematodes from Spanish soils. *Rev Iberoam Micol.* 19: 104-110.
- OMS. (1976). Organización Mundial de la Salud. Serie de Informes Técnicos. Evaluación de las actividades de planificación de la familia en los servicios de salud. Ginebra. 569.
- OMS. (1982). Organización Mundial de la Salud. Serie de Informes. Zoonosis bacterianas y víricas. Ginebra. 682.
- OMS. (2005). Organización Mundial de la Salud. Serie de Informes Técnicos. Prevención y Control de la Esquistosomiasis y las geohelmintiasis. Ginebra. 912.
- Oorschot Can Van. (1985). Taxonomy of the *Dactylaria complex* V. A review of the *Arthrobotrys* and allied genera. In: Hoog, G.S. (ed.). Taxonomy in the *Dactylaria complex*, IV-VI. *Stud. Mycol.* 26: 61-96.
- OPS. (2003). Organización Panamericana de la Salud. Zoonosis y enfermedades transmisibles al hombre y a los Animales: Parasitosis. Portugal.
- Overgaauw PA, Van Knapen F. (2013). Veterinary and public health aspects of *Toxocara* spp. *Vet Parasitol.* 193: 398-403.
- Page LK, Anchor C, Luy E, Kron S, Larson G, Madsen L, Kellner K, Smyser TJ. (2009). Backyard raccoon latrines and risk for *Baylisascaris procyonis* transmission to humans. *Emerg Infect Dis.* 15: 1530-1531.
- Page LK, Beasley JC, Olson ZH, Smyser TJ, Downey M, Kellner KF, McCord SE, Egan TS 2nd, Rhodes OE Jr. (2011). Reducing *Baylisascaris procyonis* roundworm larvae in raccoon latrines. *Emerg Infect Dis.* 17: 90-93.
- Palomero Salinero AM. (2015). Análisis de la eficacia de hongos frente a parásitos que afectan a la gallina ponedora. Trabajo de Fin de Grado, Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela.
- Papajová I, Juris P, Szabová E, Venglovský J, Sasáková N, Sefčíková H, Martínez J, Gábon T. (2008). Decontamination by anaerobic stabilisation of the environment contaminated with enteronematode eggs *Toxocara canis* and *Ascaris suum*. *Bioresour Technol.* 99: 4966-4971.
- Paquetdurand I, Hernández J, Dolz G, 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 Trop.* 104: 30-37.

- Park SY, Glaser C, Murray WJ, Kazacos KR, Rowley HA, Fredrick DR, Bass N. (2000). Raccoon roundworm (*Baylisascaris procyonis*) encephalitis: case report and field investigation. *Pediatrics*. 106: E56.
- 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. (2011). Ability of the fungus *Duddingtonia flagrans* to adapt to the cyathostomin egg-output by spreading chlamydospores. *Vet Parasitol*. 179: 277-282.
- Pegg EJ. (1971). Infection of dogs by *Toxocara canis* carried by flies. *Parasitology*. 62: 409-414.
- Peng W, Yuan K, Hu M, Gasser RB. (2007). Recent insights into the epidemiology and genetics of *Ascaris* in China using molecular tools. *Parasitology* 134: 325-330.
- Pérez Anzúrez G. (2015). Prevención de infección por nematodos gastrointestinales en caballos en pastoreo mediante el uso de hongos parasiticidas. Tesis profesional para la obtención del título de ingeniero agrónomo especialista en zootecnia.
- Permin A, Henningsen E, Murrell KD, Roepstorff A, Nansen P. (2000). Pigs become infected after ingestion of livers and lungs from chickens infected with *Ascaris* of pig origin. *Int J Parasitol*. 30: 867-868.
- Phills JA, Harrold AJ, Whiteman GV, Perelmutter L. (1972). Pulmonary infiltrates, asthma and eosinophilia due to *Ascaris suum* infestation in man. *N Engl J Med*. 286: 965-970.
- Prieto Novoa M, Fernández Pérez O, Díez-Baños P, Morrondo Pelayo P. (1995). *Toxocara canis*: un problema de Salud Pública y Medicina Veterinaria. *Med Vet*. 12: 7-12.
- Quiroz Romero, H. 1999. Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. México D. F. Editorial Limusa S. A de C. V. pp. 483-490.
- Rahoo AM, Mukhtar T, Gowen SR, Pembroke B. (2011). Virulence of entomopathogenic bacteria *Xenorhabdus bovienii* and *Photorhabdus luminescens* against *Galleria mellonella* larvae. *Pak J Zool*. 43: 543-548.
- Ramachandran S, Singh SK, Larroche C, Soccol CR, Pandey A. (2007). Oil cakes and their biotechnological applications – A review. *Biores Technol*. 98: 2000-2009.
- Ramírez-Olivencia G, Bru Gorraiz FJ, Rivas González P, Lago Núñez M, Herrero Mendoza MD, Puente Puente S. (2009). Skin diseases and tropical medicine. Results from a prospective study (2004-2007). *Rev Clin Esp*. 9: 527-535.
- Ramsey I. (2011). BSAVA Small Animal Formulary, seventh ed. British Small Animal Veterinary Association, Gloucester, England.

- Reed C, Henke SE, Kresta AE. (2012). Frequency of deposition and location of *Baylisascaris procyonis* eggs in raccoon feces. *J Wildl Dis.* 48: 190-194.
- Rehbein S, Holste JE, Doucet MY, Fenger C, Paul AJ, Reinemeyer CR, Smith LL, Yoon S, Marley SE. (2003). Field efficacy of ivermectin plus praziquantel oral paste against naturally acquired gastrointestinal nematodes and cestodes of horses in North America and Europe. *Vet Ther Fall.* 4: 220-227.
- Reinemeyer CR (2009). Diagnosis and control of anthelmintic-resistant *Parascaris equorum*. *Parasite Vector* 2: S2-S8.
- Richey TK, Gentry RH, Fitzpatrick JE, Morgan AM. (1996). Persistent cutaneous larva migrans due to *Ancylostoma* species. *South Med J.* 89: 609-611.
- Rinaldi L, Biggeri A, Carbone S, Musella V, Catelan D, Veneziano V, Cringoli G. (2006). Canine faecal contamination and parasitic risk in the city of Naples (southern Italy). *BMC Vet Res.* 2: 29.
- Roddie G, Stafford P, Holland C, Wolfe A. (2008). Contamination of dog hair with eggs of *Toxocara canis*. *Vet Parasitol.* 152: 85-93.
- Roepstorff A, Nilsson O, O'Callaghan CJ, Oksanen A, Gjerde B, Richter SH, Ortenberg EO, Christensson D, Nansen P, Eriksen L, Medley GF. (1999). Intestinal parasites in swine in the Nordic countries: multilevel modelling of *Ascaris suum* infections in relation to production factors. *Parasitology* 119: 521-534.
- Romasanta A. (2004). Estudio de la respuesta inmunitaria en la toxocariosis canina experimental y natural. Influencia de terapias inmunomoduladoras sobre la dinámica de las IgG. Tesis Doctoral. Universidade de Santiago de Compostela.
- Roussere GP, Murray WJ, Raudenbush CB, Kutilek MJ, Levee DJ, Kazacos KR. (2003). Raccoon roundworm eggs near homes and risk for *larva migrans* disease, California communities. *Emerg Infect Dis.* 9: 1516-1522.
- Ruiz de Ybáñez MR, Garijo MM, Alonso FD. (2001). Prevalence and viability of eggs of *Toxocara* sp. and *Toxascaris leonina* in public parks in eastern Spain. *J Helminthol.* 75: 169-173.
- Sakai S, Shida Y, Takahashi N, Yabuuchi H, Soeda H, Okafuji T, Hatakenaka M, Honda H. (2006). Pulmonary lesions associated with visceral larva migrans due to *Ascaris suum* or *Toxocara canis*: imaging of six cases. *AJR Am J Roentgenol.* 186: 1697-1702.
- Sakakibara A, Baba K, Niwa S, Yagi T, Wakayama H, Yoshida K, Kobayashi T, Yokoi T, Hara K, Itoh M, Kimura E. (2002). Visceral *larva migrans* due to *Ascaris suum* which presented

- with eosinophilic pneumonia and multiple intra-hepatic lesions with severe eosinophil infiltration-outbreak in a Japanese area other than Kyushu. *Intern Med.* 41: 574-579.
- Samson A, Dubay SA, Huspeni TC, Cyr A. (2012). Influence of environmental variables on *Baylisascaris procyonis* infection in raccoons. *J Parasitol.* 98: 1279-1282.
- Sánchez-Andrade R, Sánchez-Andrade A, Suárez JL, Arias M, Francisco I, Díez C, Romasanta A, Morrondo P, Díez-Baños P, Paz-Silva A. (2009). Relationship among presence of antibodies against *Ascaris suum*, eosinophilia and autoantibodies (IgM-RF). *Int J Appl Res Vet Med.* 7: 57-62.
- Sánchez-Andrade, A. (2008). Estudio del factor reumatoide relacionado con agentes infecto-parasitarios. Tesis Doctoral, Universidade de Santiago de Compostela.
- Schmidt GD, Roberts LS. (1984). *Fundamentos de Parasitología*. Comp. Ed. Continental. México.
- Schneider C, Arnaud B, Schmitt-Bernard CF. (2000). Ocular toxocariasis. Value of local immunodiagnosis. *J F Ophtalmol.* 23: 1016-1019.
- Scholler M, Hagedorn E, Rubner R. (1999). A reevaluation of predatory orbiliaceous fungi. II. A new generic concept. *Sydowia.* 51: 89-113.
- Scott Weese, J., Peregrine, A., Andeson, M. & Fulford, M. (2011). Parasitic Diseases. En: J. Scott Weese & M. Fulford, edits. *Companion Animal Zoonoses*. s.l. Blackwell Publishing Ltd. , pp. 36-37.
- Segers R, Butt TM, Carder JH, Keen JN, Kerry BR, Peberdy JF. (1998). The subtilisins of fungal pathogens of insects, nematodes and plants: distribution and variation. *Mycol Res.* 103: 395-402.
- Segers R, Butt TM, Kerry BR, Beckett A, Peberdy JF. (1996). The role of the proteinase VCP1 produced by the nematophagous *Verticillium chlamydosporium* in the infection process of nematode eggs. *Mycol Res.* 100: 421-428.
- Sellon DC, Long MT. (2007). *Equine Infectious Diseases*. Saunders, Missouri, USA.
- Sidwa TJ, Wilson PJ, Moore GM, Oertli EH, Hicks BN, Rohde RE, Johnston D. (2005). Evaluation of oral rabies vaccination programs for control of rabies epizootics in coyotes and gray foxes: 1995–2003. *J Am Vet Med Assoc.* 227: 785-792.
- Silva AR, Araújo JV, Braga FR, Alves CDF, Frassy LN. (2010). *In vitro* ovicidal activity of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* and *Pochonia chlamydosporia* on *Trichuris vulpis* eggs. *Vet Parasitol.* 172: 76-79.

- Silva PF, Cavalcanti IMD, Irmão JI, Rocha FJS. (2009). Common beach sand contamination due to enteroparasites on the southern coast of Pernambuco State. *Brazil Rev Inst Med Trop S Paulo*. 51:217–218.
- Solomon M, Benenson S, Baum S, Schwartz E. (2011). Tropical skin infections among israeli travelers. *Am J Trop Med Hyg*. 85: 868-872.
- Soulsby E.J.L. (1987). *Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos*. Ed. Interamericana. México D.C., México.
- Soulsby, E.J.L. (1982): *Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals*, 7 Edition. Bailliere, Tindall and Company, London: 809-810.
- Steyaert JM, Weld RJ, Stewart A. (2010). Isolate-specific conidiation in *Trichoderma* in response to different nitrogen sources. *Fungal Biol*. 114: 179-188.
- Stirling GR, Mckenry M, Mankau R. (1979). Biological control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) on peach. *Phytopathology*. 69: 806-809.
- Taira K, Saeed I, Permin A, Kapel CM. (2004). Zoonotic risk of *Toxocara canis* infection through consumption of pig or poultry viscera. *Vet Parasitol*. 121: 115-124.
- Taranto NJ, Passamonte L, Marinconz R, de Marzi MC, Cajal SP, Malchiodi EL. (2000). Zoonotic parasitosis transmitted by dogs in the Chaco Salteno, Argentina. *Medicina*. 60: 217-220.
- Tavela AO, Araújo JV, Braga FR, Araujo JM, Queiroz LM, 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). *Biochem Sci Technol*. 22: 607-610.
- Thomas K, Nixdorff U, Manger B, Geiler T, Lorenz HM, Faller G, Moshage W. (2000). Hypereosinophilia with myocardial involvement due to toxocariasis. Diagnosis of regional myocardial perfusion abnormalities by pulsed tissue Doppler echocardiography. *Med Klin*. 95: 163-167.
- Thomaz-Soccol V, Paulino RC, Castro EA, Andreoli CV. (1999). Helminth eggs viability in sewage and biosolids sludge in Curitiba, Paraná, Brazil. *Helm. Abstracts*. 68: 33. *Arq Biol Technol*. 40: 829-836.
- Thompson RCA, Kutz SJ, Smith A. (2009). Parasite zoonoses and wildlife: Emerging Issues. *Int J Environ Res Public Health*. 6: 678-693.

- Toledo CI, De Armas F, Del Castillo A, Arévalo P, Pinero JE, Valladares B. (1994). Parasite contamination of parks and gardens as a public health problem. Data of the island of Tenerife. *Rev Sanid Hig Pública*. 68: 617-622.
- Tunlid A, Jansson S. (1991). Proteases and Their Involvement in the Infection and Immobilization of Nematodes by the Nematophagous Fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Appl Environ Microbiol*. 57: 2868-2672.
- Uga S, Kataoka N. (1995). Measures to control *Toxocara* egg contamination in sandpits of public parks. *Am J Trop Med Hyg*. 52: 21-24.
- Uhlinger C. (2007). Evidence-based parasitology in horses. *Vet Clin N Am: Equine Pract*. 23: 509-517.
- Urquhart GM, Armour J, Duncan JL, Dunn AM, Jennings FW. (2001). *Parasitología veterinaria*. 2nd ed. Zaragoza (España), Editorial Acribia.
- Van Knapen F, Buijs J, Kortbeek LM, Ljungström I. (1992). *Larva migrans* syndrome: *Toxocara*, *Ascaris*, or both? *Lancet*. 340: 550-551.
- Veraldi S, Bottini S, Rizzitelli G, Persico MC. (2012). One-week therapy with oral albendazole in hookworm-related cutaneous *larva migrans*: A retrospective study on 78 patients. *J Dermatolog Treat*. 23: 189-191.
- Veraldi S, Persico MC, Francia C, Nazzaro G, Gianotti R. (2013). Follicular cutaneous *larva migrans*: a report of three cases and review of the literature. *Int J Dermatol*. 52: 327-330.
- Wharton D. (1980). Nematode egg-shells. *Parasitology*. 81: 447-463.
- Wise ME, Sorvillo FJ, Shafi r SC, Ash LR, Berlin OG. (2005). *Baylisascaris procyonis*, the common roundworm of raccoons: a review of current literature. *Microbes Infect*. 7: 317-323.
- Wolfe A, Wright IP. (2004). Parasitic nematode eggs in fur samples from dogs. *Vet Record*. 154, 408-409.
- Woolhouse ME, Gowtage-Sequeria S. (2005). Host range and emerging and reemerging pathogens. *Emerg Infect Dis*. 11: 1842-1847.
- Wright DA, Mcanulty RW, Noonan MJ, Stankiewicz M. (2003). The effect of *Duddingtonia flagrans* on trichostrongyle infections of Saanen goats on pasture. *Vet Parasitol*. 118: 61-69.
- Yang J, Tian B, Liang L, Zhang KQ. (2007). Extracellular enzymes and the pathogenesis of nematophagous fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*. 75: 21-31.

- Yoshikawa M, Nishiofuku M, Moriya K, Ouji Y, Ishizaka S, Mikasa K, Hirai T, Mizuno Y, Ogawa S, Nakamura T, Maruyama T, Akao N. (2008). A familia case of visceral toxocariasis due to consumption of raw bovine liver. *Parasitol Int.* 57: 525-529.
- Zacharasiewicz A, Auer H, Brath H, Stohlhofer B, Frank W, Aspöck H, Zwick H. (2000). *Toxocara* and bronchial hyperreactivity-results of a seroprevalence study. *Wien Klin Wochenschr.* 112: 922-926.
- Zareen A, Siddiqui IA, Aleem FZ, Aki MJ, Shaukat SS. (2001). Observations on the nematocidal effect of *Fusarium solani* on the root-knot nematodes *Meloidogyne javanica*. *J Plant Pathol.* 83: 207-214.
- Zhou C, Li M, Yuan K, Deng S, Peng W. (2012). Pig *Ascaris*: an important source of human ascariasis in China. *Infect Genet Evol.* 12: 1172-1177.

