



TESIS DOCTORAL

TÍTULO

El zorro rojo (*Vulpes vulpes*) como especie centinela en el monitoreo de zoonosis de ciclo directo (*Trichinella* spp) e indirecto (*Spirocerca* spp), y la interacción con el medio ambiente.

NOMBRE Y APELLIDOS DEL AUTOR/A

D. MANUEL MARTÍN PÉREZ

PROGRAMA DE DOCTORADO

SALUD PÚBLICA Y ANIMAL

Conformidad de directora y coodirector

D^a. EVA MARÍA FRONTERA CARRIÓN

D. JUAN ENRIQUE PÉREZ MARTÍN

Esta tesis cuenta con la autorización del director/a y coodirector/a de la misma y de la Comisión Académica del programa. Dichas autorizaciones constan en el Servicio de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad de Extremadura.

AÑO DE LECTURA

2022

Conformidad de los Directores:

Eva María Frontera Carrión, Doctora en Veterinaria, Profesora Titular del Área de Parasitología, Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura.

Informa:

Que el licenciado en Veterinaria por la Universidad de Extremadura **D. MANUEL MARTÍN PÉREZ** ha realizado en esta Unidad, bajo mi dirección y junto con la supervisión del Doctor D. Juan Enrique Pérez Martín, como codirector, el presente trabajo de investigación titulado “El zorro rojo (*Vulpes vulpes*) como especie centinela en el monitoreo de zoonosis de ciclo directo (*Trichinella* spp) e indirecto (*Spirocerca* spp) y la interacción con el medio ambiente.”, con el que opta al título de Doctor en Veterinaria.

Que en todo momento ha demostrado gran rigor científico en el desarrollo de esta memoria, utilizando todos los medios puestos a su alcance para la consecución de los objetivos marcados.

Por todo lo cual, y para que conste en su memoria de Doctorado, firmo, junto con el codirector, el presente informe en Cáceres, a 1 de noviembre de 2022.

Directora: D^a Eva María Frontera Carrión

Codirector: D. Juan Enrique Pérez Martín

La presente Tesis Doctoral está elaborada en el formato de compendio de publicaciones, según el Artículo 33 de la Resolución de 14 de diciembre de 2021, por el que se aprueba la Normativa Reguladora de los Estudios de Doctorado (DOE de 28 de diciembre de 2021), e incluyen los siguientes artículos, publicados en revistas científicas internacionales indexadas en el Journal Citation Reports (JCR):

1. **«Occurrence, prevalence, and explanatory environmental variables of *Spirocerca vulpis* infestation in the foxes of western Spain»**
Manuel Martín-Pérez. Jorge M, Lobo. Juan E, Pérez-Martín. Daniel Bravo-Barriga. Javier Galapero. Eva M, Frontera.
Parasitology Research 2019. 119(3), 973-983.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06590-6>
Factor de impacto (2019-2020) 1.641
2. **«Characterization of lesions induced by *Spirocerca vulpis* (Spiruridae: spirocercidae) in red foxes (*Vulpes vulpes*)»**
Manuel Martín-Pérez. Luis Gómez-Gordo. Javier Galapero. Juan E, Pérez-Martín. Daniel Bravo-Barriga. Rafael Calero-Bernal. Eva M, Frontera.
Journal of Wildlife Diseases 2022. 58(1), 137-147.
DOI: 10.7589/JWD-D-20-00162
Factor de impacto (2021) 1.187
3. **«First detection of *Gongylonema* species in *Geotrupes mutator* in Europe»**
Daniel Bravo-Barriga. Manuel Martín-Pérez. Jorge M, Lobo. Ricardo Parreira. Juan E, Pérez-Martín. Eva M, Frontera.
Journal of Nematology 2021. Vol. 53
DOI: 10.21307/jofnem-2021-050
Factor de impacto (2019-2020) 1.4.

En la presente Tesis Doctoral también han sido publicados, dos trabajos más sobre *trichinellosis* en zorros. Uno de ellos en forma de comunicación a congreso, y el otro se presenta aquí por primera vez, siendo una investigación aún pendiente de divulgación a través de revistas indexadas.

4. «Survey of *Trichinella spp.* in wild mesocarnivores from Castilla y León, Spain»

Rafael Calero-Bernal*, Manuel Martín-Pérez*, Daniel Bravo-Barriga, Juan Blanco-Ciudad, Eva Frontera, Francisco Javier Serrano-Aguilera, Juan Enrique Pérez-Martín, David Reina.

XX Congreso SOCEPA

Celebrado entre los días 19 y 21 de julio de 2017

San Cristóbal de la Laguna (Tenerife)

5. «Presencia y distribución de *Trichinella spp.* en zorros y otros mesocarnívoros en Castilla y León (España)»

*“La verdadera ignorancia,
no es la ausencia de conocimientos,
sino el hecho de negarse a adquirirlos.”*
(Karl Popper)

Agradecimientos.

Quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas e instituciones, que de una manera u otra, han participado en la elaboración de esta tesis.

En primer lugar, quiero dar las gracias:

A la Universidad de Extremadura por acogerme en su tutela académica para el desarrollo de mi formación investigadora, siendo su facultad de veterinaria estandarte en mi profesión veterinaria y prestando siempre un gran interés por el desarrollo científico de los procesos relacionados con la sanidad animal pero también con la salud humana.

A mi directora, la Dra. D^a Eva María Frontera Carrión, por sus consejos y fe incondicional en este proyecto, y su paciencia, trabajo y correcciones, sin las cuales no hubiera podido terminar esta tesis.

A mi codirector, el Dr. D. Enrique Pérez Martín, por su esfuerzo y confianza depositada en mí.

Al Dr. D. Javier Galapero Arroyo, por su imprescindible colaboración con la Inmunohistoquímica, los buenos momentos y la amistad que esta tesis nos ha traído.

Al Dr. D. Daniel Bravo Barriga, por todos los esfuerzos que ha hecho a lo largo de estos años, para que no perdiera el rumbo y pudiera finalizar esta etapa de mi vida.

Al Dr. D. Jorge Miguel Lobo, por su inestimable ayuda y el esfuerzo que realizo con los coleópteros, agradecerle esta trasferencia de conocimientos.

Al Dr. D. Rafael Calero Bernal, gracias por hacer más gratas mis visitas a la Universidad, por contagiar ese rigor científico, esa capacidad de trabajo, y por contribuir en ese aprendizaje en el método científico.

Gracias a mi familia: a mi hijo Manuel, su apoyo y su cariño sirvieron de estímulo para mis esfuerzos, todo un campeón con el que la vida me ha enseñado lo que es el amor por los hijos; a mi hija Sara que crecía mientras todo iba desarrollándose, para que lo tenga de ejemplo, que el esfuerzo en la formación es una de las principales herramientas para el desarrollo personal y que siempre trae su recompensa, sirva este proyecto como aprendizaje en su camino de la vida. A mi mujer por su sacrificio y comprensión a lo largo de estos años, siempre sumando. A mis padres que sin ellos no hubiera sido posible nada de todo esto, ellos comenzaron con mi educación, para años después inculcarme el camino del esfuerzo y el trabajo que es el único que nos lleva a lograr nuestras metas, siempre estáis ahí para lo que he necesitado, para darme todo lo que fuerais capaces. A mis hermanos, por cuidarme y preocuparos por mí. Porque, aunque a veces no lo demuestre, todos vosotros juntos, hijos, esposa, padres y hermanos sois las personas a las que más quiero y más importantes de mi vida.

A todas las personas que de algún modo habéis colaborado aportándome muestras y datos sobre las mismas, mención especial merecen aquellos que habéis pasado a ser mis amigos, tuve la suerte de que os conocí a lo largo de estos años con la ocasión que me dio la vida con esta investigación. Comenzasteis prestándome vuestra ayuda y colaboración desde la gestión en los cotos cinegéticos para terminar fraguando en muchas ocasiones un estrecho vínculo de amistad. Especialmente a Javier Calderón (Guadramiro) un incansable y soñador, pero sobre todo amante de los animales, comenzaste desconfiando sobre mis verdaderos motivos del estudio, y te convertiste en amigo para siempre, quien da y ofrece todo cuanto tiene es digno de recibirlo todo a cambio. Andrés García (Fuenteguinaldo) uno de los grandes maestros que he tenido y conocedor como pocos de la especie centinela que nos sirvió de base en este estudio, personas como tú son necesarias y convendría se mantuviesen en el mundo rural como signo inequívoco de la cultura y la tradición. Luis García apodado por sus orígenes como “el Sayagues”, junto a su cuadrilla del coto de Villaseco de los Reyes, te convertiste en el segundo maestro en las enseñanzas sobre los conocimientos acerca del raposo, tú afición y entrega a la caza pudo aportar muchas de las muestras de este estudio. Bernardo Pérez (Pasariegos) quien me iba a decir a mí que tú conocimiento sobre la fauna silvestre y tú entrega y esfuerzo conmigo me iba a transmitir tanta información y conocimientos, ser un hombre como tú, de otra época, sumergido en la octava década de vida y con la ilusión intacta y la sabiduría y experiencia que atesoras, fuiste otro maestro en mis enseñanzas. Gabriel Herrero otro gran amante del medio rural (desde Monleras), no solo me ayudaste, si no que gracias a ti otras muchas personas colaboraron. Fernando Pantoja (Bermillo Sayago) trasfronterizo, como si lo tuyo desde siempre hubiese sido el paso entre fronteras donde desarrollaste tú labor en la aduana. Sergio Martín el que para mí siempre serás el joven rapaz que, con tú sonrisa y amor por la naturaleza, te mimetizas en la sierra en la que tiene tus raíces, Linares de Riofrío. Raúl Martín (“Finca Abusejo” Valdemierque), Francisco De la Nava (Santiago de la Puebla), gente sencilla, pero con grandes valores, dispuestos siempre a ayudar.

Gracias nuevamente a todos vosotros, por ayudarme, ahora nos une el vínculo de la amistad, gracias nuevamente a otros muchos colaboradores en el aporte de muestras que por ser tantos se hace complicado describiros en pocas líneas, pero que sin vuestra ayuda y colaboración nada habría sido posible, y agradeceremos también a todos, los buenos momentos que hemos vivido en todos estos años.

Índice

Resumen	17
Summary	19
Esquema de la memoria	21
Capítulo 1.- Presentación	23
1.1.- Interconexión entre los trabajos	25
1.2.- Introducción general	26
1.3.- Objetivos	29
Capítulo 2.- Medio ambiente y hospedadores	31
2.1.- Medio ambiente	33
2.1.1.- Clima y condiciones topoclimáticas en la zona de estudio	33
2.1.2.- Cambio climático	35
2.1.3.- El ecosistema de la dehesa	37
2.1.4.- Interfaz “hombre – animales domésticos – vida silvestre “	38
2.2.- Los hospedadores	40
2.2.1.- Hospedador definitivo: el zorro (<i>Vulpes vulpes</i>)	40
2.2.1.1.- Encuadre taxonómico y morfológico	41
2.2.1.2.- Distribución, territorio y estructura social del zorro	42
2.2.1.3.- Dieta	45
2.2.1.4.- Determinación de la edad	52
2.2.2.- Hospedador intermediario: los escarabajos	52
Capítulo 3.- Enfermedades parasitarias	57
3.1.- Trichinellosis	59
3.1.1.- Etiología	59
3.1.2.- Epidemiología	62
3.1.3.- Diagnóstico de la trichinellosis	66
3.1.4.- Legislación sobre trichinellosis	70

3.2.- Espirocercosis	72
3.2.1.- Etiología	72
3.2.2.- Taxonomía de <i>Spirocerca lupi</i>	74
3.2.3.- Ciclo biológico de <i>Spirocerca lupi</i> y <i>Spirocerca spp.</i>	81
3.2.4.- Epidemiología	85
3.2.5.- Patogenia	91
3.2.6.- Sintomatología y lesiones de <i>Spirocerca spp.</i>	92
3.2.7.- Diagnóstico de <i>Spirocerca lupi</i>	95
3.3.- Gongylonemosis	99
3.3.1.- Etiología	99
3.3.2.- Especies de <i>Gongylonema</i> descritas en España	102
3.3.3.- Ciclo de vida de <i>Gongylonema spp.</i>	103
3.3.4.- Hospedadores intermediarios de <i>Gongylonema spp.</i>	106
Capítulo 4.- Inmunidad por parásitos	107
4.1.- Inmunidad	109
4.1.1.- Tipos de inmunidad	109
4.1.1.1.- Inmunidad innata	111
4.1.1.2.- Inmunidad adquirida	111
4.2.- Marcadores Inmunohistoquímicos	115
4.2.1.- Origen de los marcadores	115
Capítulo 5.- Resultados	119
5.1.- Resultados publicados	122
5.1.1.- Occurrence, prevalence, and explanatory environmental variables of <i>Spirocerca vulpis</i> infestation in the foxes of western Spain	122
5.1.2.- Characterization of lesions induced by <i>Spirocerca vulpis</i> (Spiruridae: spirocercidae) in red foxes (<i>Vulpes vulpes</i>)	135
5.1.3.- First detection of <i>Gongylonema</i> species in <i>Geotrupes mutator</i> in Europe	148
5.1.4.- Survey of <i>Trichinella spp.</i> , in wild mesocarnivores from Castilla y León, Spain	158

5.2. - Otros resultados	160
5.2.1- Ampliación de los estudios sobre distribución de la trichinellosis en zorros y otros mesocarnívoros en Castilla y León (España)	160
Capítulo 6.- Discusión general	171
Capítulo 7.- Conclusiones	187
Índices	191
Índice de abreviaturas	193
Índice de imágenes	201
Índice de figuras	205
Índice de tablas	209
Anexos:	213
Anexo 1. Resumen método de referencia digestión enzimática	215
Anexo 2. Resumen norma ISO 18743: 2015	221
Anexo 3. Datos muestreo <i>Trichinella</i> por municipios	235
Anexo 4. Tabla 22 Principales diferencias entre los métodos de detección de triquinas propuestos en la legislación	239
Anexo 5. Imágenes con las peculiaridades del proceso digestión enzimática 12, 13, 14, 15, 16	243
Anexo 6. Representación de las prevalencias <i>Spirocerca vulpis</i> por municipios en las provincias de Salamanca, Zamora y en las provincias muestreadas de Castilla y León (Figura 10, 11, 12)	251
Anexo 7. Autorizaciones de las revistas científicas para el uso de los derechos de reproducción	257
Bibliografía	267

Resumen.

La lucha y la prevención de los procesos patológicos en los que la interacción entre el ecosistema, el hombre y los animales influya en la evolución de estos, debería enfocarse de manera global bajo el enfoque *One Health*. Una herramienta para establecer la presencia de enfermedades en un ecosistema, es el monitoreo de especies silvestres que actúen de centinela en los procesos, estableciendo así una vigilancia pasiva de la fauna silvestre. Con esta premisa, el presente estudio se centra en dicha vigilancia, en concreto en la evaluación de dos parasitosis en el zorro como especie centinela silvestre; una zoonosis de ciclo directo, como la trichinellosis, y otra de ciclo indirecto, como la espirocercosis. El estudio se ha desarrollado en zonas del oeste de Castilla y León, pudiendo determinar las zonas de mayor riesgo de estas enfermedades.

Los resultados de esta vigilancia siguen indicándonos la presencia de *Trichinella* en el ecosistema silvestre, pese a la rigurosa legislación en los controles sanitarios oficiales de las carnes de consumo humano en las dos últimas décadas. Se encontraron 4 áreas de mayor riesgo en la transmisión de *Trichinella* spp., por lo que la vigilancia de las producciones ganaderas con destino al consumo humano debería intensificarse en dichas zonas.

La espirocercosis puede tener graves consecuencias para los perros, por lo que puede resultar de gran interés la vigilancia pasiva de esta enfermedad mediante el muestreo del zorro en zonas más rurales. Las lesiones en esta especie silvestre se hallaron mayoritariamente en la mucosa del estómago y sin evolución hacia formas neoplásicas, a diferencia de lo encontrado en otras investigaciones en el perro, con localización esofágica y evolución a sarcomas malignos. El estudio reveló que el agente causal en el zorro se debió a *Spirocerca vulpis*, a diferencia del perro, que suele estar parasitado por *Spirocerca lupi*. La prevalencia encontrada fue del 6,09 %, siguiendo un patrón epidemiológico muy dependiente de las variables topoclimáticas. La variable más influyente en la presencia del parásito fue la temperatura mínima mensual, observando mayor prevalencia en las zonas donde más elevadas son las temperaturas mínimas mensuales. Las zonas de dehesa, con mayores cargas ganaderas y las ubicaciones más al oeste se mostraron como las de mayores prevalencias y con una mayor predisposición a la presencia de hospedadores intermediarios (escarabajos coprófagos), que condicionan el éxito del ciclo del parásito.

En la búsqueda de las especies de escarabajos coprófagos que intervienen como hospedadores intermediarios en el ciclo de la espirocercosis en la zona de estudio, se encontraron larvas parasitarias en el interior de *Geotrupes mutator*, aunque el análisis molecular y el de microscopia electrónica demostró la identificación de las mismas como *Gongylonema* spp. Esta ha sido la primera descripción de *Gongylonema* spp. en este escarabajo en Europa. La falta de datos bibliográficos descriptivos morfológicos y de secuencias moleculares de las distintas especies de *Gongylonema* spp., no permitió relacionar las larvas encontradas con ninguna especie concreta, por lo que se desconoce si se trata de una nueva especie o de alguna ya descubierta, pero no descrita por esa carencia de información bibliográfica. No obstante, con estos hallazgos, se ha aportado nuevo conocimiento científico de estas larvas, para que en un futuro pueda ser resuelto el enigma de la identificación de estos vermes encontrados en el escarabajo *G. mutator*.

Summary

The fight and prevention of pathological processes in which the ecosystem, man and animal interaction is influenced by evolution, can only be approached from the perspective of the *One Health* approach. A tool to establish the presence of diseases in an ecosystem is the monitoring of wild species that act as sentinels in the processes, thus establishing passive surveillance of wildlife. The present study focuses on such surveillance, specifically in the evaluation of two parasitic diseases in the fox as a wild sentinel species: a direct cycle zoonosis, such as trichinellosis, and an indirect cycle zoonosis, such as spirocercosis. The study has been carried out in the west of Castilla y León, to determine the greatest risk areas of these diseases.

The results of this surveillance indicate the presence of *Trichinella* in the wild ecosystem, despite the rigorous legislation in the official sanitary controls of meat in the last two decades. Four areas of greatest *Trichinella* risk were found, therefore, surveillance of livestock production for human consumption should be intensified in these areas.

Spirocercosis can have serious consequences for dogs, so passive surveillance by sampling foxes in rural areas may be of great interest. The lesions in this wild species were found mainly in the mucosa of the stomach. There were not evolution towards neoplastic forms, different from what was found in other investigations in dogs, with esophageal location and evolution to malignant sarcomas. The study revealed that *Spirocerca vulpis* was the causal agent in the fox, unlike the dog which is usually parasitized by *Spirocerca lupi*. The prevalence found was 6.09%, following an epidemiological pattern highly dependent on topoclimatic variables. The most influential variable for the presence of the parasite was the minimum monthly temperature. It was observed a higher prevalence in the areas where the minimum monthly temperatures are higher. The dehesa ecosystem with higher livestock density and the locations further to the west were shown to be the ones with the highest prevalence. These areas have also high densities of intermediate hosts (dung beetles), which determine the success of the parasite cycle.

Parasitic larvae were found inside *Geotrupes mutator* while searching species of coprophagous beetles that act as intermediate hosts in the spirocercosis in the study area. These larvae could be identified as *Gongylonema* spp. by molecular analysis and by electron microscopy. This has been the first description of *Gongylonema* spp., in this beetle in Europe. The lack of a morphological description, as well as the lack of molecular sequences of *Gongylonema* spp in the bibliographic search, did not allow the larvae found to be related no specific species. It is unknown it is a new species or a specie previously discovered but not properly described due to the lack of bibliographic information. However, new scientific knowledge of these worms has been provided, so the enigma of identifying the findings found in the beetle *G. mutator* may be resolved in the future.

Esquema de la memoria.

Este proyecto de tesis doctoral se basa en un compendio de artículos científicos sobre la presencia de *Trichinella* spp. y de *Spirocerca* spp., en el zorro y otros carnívoros silvestres en zonas del oeste español. Dado que esta última parasitosis utiliza escarabajos coprófagos como hospedadores intermediarios, el análisis de éstos en la zona de estudio conllevó la visualización de otro parásito de carácter zoonótico: *Gongylonema* spp.

Esta memoria de tesis se desarrolla en 7 capítulos, algunos de los cuales contienen a su vez varios apartados.

Capítulo 1.- Presentación.

En este capítulo presentamos a su vez el contenido de tres apartados, el primero de ellos comienza con un apartado de descripción de la interconexión que mantienen los trabajos y publicaciones efectuados en esta investigación. A continuación, se hace una introducción general de las líneas de investigación del proyecto de tesis, destacando la importancia del concepto *One Health* para el control de las enfermedades zoonóticas. En el último apartado de este capítulo se marcan una serie de objetivos en la investigación sobre los que trataremos de aportar luz a lo largo de este proyecto.

Capítulo 2.- Medio ambiente y hospedadores.

En este capítulo sientan algunas de las bases científicas relacionadas con dos apartados como son el medio ambiente y los hospedadores.

En relación con el medio ambiente, aspectos a tener en cuenta como la climatología y la interfaz, dando muchas de las claves necesarias para entender las peculiaridades del ecosistema mediterráneo de la dehesa.

En el otro apartado de este capítulo hacemos referencia a los hospedadores, el hospedador definitivo que es al animal utilizado como centinela en esta tesis, que es el zorro rojo (*Vulpes vulpes*), y un hospedador intermediario como son los escarabajos coprófagos familia *Scarabaeidae*.

Capítulo 3.- Enfermedades parasitarias.

En este apartado hacemos un repaso a las características de las enfermedades parasitarias que hemos encontrado a lo largo de este proyecto de investigación: *Trichinella* spp., *Spirocerca* spp. y *Gongylonema* spp.

Capítulo 4.- Inmunidad por parásitos.

A lo largo de este capítulo repasamos algunos conceptos sobre la inmunidad y la inmunohistoquímica.

Capítulo 5.- Resultados publicados.

A lo largo de este capítulo exponemos los resultados en dos apartados, uno de ellos expone los resultados mediante sus divulgaciones científicas a través de 3 artículos científicos y 1 comunicación a Congreso como son.

Publicación. - Occurrence, prevalence, and explanatory environmental variables of *Spirocerca vulpis* infestation in the foxes of western Spain.

Publicación. - Characterization of lesions induced by *Spirocerca vulpis* (Spiruridae: spirocercidae) in red foxes (*Vulpes vulpes*).

Publicación. - First detection of *Gongylonema species* in *Geotrupes mutator* in Europe.

Congreso. - Survey of *Trichinella* spp., in wild mesocarnivores from Castilla y León, Spain.

En el segundo apartado de este capítulo se describe otros trabajos de investigación relacionados y pendientes de publicar que presentamos aquí como novedosos bajo el título:

Presencia y distribución de *Trichinella* spp. en zorros y otros mesocarnívoros en Castilla y León (España).

Capítulo 6.- Discusión

A lo largo del capítulo se discuten los resultados obtenidos.

Capítulo 7.- Conclusiones

En este último capítulo se añaden las conclusiones finales de la investigación en base a los objetivos iniciales planteados.

Completan esta tesis doctoral el apartado dedicado a anexos que documentan algunos detalles utilizados a lo largo de este estudio general, algunos de los cuales hemos creído conveniente documentar aquí.

En último lugar se presenta la sección que enumera la bibliografía a la que se hace referencia en este proyecto de investigación.

Capítulo 1.- Presentación

1.1.- Interconexión entre los trabajos

En este estudio tratamos de monitorear algunas enfermedades parasitarias en uno de los ecosistemas más típicos de la Península Ibérica, en la región oeste de Castilla y León (CyL), como es la dehesa. Para ello, se optó por el zorro (*Vulpes vulpes*) como especie centinela. Su abundancia, su versatilidad para adaptarse a estos ambientes humanizados, y la posibilidad de monitorearlo a través de las capturas del control poblacional con las normativas de vedas de caza, lo convierten en un buen candidato como especie centinela.

Estudiamos dos tipos de enfermedades según su transmisión; una enfermedad parasitaria de ciclo de vida directo, como es la trichinellosis, sin la intervención de hospedadores intermediarios, y, por otro lado, una enfermedad parasitaria cuyo ciclo de vida de transmisión es indirecto, como es la espirocercosis, donde se necesita un hospedador intermediario (HI). Se ha seleccionado la primera de ellas por su interés en relación con la salud humana y su importancia como zoonosis a la hora de producir y consumir alimentos. La investigación se dirigió al estudio epidemiológico y la distribución de la zoonosis causada por *Trichinella* spp. en un ciclo de vida silvestre, a través de la prevalencia en el zorro, para tratar de localizar las áreas de mayor intensidad de infección en los ecosistemas con el fin de prestar una especial atención a las medidas preventivas. Fruto de estos estudios se presentan 2 trabajos:

- **“Survey of *Trichinella* spp., in wild mesocarnivores from Castilla y León, Spain.”**
- **“Presencia y distribución de *Trichinella* spp., en zorros y otros mesocarnívoros en Castilla y León (España)”**.

Bajo este mismo concepto del zorro como animal territorial y su versatilidad y adaptación a diferentes dietas en algunos momentos del año, dirigimos nuestros esfuerzos a investigar la espirocercosis. La patología causada por *Spirocerca* spp., en los perros puede ocasionar consecuencias graves para su salud, por lo que conocer los lugares de mayor riesgo epidemiológico a nivel silvestre ayudaría a optimizar los esfuerzos en su prevención. Las condiciones ambientales del ecosistema de la dehesa se ven continuamente amenazadas por el cambio climático, que además puede afectar a los mecanismos de transmisión de las enfermedades, a la distribución de las mismas o a la pérdida de biodiversidad el ecosistema. Fruto de este interés científico se ha publicado el siguiente trabajo científicos:

- **“Occurrence, prevalence, and explanatory environmental variables of *Spirocerca vulpis* infestation in the foxes of western Spain”**

Una vez determinados los aspectos ambientales en la epidemiología de *Spirocerca vulpis*, y confirmada la existencia de esta nueva subespecie parásita en el zorro, surgió la necesidad de establecer la evolución y gravedad de la fisiopatología de esta nueva subespecie

en esta especie animal. La tipificación de las lesiones y su posible evolución a procesos de índole tumoral, así como los mecanismos dirigidos por el hospedador definitivo (HD), a contrarrestar el proceso parasitario derivó en la publicación del siguiente artículo:

- **“Characterization of lesions induced by *Spirocerca vulpis* (Spiruridae: spirocercidae) in red foxes (*Vulpes vulpes*)”**.

Una vez conocida la prevalencia de la espirocercosis en el zorro de la zona de estudio, imperaba la necesidad de establecer cuáles eran las familias o géneros de los hospedadores intermediarios que intervenían en el ciclo de vida de transmisión de *Spirocerca vulpis*. El resultado de este trabajo de campo trajo consigo el descubrimiento de varias larvas, en principio de origen desconocido, en el interior de escarabajos de la familia *Geotrupidae*. Esta parte del ensayo experimental permitió la publicación del siguiente artículo:

- **“First detection of *Gongylonema* species in *Geotrupes mutator* in Europe”**

Así pues, estudios como los presentados en esta tesis doctoral han sido realizados gracias a las posibilidades del zorro como especie centinela en el monitoreo de enfermedades infectocontagiosas y vectoriales, incrementando el conocimiento científico actual sobre las mismas. No se debe perder el enfoque “*One Health*” en la lucha frente a las zoonosis, como son la producidas por *Trichinella* spp., y por *Gongylonema* spp. La salud del ecosistema forma parte de este concepto de lucha conjunta de la salud humana. Determinar la evolución de las lesiones que produce *Spirocerca vulpis*, en la especie centinela, bajo la perspectiva de evoluciones distintas a las de *Spirocerca lupi* en perro doméstico, puede contribuir a desmenuzar claves como la especificidad de especie parasitaria – especie parasitada o mecanismos inmunológicos de inmunidad innata, contribuyendo a un mejor conocimiento sobre la parasitosis con consecuencias graves para nuestras mascotas.

1.2.- Introducción general.

La fauna silvestre es uno de los recursos naturales que interacciona con el medio natural que nos rodea, formando parte de la biodiversidad de los ecosistemas. Esta fauna no está exenta de enfermedades víricas, bacterianas, fúngicas y también parasitarias. Todos estos procesos pueden formar parte del equilibrio del ecosistema o ser el detonante que provoque puntos de inflexión. Muchos de estos procesos no son específicos de especie, y así, las parasitosis de las especies silvestres tienen interés por su efecto directo o indirecto sobre la población animal, así como por su importancia desde el punto de vista epidemiológico y su relación con la salud del ser humano o de los animales domésticos (Artois, 1997).

Estas enfermedades parasitarias pueden mostrar una prevalencia muy variable en los animales, dependiendo de la zona en la que éstos se encuentren y de la interrelación existente entre las diferentes especies, tanto domésticas como silvestres. En función de estas preva-

lencias e interrelaciones, el hombre también puede verse afectado por estas enfermedades parasitarias (Bengis, 2002).

Además, en el nuevo siglo, la percepción del ocio ha evolucionado, y cada vez con mayor fuerza y frecuencia las actividades a desarrollar al aire libre se han incrementado, tales como equitación, mountainbike, senderismo, golf, turismo rural, ecoturismo, paseos por zonas periurbanas, que provocan una mayor conexión del hombre con zonas naturales y mayor conexión con animales silvestres (Baidal & Antoni, 2000; Cleaveland *et al.*, 2001).

Fruto de esta forma de disfrutar de estos entornos naturales es donde cabe hacer una revisión y un replanteamiento de varias enfermedades parasitarias y retomar de este modo la importancia que podrían tener en los planteamientos de la salud para nuestras mascotas y de nuestro ganado, y aún más importante, para la salud humana. Las nuevas formas de vida humana facilitan que el hombre y sus mascotas entran en contacto con especies de vida silvestre poco comunes que actúan como hospedadores para muchas enfermedades y zoonosis, como es el caso de la Covid19 y los murciélagos (Platto *et al.*, 2021). La infección bacteriana por *Rickettsia monacensis*, transmitida por la picadura de garrapatas, es otro ejemplo de lo que estamos mencionando (Jado *et al.*, 2007), así como el brote de leishmaniosis en humanos en Fuenlabrada (Madrid), en los que las liebres que frecuentaban parques y jardines y los perímetros de la ciudad actuaron como transmisor de esta parasitosis (Aguado *et al.*, 2013).

A medida que la población humana se expande y los hábitats de vida silvestre disminuyen (debido al cambio climático o destrucción humana del hábitat) puede haber más oportunidades para el contacto entre los seres humanos y la vida silvestre, y esto puede ser un mayor riesgo de transmisión de enfermedades, resaltando la importancia de comprender la enfermedad en el contexto de la ecología de la vida silvestre (Bengis, 2002).

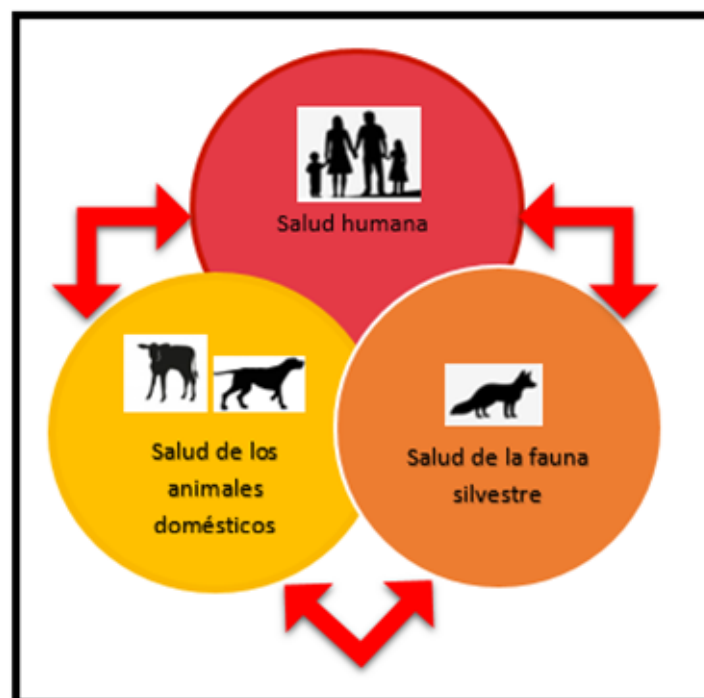


Figura 1. Representación del concepto ONE HEALTH.

En este contexto, es donde en la última década toma cada vez más importancia el concepto de **One Health**, reconociendo que la salud humana, la salud animal y la salud del ecosistema están estrechamente vinculados. *One Health* busca promover, mejorar y defender la salud y el bienestar de todas las especies mediante la mejora de la cooperación y colaboración entre médicos, veterinarios, otros profesionales de la salud científica y profesionales del medio ambiente y promoviendo fortalezas en liderazgo y gestión para alcanzar estos objetivos, viene a ser el concepto *evolucionado de los* principios de la profesión veterinaria tradicional, que ya entre sus lemas representativos figuraban en su escudo los términos del latín "*Higia pecoris, salus populi*", que significa que la higiene de los animales mejora la salud de la población humana.

No se debe caer en el error de pensar que los ciclos biológicos de las enfermedades y los mecanismos de infección y propagación de las mismas son invariables, pues la evolución de la ciencia, los nuevos modelos de monitorización de enfermedades, las nuevas herramientas diagnósticas de biología molecular, las mutaciones, los cambios de equilibrios en la interfaz, etc., podrían informar de nuevas evoluciones en estas enfermedades.

Según la OIE, el 60 % de los patógenos capaces de atacar al hombre y de causar zoonosis, o sea, enfermedades humanas de origen animal, provienen de los animales domésticos o salvajes. En el mismo sentido, según la OIE, hasta el 75% de las enfermedades emergentes que afectan a los humanos se transmiten de manera natural entre animales y personas.

La influencia humana en la interacción, el posible papel del ganado y de los animales de compañía como vínculo entre la vida silvestre y el ser humano, factores relacionados con el HI, los vectores artrópodos, los hospedadores de transporte o paraténicos (HP) y factores ecológicos, pueden reducir o amplificar el riesgo de transmisión de las enfermedades (Gortázar *et al.*, 2016).

Se sabe que los carnívoros silvestres pueden actuar como reservorios de una gran variedad de agentes infecciosos y parasitarios debidos precisamente a sus hábitos carnívoros y/o carroñeros (Artois, 1997; Gortázar, 1999). Entre estos carnívoros, el zorro muestra una gran capacidad de adaptación a diferentes medios, desde áreas periurbanas hasta picos de montaña de alrededor de 3000 metros de altura (Palomo *et al.*, 2007). Este animal parece que desempeña un papel importante en el ciclo epidemiológico de la parasitosis producida por *Trichinella spp* (Criado-Fornelio *et al.*, 2000; Pozio *et al.*, 2001), y su mantenimiento en el ciclo de vida silvestre.

Las nuevas tecnologías y el desarrollo de nuevas técnicas diagnósticas hacen muy probable que se descubran nuevas enfermedades en un futuro próximo, aunque probablemente también sea debido a una mayor concienciación a estudiar este tipo de patologías que intervienen en los ciclos silvestres (Tompkins *et al.*, 2011). Incluso podría darse la circunstancia que, enfermedades que hoy se piensa que están adaptadas a unas especies de hospedadores determinados, en el futuro se descubra que pueden adaptarse a la especie humana y convertirse en zoonosis. En ocasiones, y dada la escasa información existente acerca de las patologías de la fauna silvestre en nuestro entorno, los carnívoros silvestres pueden actuar

como buenos indicadores de las enfermedades presentes en el medio, tanto por su amplia distribución como por sus hábitos alimenticios, su fisiología, su interacción en escalas espaciales y temporales, aportándonos información valiosa acerca de la presencia o ausencia y distribución de determinados agentes patógenos, y las dinámicas de transmisión en la zona de estudio (Tompkins *et al.*, 2011).

Todo ello refuerza la necesidad de profundizar en el conocimiento de la epidemiología y prevalencia de ciertas enfermedades presentes en la fauna silvestre, para poder instaurar medidas preventivas encaminadas a conseguir una disminución de su incidencia y a monitorizar la aparición de procesos exóticos o nuevos (Sainsbury *et al.*, 2001; Chomel *et al.*, 2007; Gortázar *et al.*, 2007).

1.3.- Objetivos.

Tomando como base los argumentos anteriormente expuestos, los objetivos principales que perseguimos con la realización del presente trabajo son:

- 1.- Determinar la presencia y distribución de *Trichinella* spp., en el zorro rojo y otros carnívoros silvestres en el oeste español.
- 2.- Determinar la prevalencia, distribución y factores de riesgo relacionados con el nematodo *Spirocerca* spp. en el zorro rojo en el oeste español.
- 3.- Conocer las características de las lesiones provocadas por *Spirocerca vulpis* en el zorro rojo, desde un punto de vista anatómico, histológico e inmunohistoquímico.
- 4.- Determinar las especies de coleópteros que intervienen en la transmisión de *Spirocerca* spp., así como la prevalencia de este parásito en los mismos y las características que influyen en su parasitación.

Capítulo 2.- Medio ambiente y hospedadores

2.1.- Medio ambiente

2.1.1.- Clima y condiciones topoclimáticas en la zona de estudio.

El clima no es un parámetro cuantitativo, sino que se describe en términos de media en una escala de tiempo determinada y estándar de temperatura (T^a), precipitaciones y vientos. El clima, por tanto, ha de ser considerado como un cómputo de factores, y no de valores puntuales. El clima es el resultado de la interacción de la radiación solar, la órbita terrestre, la latitud y la altitud geográfica, las orientaciones del relieve terrestre respecto al sol, la dirección de los vientos, la composición atmosférica, las corrientes oceánicas, la capa de hielo permanente de la superficie terrestre (efecto albedo) y, sin olvidar los efectos antropogénicos (Fernández, 2013).

Estos factores y sus variaciones en el tiempo producen cambios en los elementos constituyentes del clima, como son la T^a , presión atmosférica, vientos, humedad y precipitaciones.

Teniendo en cuenta que el clima global no existe, siempre se considera el clima desde el punto de vista zonal o regional o desde el punto de vista local, en la que los factores determinantes del clima se refieren a las condiciones físicas y geográficas, que son relativamente constantes en el tiempo y en el espacio y que influyen en el clima en aspectos relacionados con la transferencia de energía y calor. Los de mayor importancia son la latitud, la elevación y la distancia al mar, aunque otros factores también intervienen en las variaciones del clima, como son las corrientes marinas, la cobertura vegetal, los glaciares, los grandes lagos, los ríos y la actividad humana (IPCC. 2007).

La zona de estudio en la que está centrada este proyecto de tesis fue la zona oeste de España, en concreto se analizaron muestras de las provincias de Salamanca, Zamora, Valladolid y Ávila, pertenecientes a la comunidad de CyL, así como algunas muestras de la provincia de Cáceres, en la comunidad de Extremadura. Esta amplia zona se encuentra localizada dentro de un clima mediterráneo continentalizado y bioclimatológicamente quedaría delimitada dentro de un termotipo supramediterráneo inferior con un tipo ombroclimático seco (Rivas Martínez, 1987; Gómez & Gutiérrez *et al.*, 1992; Pinto, 2012). Otras definiciones del clima para el área de estudio lo describen como clima mediterráneo continentalizado, que tiene como características inviernos largos y fríos, veranos cortos y cálidos y además un fuerte contraste entre la T^a durante el día y la noche (Nafría García *et al.*, 2013; Atlas Climático Ibérico, 2011). Por todo esto, se puede afirmar que tiene cierta continentalidad sin ser un verdadero clima continental. Pese a estas influencias de clima continental, el clima, en la zona oeste de CyL, de forma general participa de unas condiciones claramente mediterráneas, es decir, que coinciden en el verano el período de mínimas precipitaciones con el de máximas T^a . La lluvia en esta región se concentra sobre todo en el invierno, con relativamente poca lluvia en el verano. Respecto a la termometría, la mayor parte de la región registra una media anual que oscila entre 11-14 °C, a excepción de las zonas más cálidas de la región entre las que se encuentra, "Las Arribes del Duero", que cuentan con unas T^a medias de 15 °C. El mes más frío es enero con una T^a media de tan sólo 3 °C, con una oscilación inferior a la de otros meses, y una dis-

tribución muy relacionada con la latitud y altitud. El mes más cálido es julio, con T^a medias que superan los 20 °C, pero con una variación desde el suroeste al nordeste mayor a la del mes de enero. Según la clasificación climática de Köppen, la zona de estudio centralizada en el suroeste de la región de CyL correspondería con el clima “Csb” (Mediterráneo con influencia oceánica), debido a su naturaleza y ubicación entre los climas oceánico y mediterráneo típico (Essenwanger, 2001).

Las áreas con mayor heterogeneidad ambiental ofrecen más oportunidades a las especies para su persistencia a largo plazo (Graae *et al.*, 2018). Esta variedad en el territorio implica mayor diversidad climática, florística o edáfica y, en definitiva, mayor probabilidad de encontrar un nuevo nicho próximo o de sobrevivir. La T^a , y las precipitaciones tiene una variabilidad temporal y espacial a lo largo del día, mes y año, siendo un elemento climático muy importante para ser analizado y espacializado. Un análisis de la distribución espacial de las T^a medias, máximas y mínimas mensuales del aire en la escala topoclimática para los municipios, relacionándola con los factores topográficos de cada municipio, junto con otros parámetros topográficos ocasiona una buena fuente de datos para el análisis estadístico mediante modelos predictivos.

La T^a , en particular, ejerce una fuerte influencia en los seres vivos, causando profundos cambios en el comportamiento, la organización, el desarrollo, la distribución temporal y espacial y en la vida útil del organismo. En general, los promedios térmicos más altos de T^a del aire en la superficie ocurren durante el verano, y los más bajos durante el invierno, incluso en lugares con latitudes bajas. La T^a es uno de los factores que más influyen en el desarrollo del clima. Por otra parte, el clima tiene una importancia fundamental en la evolución de todos los organismos (Maclean *et al.*, 2019), determinando, en gran medida, su distribución espacial. Los cambios climáticos pueden causar el aislamiento y extinción de especies y hábitats (Niskanen *et al.*, 2017). La intensidad del impacto en las poblaciones depende, en gran medida, de la exposición de éstas a los cambios climáticos o del sistema en el que se encuentra a las variaciones espacio-temporales del clima (Sandel *et al.*, 2013; Dobrowski *et al.*, 2009).

Factores geográficos como grandes masas de agua (océanos, lagos o ríos), actúan como un regulador térmico de la T^a del aire, tienden a suavizar las fluctuaciones y reducir la amplitud anual (Varejão-Silva, 2006).

El aspecto latitudinal es esencial para cambiar el promedio térmico a medida que se aleja del ecuador y se acerca a los polos. Otro factor clave en la variación de la T^a es la altitud: a medida que aumenta la altitud en la troposfera, la T^a disminuye.

En respuesta a estos cambios, los ecosistemas pueden aumentar su biodiversidad o sufrir influencias negativas, es decir, si en nuestro modelo de estudio la presencia de hospedadores intermediarios aumenta o disminuye según las condiciones climáticas del ecosistema o las épocas del año (Escobar *et al.*, 1995), la infección por *Spirocerca spp* se puede ver afectada. La distribución espacio-temporal de los organismos se explica principalmente por las interacciones que se dan entre ellos, por el régimen climático a través del tiempo y por la disponibilidad de recursos. La transformación y/o desaparición de los bosques modifica sustancialmente la in-

fluencia de tales factores, ocasionando pérdida de especies residentes en las comunidades originales (Van Velzer, 1991). Además, los factores topográficos y las características geofísicas del suelo también han de ser tenidas en cuenta a la hora de valorar la presencia de vida en el ecosistema. El suelo es el sitio de nidificación y cuidado parental de los escarabajos (Hanski *et al.*, 1991; Halffter *et al.*, 1992). En suelos arenosos se presentan menores valores de abundancia y de riqueza (Orozco *et al.*, 2008). El tipo de suelo juega un papel importante en la distribución de las especies, siendo necesario explorar las condiciones del microclima que pueden influir en la presencia de las distintas especies de seres vivos, entre ellos los escarabajos.

Sobre la base de esta consideración se hará un análisis detallado de variables topoclimáticas y medioambientales para detectar influencias sobre las incidencias en la parasitación. Algunos procesos parasitarios requieren de hospedadores intermediarios, como ocurre con *Spirocerca* spp., que requiere de escarabajos coprófagos, el ensamblaje de escarabajos en estos remanentes de bosque estará también influenciado por las variables topoclimáticas y ambientales. Scholtz *et al.* (2009) mencionan especies de escarabajos coprófagos de los bosques, que tienen un microhábitat restringido bajo la corteza y hojarasca, sitios donde pueden estar menos expuestos a variaciones climáticas extremas y a la depredación. Galante *et al.* (1991) mencionan que algunas especies de escarabajos, como *Geotrupes mutator*, dan una mayor preferencia por excrementos situadas bajo el encinar, en contraposición con Lumaret. (1978), quien indica que esta especie se encuentra preferentemente en praderas húmedas y abiertas.

La generación de modelos predictivos de especies ha tenido un crecimiento exponencial durante las dos últimas décadas y, en general, han producido resultados alarmantes sobre la pérdida de biodiversidad (Thuiller *et al.*, 2005; Engler *et al.*, 2011). Se ha puesto de manifiesto mejora predictiva cuando incluyen variables topográficas (Patsiou *et al.*, 2014; Niskanen *et al.*, 2017).

En este contexto, las Tecnologías de la Información Geográfica (TIG) constituyen un conjunto de herramientas de gran importancia, ya que posibilitan la obtención de datos espaciales, como registros climáticos, y el análisis del territorio a partir del procesado de la información geoespacial en Sistemas de Información Geográfica (SIG). La integración de estas tecnologías con otras herramientas permite automatizar procesos y análisis espaciales, así como el tratamiento de datos de teledetección activa y pasiva, facilitando la caracterización de la vegetación y el estudio de la biodiversidad, especialmente a escala local gracias a su capacidad de reproducir con gran precisión los objetos existentes en la superficie (Vogeler & Cohen, 2016).

2.1.2.- Cambio climático

La variabilidad climática se refiere a las fluctuaciones observadas en el clima, alrededor de una condición promedio. La variación observada en el clima durante períodos consecutivos de varias décadas, se llama **cambio climático**. Por tanto, el cambio climático determina diferencias en los valores medios de un elemento climático a lo largo del tiempo (IPCC, 2013).

Los efectos antropogénicos son responsables de la mayor parte del cambio climático, por la rotura de muchos equilibrios biológicos y energéticos. Las actividades humanas (industria, generación de energía con combustibles fósiles, transporte, deforestación etc.), aumentan los gases de efecto invernadero, produciendo el calentamiento de la tierra, y la producción de sulfatos que, actuando como contrapeso (Ballesteros & Aristizabal, 2007). En Europa ha subido la temperatura una media de 0,8°C en los últimos 100 años. Si esta tendencia continúa, es probable que determinadas enfermedades transmitidas por vectores o por hospedadores invertebrados (más sensibles a los cambios climáticos), experimenten cambios en su tendencia durante el invierno, y las nuevas áreas serán adecuadas para la transmisión (AEMA, 2010).

Por su parte, la Península Ibérica (PI) guarda el patrimonio de aproximadamente un 50% de la biodiversidad europea (Williams *et al.*, 2000). En virtud de las modificaciones en los hábitats naturales observadas en las últimas décadas y de las alteraciones climáticas proyectadas para el futuro, se estima que una elevada proporción de la biodiversidad Ibérica puede encontrarse amenazada (Schroter *et al.*, 2005; Thuiller *et al.*, 2005; Huntley *et al.*, 2008). La variabilidad térmica es un determinante significativo sobre la biodiversidad de los escarabajos coprófagos (Nyamukondiwa *et al.*, 2018). Los escarabajos coprófagos, se seleccionan con frecuencia como un grupo indicador de cambios en el hábitat a diferentes escalas, también son utilizados como bioindicadores (McGeoch *et al.*, 2002), ya que son sensibles a la perturbación del hábitat (Klein, 1989; Halffter *et al.*, 1992; Davis & Scholtz, 2001), y a los cambios en la estructura del paisaje (Arellano *et al.*, 2008). En estas circunstancias, el trabajo sobre la espirocercosis que desarrollamos en este estudio y que necesita como HI, a los escarabajos coprófagos, ha de incidir en la importancia del cambio climático y de las condiciones climáticas y ambientales en la epidemiología de la parasitación en el zorro. Se espera que el cambio climático y la pérdida de biodiversidad tenga profundos efectos sobre cómo se estructuran las redes alimentarias y cómo funcionan los ecosistemas (Hooper *et al.*, 2012). Estas variaciones en el clima podrían ampliar aún más los rangos de dispersión de otra de las parasitosis del estudio como *Trichinella* spp., debido a la cada vez más conocida capacidad de algunas de estas especies para tolerar la congelación (Pozio *et al.*, 2006), o la supervivencia en el medio ambiente (Jović *et al.*, 2001).

La evidencia actual sugiere que la variabilidad climática interanual e interdecada tiene una influencia directa en la epidemiología de las enfermedades transmitidas por fases intermedias en otros seres vivos. Esta evidencia ha sido evaluada a nivel continental para determinar las posibles consecuencias del cambio climático futuro esperado (Githeko *et al.*, 2000). El cambio climático crea ganadores y perdedores en las comunidades, de modo que sólo un subconjunto de la especie es resistente al estresante climático (Amundrud *et al.*, 2015; Isbell *et al.*, 2015), esto lleva a la expectativa de que los efectos de selección serán cada vez más importantes bajo estrés climático y los efectos complementarios disminuirán (Steudel *et al.*, 2012).

Por tanto, cabría esperar que el cambio climático modifique el ecosistema en cuanto a vegetación, y por consiguiente, en cuanto a los seres vivos que en él habitan. Los escarabajos son muy sensibles a los cambios de ecosistema, siendo con frecuencia seleccionados

como un grupo indicador de cambios en el hábitat a diferentes escalas, ya que son sensibles a la perturbación del hábitat (Klein, 1989). Esto podría provocar una alteración del ciclo de propagación de los parásitos que estos escarabajos ahora transmiten (*Spirocerca* spp., *Gongylonema* spp., etc.). Si el cambio climático puede ocasionar la pérdida de la biodiversidad, esto también podría provocar nuevos hábitos alimentarios en la dieta del zorro, dada su enorme plasticidad. Quizás en este proceso evolutivo de selección sean los propios parásitos los que evolucionen y la especificidad parásita–hospedador experimente esos cambios. Lo que sí parece claro es que el cambio en el ecosistema propiciado por un cambio climático producirá nuevas simbiosis y cambios adaptativos, por lo que en estas circunstancias los estudios con predictores climáticos pueden ser de gran ayuda.

2.1.3.- El ecosistema de la dehesa

La situación geográfica, así como la alta heterogeneidad espacial y climática de la cuenca mediterránea, han sido factores determinantes que han favorecido la elevada diversidad de especies de plantas y animales (López-López *et al.*, 2011). La continuada intervención del hombre en el modelado de los ecosistemas mediante prácticas tradicionales para la “domesticación del medio”, ha generado un mosaico de “paisajes culturales” (Vos & Meekes, 1999). Mediante la apertura del bosque, se permite el paso de la luz solar fomentando así, una mejora en la producción de gramíneas (López-Sáez *et al.*, 2007). Este manejo en el arbolado realizado por el hombre a lo largo de la historia fomenta que la extensión de la copa sea horizontal, ofreciendo un microclima, permitiendo que el pasto y la vegetación que se encuentra bajo la copa se mantengan verde y provechoso por más tiempo (Gómez-Gutiérrez, 1992; Cabo, 1976). La apertura del bosque original ha buscado generar una reducción en la densidad del arbolado y el matorral para poder someter estas áreas a usos agrícolas y ganaderos, siendo éstos los principales agentes en el modelado del paisaje (Blondel, 2006).

España cuenta con el 40% de las áreas de matorral, pastizal y bosques abiertos manejados mediante prácticas tradicionales de toda Europa (Montero & Serrada, 2013). Este ecosistema tradicionalmente manejado es localmente llamado dehesa y cubre un área de 3 a 4.5 millones de hectáreas aproximadamente, extendiéndose desde la provincia de Zamora hasta el sur de Huelva (San Miguel, 1994), incluyendo el Algarve y el Alentejo en Portugal, donde este mismo ecosistema es llamado “montado” y está representado en menor cantidad, cubriendo 0.7 millones de Ha, del territorio portugués (Pereira *et al.*, 2004). La “dehesa” es un ecosistema agrosilvopastoral ibérico caracterizado por la presencia de ganado y viejos árboles dispersos que se consideran “estructuras clave”, que favorecen la presencia de una amplia gama de biodiversidad. Se trata de un ecosistema de origen antrópico derivado del proceso de aclareo del bosque original, manteniendo algunos árboles dispersos, con la principal finalidad de introducir ganado, y aprovechar al máximo los recursos naturales (García-González, 1979).

La actividad ganadera de la dehesa proporciona excrementos, estos son un importante contribuyente a la biodiversidad en muchos ecosistemas, especialmente en agroecosiste-

mas, atrayendo un gran número de especies de insectos, entre las que se incluyen algunos altamente especializados como los escarabajos coprófagos (Hanski *et al.*, 1991). Los escarabajos coprófagos son un grupo clave asociado con este proceso dinámico, porque juegan un papel importante en el entierro y la eliminación de estiércol, drenan los suelos y ayudan en el reciclaje de materia orgánica y nutrientes (Martín-Piera & Lobo, 1995; Nichols *et al.*, 2008).

Parece estar claro, por lo tanto, que los efectos del pastoreo y la estructura de la vegetación en estas dehesas influyen de manera positiva en la riqueza y diversidad de especies de escarabajos coprófagos. Hay estudios que indican que la cría de ganado mantiene estas dehesas con mayor diversificación de escarabajos, y estas áreas admiten conjuntos de escarabajos coprófagos más diversos que las áreas homogéneas de cubierta vegetal cerrada y arbustiva (Lobo *et al.*, 1990; Lobo *et al.*, 2006). Por lo tanto, la actividad de pastoreo controlado favorece la conservación de la biodiversidad de los escarabajos coprófagos y mejora el funcionamiento del ecosistema al mantener las tasas de descomposición del estiércol (Verdú *et al.*, 2007). Con frecuencia este grupo de escarabajos coprófagos se seleccionan como marcadores de la disminución de la explotación ganadera (Lobo *et al.*, 1990; Verdú *et al.*, 2000; Roslin *et al.*, 2001; Lobo *et al.*, 2006) o un aumento en el pastoreo (Verdú *et al.*, 2007), por lo que la dehesa y su actividad ganadera será fiel reflejo de la abundancia y variedad de estos coleópteros.

2.1.4.- Interfaz “hombre-animales domésticos-vida silvestre”.

Un aumento de la conciencia y la preocupación por el cambio climático en la sociedad ha llevado a algunas personas a preguntarse cómo el cambio climático podría afectar a las enfermedades en animales y humanos y reconocer la importancia de esta interfaz en la que convivimos (Zinsstag *et al.*, 2018). Entendiendo el ecosistema como un todo, surge la tendencia creciente y continua, que incluye un cambio de enfermedades parasitarias o virales a lo largo del tiempo (Wiethoelter *et al.*, 2015). La interfaz hombre-animales domésticos-vida silvestre es un término utilizado para describir áreas en el que los hombres, sus animales domésticos y la vida silvestre comparten el mismo rango ecológico (Bengis *et al.*, 2002; Miller *et al.*, 2013). En esta interfaz, la transmisión de patógenos, entre los cuales se encuentran los parásitos, es bidireccional: de la vida silvestre a los animales domésticos o de los animales domésticos a la vida silvestre (Bengis *et al.*, 2002). Del mismo modo, existen evidencias de transmisión de patógenos desde los humanos a animales, lo que se conoce como “zooantroponosis” o “zoonosis inversa” (Messenger *et al.*, 2014), animales que a su vez actuarían de reservorio para volver a contagiar al hombre. Algunos de los patógenos pueden ser transmitidos a través de exposición directa o por aerosol, mientras que otros son transmitidos por vectores o por los alimentos, pero muchas de estas enfermedades tienen múltiples rutas de transmisión (Trilla, 2020). Por ejemplo, la hidatidosis es una enfermedad parasitaria en la que los zorros pueden actuar como reservorio y también como transmisores de esta parasitosis (Segovia *et al.*, 2004), mientras que *Trichinella* spp., puede transmitirse entre jabalís por necrofagia, o al hombre por consumo de carne de jabalí (Pozio *et al.*, 2009b).

Muchas otras enfermedades pueden transmitirse al ganado o a los animales de compañía por la interfaz de vida silvestre, y la mayoría de ellos se producen en países en desarrollo. Un gran número de estas enfermedades son además de importancia para la salud pública, porque las personas en esos países viven en contacto directo con su ganado o con sus mascotas, en una vida interconexiónada con la naturaleza. Por todo esto, se hace imprescindible conocer el estatus de hospedador que ocupa cada una de las especies implicadas en la circulación de la enfermedad (Caley & Hone, 2004).

En términos físicos, esta interfaz puede ser lineal, por ejemplo, a lo largo de una cerca donde la vida silvestre y los animales domésticos pueden entrar en contacto, o puede ser irregular, con espacios donde la vida silvestre y los animales domésticos tienen más probabilidades de interactuar. Puede ser focal, como en los puntos de agua compartidos por ambos grupos de animales, o difusos, donde se usa el mismo rango y recursos tanto por los animales de la vida silvestre como por los animales domesticados por el hombre (Bengis, 2002; Gortázar *et al.*, 2007).

Los hombres, con su influencia sobre los animales domésticos, desempeñan un papel importante como puente entre la vida silvestre y animales domesticados. Factores relacionados con el hombre influyen en la interfaz amplificando la interacción, haciendo la transmisión de la enfermedad más frecuente y facilitando el contacto entre la vida silvestre y los animales domésticos y, por lo tanto, sus patógenos. Otros factores relacionados con los hospedadores (HD, HI, HP) y factores ecológicos pueden reducir o amplificar el riesgo de transmisión.

Las enfermedades afectan no solo a los animales silvestres, sino a los ecosistemas en su conjunto (Yale *et al.*, 2013). Por ello, el estudio de las enfermedades infectocontagiosas en fauna silvestre demanda la consideración de muchos factores biológicos, ecológicos, políticos y socioeconómicos para poder comprender el impacto que suponen para la conservación de la biodiversidad, la sanidad animal, el comercio internacional y la salud pública. Un ejemplo en el que intervienen todos estos elementos citados es el SARS-CoV, y el SARS-CoV-2 (COVID-19), los orígenes zoonóticos de los coronavirus que se originaron en murciélagos donde no son patógenos (Ye *et al.*, 2020; Zheng *et al.*, 2020).

En la última década toma cada vez más importancia el concepto de *One Health*, reconociendo que la salud humana, la salud animal y la salud del ecosistema están estrechamente vinculados. *One Health* busca promover, mejorar y defender la salud y el bienestar de todas las especies mediante la mejora de la cooperación y colaboración entre ecologistas, médicos, veterinarios, y otros profesionales de la salud científica y del medio ambiente, promoviendo fortalezas en liderazgo y gestión para alcanzar estos objetivos (Gortázar *et al.*, 2007).

Como ya se mencionó anteriormente, el concepto de interfaz describe la interrelación entre humanos, ganado doméstico, fauna silvestre y el medioambiente que les rodea. Entre todos estos componentes se crea, por tanto, una red de conexiones dinámicas que permite el intercambio de patógenos en todas las direcciones. Es precisamente en estos escenarios en los que aumenta la probabilidad de emergencia de nuevos patógenos (Rhyan & Spraker, 2007). La reciente explosión del SARS-CoV-2 (COVID-19) es de nuevo el claro ejemplo de la

bidireccionalidad en la que una especie silvestre, como el pangolín o los murciélagos, parecen ser resistentes a la enfermedad, pero en cambio son capaces de transmitirla al ser humano (Zhang *et al.*, 2020). Existen factores de riesgo importantes en la mayoría de las enfermedades que se propagan a través de la interfaz e influenciadas por el reservorio de vida silvestre. Algunos de estos factores son: la introducción de enfermedades a través de movimientos o desplazamientos de animales salvajes o domésticos; las consecuencias de la masificación de poblaciones de animales domésticos en el ecosistema o incrementos excesivos de determinadas especies de vida silvestre; los riesgos de la cría de ganado al aire libre; la expansión de vectores; la colonización de nuevos territorios por especies invasoras o introducción de hospedadores para estas enfermedades (Gortázar *et al.*, 2007; Chalkowski *et al.*, 2018).

Los cánidos son animales con los que los humanos comparten ecosistemas. En ocasiones estos cánidos son animales domésticos (usados como mascotas) o pueden ser animales para la ayuda en el trabajo en producciones ganaderas, por lo que interaccionan en mayor medida con el ecosistema que en el caso anterior. Otros cánidos son animales de vida silvestre. Precisamente el zorro rojo es uno de los cánidos salvajes europeos más extendidos y que, de manera frecuente, se encuentra en la interfaz con animales domésticos y con el hombre. Es considerada una especie clave en el marco de *One Health* que actúa como un importante reservorio de nematodos intestinales y extraintestinales transmisibles a otros animales y humanos (Karamon *et al.*, 2018; Battisti *et al.*, 2020).

Tabla 1. Clasificación de la subespecie de zorro en la Península Ibérica (*Vulpes silacea*) (ITIS, 2018).

Reino	Animalia
Filo	Chordata
Suborden	Caniformia (Kretzoi, 1938)
Orden	Carnivora (Bowdich, 1821)
Familia	Canidae (Fischer, 1817)
Genero	<i>Vulpes</i> (Frisch, 1775)
Especie	<i>Vulpes</i> (Linnaeus, 1758)
Subespecie	<i>Vulpes silacea</i> (Miller 1907)

2.2.- Los hospedadores.

2.2.1.- El hospedador definitivo: el zorro rojo (*Vulpes vulpes*)

Desde la primera mitad del siglo XX, se han realizado una gran variedad de estudios ecológicos y biológicos sobre esta especie de cánidos silvestres, siendo relevante la gran

cantidad de información generada por los estudios de sus comunidades parasitarias durante este tiempo (King *et al.*, 1984; Davidson *et al.*, 1992a; Davidson *et al.*, 1992b; Harrenstien *et al.*, 1997; Steelman *et al.*, 1998 y 2000). El zorro ha sido propuesto como especie centinela para estudios toxicológicos en España (Quintana Díez, 2013), así como para estudios parasitológicos en otros lugares del mundo (Camacho, 2015). Los zorros habitan una gran variedad de hábitats, intervienen en varios procesos ecológicos, como es la dispersión de semillas, la regulación de la demografía de especies presa o en la distribución y abundancia de otros mesodepredadores, también participan en el ciclo de nutrientes al alimentarse de materia orgánica en descomposición, carroñas y en los ciclos de parásitos de otros animales, incluyendo al ser humano (Morrison *et al.*, 1992; Sunquist *et al.*, 2001; Crooks, 2002; Gehring *et al.*, 2003; Aguirre, 2009; Prough *et al.*, 2009). Por todo esto, en el presente trabajo se ha utilizado el zorro rojo (*Vulpes vulpes*) como especie centinela a monitorear para el seguimiento en el ciclo de vida silvestre de dos parasitosis, una de ellas de ciclo directo como *Trichinella* spp., y la otra de ciclo indirecto como *Spirocerca* spp.

2.2.1.1.- Encuadre taxonómico y morfológico.

La subespecie de zorro que habita la PI es el zorro rojo (*Vulpes vulpes silacea*), cuya clasificación taxonómica es la siguiente (tabla 1).

El zorro *Vulpes vulpes* Linnaeus 1758, es el carnívoro de mayor distribución mundial y está presente en la totalidad del continente europeo. Se trata de una especie común en la PI (Gortázar *et al.*, 2007). De las 35 subespecies descritas por Sillero-Zubiri 2004, se ha pasado con los estudios genéticos a la nomenclatura actual en la que se describen 45 subespecies, cada una de las cuales presenta una distribución geográfica bien definida. Se cree que esta gran variedad de subespecies se debe a la introducción y reintroducción del zorro en diversas regiones del planeta a lo largo de los siglos, asociada a su alta capacidad adaptativa (ITIS, 2018).

La subespecie *Vulpes vulpes* presenta una longitud corporal medida desde la cabeza hasta la inserción de la cola de 455 a 900 mm, mientras que la longitud de la cola es de 300 a 555 mm. Tiene un peso entre los 3 kg y los 14 kg (Larivière & Pasitschniak-Arts, 1996). Destaca la cola larga (70% de la longitud del cuerpo) y poblada de pelo largo acabada en punta con un mechón blanco, uno de los rasgos determinantes que permiten identificar a esta especie. Tiene pocas glándulas sudoríparas en la piel, por lo que regula el sudor a través de las vías respiratorias y la lengua.

Su cráneo es alargado, hocico muy puntiagudo y las orejas grandes y triangulares. Los ojos son pequeños y la pupila es vertical. Su pelaje es suave y espeso de color amarillo-rojizo hasta pardo-rojizo en el lomo (el más habitual) y blanco en la parte inferior, y lo muda una vez al año (de primavera a otoño). Las extremidades son finas y alargadas con respecto al cuerpo, sus patas son negras y los pies pequeños (Larivière & Pasitschniak-Arts, 1996).

El macho ladra y la hembra chilla (López-Martín *et al.*, 2007). La fórmula dentaria es 3.1.4.2/3.1.4.3 (Cabrera, 1914). Morfológicamente la variación no solo ocurre entre individuos

del mismo sexo, sino que también existe variación morfológica entre sexos y a lo largo de su escala de distribución. En general los valores de tamaño corporal están relacionados con la latitud (Bergman *et al.*, 2009), sin embargo, la talla se correlaciona negativamente con la latitud en España (Yom-Tov *et al.*, 2007).

El zorro posee los sentidos del olfato, oído y vista muy desarrollados, lo que condiciona sus patrones de comportamiento (Larivière & Pasitschniak-Arts, 1996). Su actividad es fundamentalmente nocturna, con elevados registros de aparición al amanecer y al atardecer (Palomo *et al.*, 2007), pero también puede mostrar un comportamiento más diurno en las regiones donde el hombre no perturba su presencia aquellas zonas donde no es incomodado por la presencia humana, especialmente en las épocas del año que las noches son cortas (Rau *et al.*, 1988; Sillero-Zubiri *et al.*, 2004).

2.2.1.2.- Distribución, territorio y estructura social del zorro rojo

El zorro rojo tiene en la actualidad el rango más grande de amplitud geográfica de todas las especies de carnívoros, con una distribución que cubre la mayoría de las regiones templadas y subárticas del hemisferio norte (Sillero-Zubiri *et al.*, 2004). Su enorme capacidad de adaptación a cualquier ecosistema, incluidos los antrópicos le ha llevado a colonizar todos los continentes y la mayoría de los países. El zorro es común en toda la PI, considerándose una de las especies de carnívoros más abundantes en la misma (Blanco, 1988; Palomo *et al.*, 2007).

El zorro rojo es un generalista oportunista, altamente plástico y resistente al cambio antropogénico del paisaje (Macdonald & Reynolds, 2008; Díaz-Ruiz *et al.*, 2013). Amplios movimientos de dispersión de los zorros rojos pueden permitir la dispersión de patógenos a otras regiones geográficas (Walton *et al.*, 2018).

En cuanto al hábitat del zorro, debido a su gran plasticidad ecológica, puede ocupar una gran diversidad de hábitats, desde el nivel del mar hasta montañas de 2000 m de altitud, alcanzando las mayores densidades en medios heterogéneos y en áreas que proporcionen una alimentación suplementaria antropogénica (Ballesteros, 1998). Se puede encontrar incluso en las ciudades (Gortázar, 1999). Como se ha mencionado, el zorro presenta cierta predilección por zonas heterogéneas en las que se alternan matorral, bosque y extensiones agrarias, aprovechando también las proximidades de asentamientos humanos, áreas urbanas y periurbanas, haciéndose de este modo antropogénico. La disponibilidad trófica se ha considerado el factor que más condiciona la distribución de esta especie (MacDonald, 1980; Harris, 1981). Las técnicas actuales de monitorización constante por GPS comienzan a ofrecer datos acerca de otros posibles factores de dispersión y de abundancia de poblaciones de zorros que no estarían relacionados solamente con la disponibilidad de alimento (Fuglei & Tarrow, 2019).

La elección del hábitat por el zorro influirá en el estudio de este cánido como animal centinela en el monitoreo de enfermedades infectocontagiosas (entre ellas las parasitarias)

en las que interviene HD. Los requerimientos ecológicos del zorro para adaptarse a cualquier tipo de hábitat son mucho menores que los de sus competidores en la cadena trófica de alimentación y goza de mucha mayor plasticidad a la hora de adaptarse a cualquier ecosistema. Generalmente, las estructuras genéticas de las poblaciones en un territorio no están muy distanciadas entre sí, lo que también sugiere que sus territorios de actuación no son muy extensos (Basto *et al.*, 2016).

El territorio de un zorro equivale al espacio defendido por un animal y que utiliza en exclusividad. Los zorros delimitan sus territorios mediante el marcaje olfativo con orina y secreciones de glándulas odoríferas, entre ellas las de las glándulas perianales que impregnan los excrementos con su característico olor (Blanco, 1990). Los tamaños del territorio varían sustancialmente en función de la disponibilidad y la dispersión del alimento (Harris, 1981; Baker *et al.*, 2000). La dispersión de su principal presa puede condicionar (más que la composición del hábitat) el tamaño del territorio del zorro rojo (Dell'arte & Leonardi, 2005).

Macdonald (1981; 1983) sugirió que el tamaño y la configuración del rango del territorio en el zorro rojo se determinan por la dispersión de parches ricos en alimentos. Existen múltiples evidencias de una fuerte influencia de la riqueza del hábitat en el tamaño del área de distribución de este animal (Harris, 1981). El zorro es una especie que demuestra una gran flexibilidad en la distribución, el comportamiento de alimentación y la estructura social (Cavallini, 1996; Baker *et al.*, 2000).

Pocos estudios han examinado cómo el tamaño de las áreas de distribución del zorro puede verse influenciado por cambios a lo largo de un gradiente de paisaje (Šálek *et al.*, 2015). Los cambios en el paisaje resultantes de la alteración humana (agricultura, urbanización) y el cambio climático (aumento de la estacionalidad) tienen la capacidad de alterar la distribución de los recursos, así como la disponibilidad y previsibilidad de los recursos (Crooks, 2002; Šálek *et al.*, 2015). En paisajes agrícolas más productivos y áreas de asentamientos humanos, las necesidades de recursos a menudo pueden satisfacerse dentro de un área más pequeña (Gortázar, 1999; Panzacchi *et al.*, 2010).

El tamaño del territorio varía de 10 a más de 5000 Ha (Macdonald, 1987; Voigt, 1987). En líneas generales, los tamaños del área de campeo de los zorros son más pequeños a mayores densidades de población y también las distancias de dispersión (Trewhella *et al.*, 1988). En la época de apareamientos, así como en la que ocurren los partos, el tamaño del área de campeo de las hembras se ve reducido. Se hipotetiza que esto es debido a los cambios de necesidades energéticas y cambios asociados al comportamiento de la gestación, la lactación y la crianza de los cachorros (Rau, 1988; Travaini *et al.*, 1993).

Para algunas zonas rurales de Francia se tienen datos de 31-311 Ha de zona de campeo o territorio (media=109 ha/zorro) (Henry *et al.*, 2005); en zonas rurales de Australia de 287-3574 Ha (Carter *et al.*, 2012); en Ontario de 52 ha (Adkins & Stott, 1998), mientras que en zonas urbanas de Zúrich se han descrito áreas de campeo de 28,8-30,8 Ha (Gloor, 2002). En hábitat mediterráneo, en el parque Natural de la costa central de Italia, se han registrado valores medios de área de campeo de 282 Ha (Cavallini & Lovari, 1994).

En la PI, los datos sobre el tamaño del territorio de los zorros son variables. Se ha observado un tamaño medio de 237-1.635 ha/zorro en el Valle del Ebro, donde siendo el índice de mayor rango el correspondiente a zonas de secano y el menor a zonas de regadío. En la Sierra de Guadarrama, los valores encontrados oscilan entre 100-650 ha /zorro (Blanco, 1988), siendo los valores medios menores a 100 ha los que correspondían con zonas de abundante alimento, con hábitat forestal fragmentado y zonas residenciales. En Doñana, los valores obtenidos se sitúan entre 116-130 ha (Rau, 1988). Tamaños más pequeños se han visto en el Parque Natural del Garraf, sierra costera de Barcelona, donde obtienen valores medios de 41,2 ha /zorro (Peris & Del Amo, 2003).

En cuanto a la densidad de animales, en Francia la densidad de zorros descrita es de 0,91 zorros/km² (Henry *et al.*, 2005); mientras que en el Reino Unido se han descrito densidades de 0,21-2,23 zorros/km² en zonas rurales (Webbon *et al.*, 2004). En Croacia, también en zonas rurales la densidad estimada fue de 0,7 zorros/km² (Galov *et al.*, 2014), mientras que en Portugal se han descrito densidades de 0,61 zorros/km² (Sarmiento *et al.*, 2009). Las densidades aumentan por lo general en ambientes antropogénicos y en zonas urbanas, de tal modo que, en ese tipo de hábitats en Zúrich, se han descrito 7,4-11,2 zorros/km² (Gloor, 2002), o en Melbourne, con 16,3 zorros/km² (Marks & Bloomfield, 1999). En zonas urbanas de Reino Unido con mayor abundancia de alimento se han llegado a contar incluso 30 zorros/km² (Heydon & Bulloch, 1997).

En nuestro país los datos sobre las densidades de zorro son también variables debido a la disparidad de los hábitats de unas regiones a otras, la disponibilidad de conejos (mayor en el sur peninsular), o la disponibilidad de roedores (más abundantes en climas atlánticos), así como las influencias estacionales en la disponibilidad de la dieta. En función de todo lo expuesto se han reseñado datos variables que varían entre 0,8 y 20 individuos/km² (Gortázar, 2002). Así, por ejemplo, en el Valle Medio del Ebro, estimadas mediante batidas de caza, la densidad es de 1,1 zorros por km² en el área de secano y de 2,5 zorros por km² en el de regadío (Gortázar, 1999). En Andalucía, las densidades de zorro estimadas en Doñana son de 1,7 individuos/km² (Rau, 1988) mientras que en Granada (en la Sierra de Baza), la densidad encontrada ha sido de 0,9-1,6 (Palomares & Ruíz-Martínez, 1994). En la provincia de Valencia se ha descrito una densidad de 0,8 individuos/km² (Urios, 1990); mientras que en el Parque Natural de "El Hondo" (Alicante), las densidades alcanzan valores medios de 0,55 individuos/km² (Peiró *et al.*, 2009). En sierras de la costa catalana, encuentran una densidad máxima en verano de 7,7 zorros/100 km² y una mínima en otoño de 3 zorros/100 km² (Ballesteros *et al.*, 1998), mientras que otros autores, en esta misma zona observan una densidad de 0,53 zorros/km² (Peris & Del Amo, 2003). En el centro de la PI se ha estimado una densidad promedio de 1,567 ± 0,704 zorros/km² (Ramos, 2016).

En general, los zorros son animales habitualmente territoriales. Socialmente pueden ocupar sus territorios en diferentes grados de relación mostrando una complejidad en su estructura social, que va desde la vinculación de parejas hasta grupos familiares con ayudantes (Cavallini, 1996). Una posibilidad es mediante parejas, siendo una de las hipótesis más probables para esta estructura social (vivir en parejas), cuando los recursos tróficos están

distribuidos en el medio de forma regular. No obstante, en función del hábitat, se han descrito grupos de hasta 6 miembros (usualmente un macho y 2-5 hembras) que comparten el mismo territorio (Macdonald & Reynolds, 2004) y vivirán en grupos si los recursos están irregularmente distribuidos, bien espacial o temporalmente (McDonald, 1981). De esta forma, al compartir un territorio, todos los miembros del grupo pueden beneficiarse durante todo el año de los alimentos estacionales (Blanco, 1990). Estos grupos pueden observarse en otras ocasiones formando estructuras matriarcales (Baker *et al.*, 1998). En los grupos matriarcales, las hembras, probablemente emparentadas, mantienen una relación jerarquizada, con una hembra reproductora dominante, en tanto que el resto, de rango inferior, no se reproducen y actúan como ayudantes, participando en la crianza de los cachorros (Macdonald, 1979, 1981). También existe una proporción de zorros solitarios, o nómadas, sin un territorio definido y que viven paralelamente a los zorros territoriales (Harris & Baker, 2001; Meia & Weber, 1995). En cualquier caso, se trata de una estructura social flexible, ya que cuando la comida escasea, los grupos se rompen y sus miembros se dispersan (Newsome, 1995).

El rango de edad de las poblaciones de zorro ha sido sometido a diferentes estudios. En uno de ellos se determinó el porcentaje de zorros juveniles en dos ecosistemas diferentes: uno en zona de estepa semiárida intercalado con parches de siembra de cereales y donde la presión cinegética sufrida por el zorro fue considerada mucho mayor; y el otro con zonas de valle de regadío “buen hábitat a priori”, con menor presión cinegética y mayor disponibilidad y variedad de alimentos. Pues bien, se encontró un porcentaje de zorros juveniles para las zonas de estepa del 53% y del 67 % en las zonas de regadío. Se observan tasas más elevadas de mortalidad y una mayor tasa reproductiva en poblaciones de zorros que sufren una mayor presión de caza (Gortázar, 1997).

2.2.1.3.- Dieta

La dieta es uno de los aspectos más estudiados de la ecología del zorro rojo. La mayoría de los estudios indican que el zorro rojo es un depredador generalista que usa recursos de acuerdo a su disponibilidad y, por lo tanto, es oportunista en su comportamiento (Webbon *et al.*, 2006; Dell'Arte *et al.*, 2007). Como ya hemos mencionado, su gran habilidad para utilizar los recursos alimenticios existentes les permite colonizar diversos hábitats (Guitian & Bermejo, 1989; Fedriani, 1996; Gortázar, 1998).

Según los datos ecológicos y epidemiológicos de que se dispone actualmente, se considera que la helmintofauna del zorro está relacionada principalmente con la dieta, antes que, con otros factores intrínsecos, como son la edad y el sexo (Richards *et al.*, 1995; Sanchis Monsonís, 2015). Por este motivo, hemos querido describir en este apartado, una descripción detallada de los grupos de alimentos ingeridos por el zorro, las épocas donde con mayor propensión acostumbra a consumir cada tipo de alimentos, parte de los cuales podrían ser directamente reservorios y fuentes de *Trichinella* spp; *Spirocerca* spp, o de *Gongylonema* spp, lo que ayudará a entender mejor la importancia real de la dieta en la transmisión en el ciclo de vida silvestre.

Para el estudio de la dieta del zorro se ha usado el concepto de “frecuencia de aparición” descrito por Barrull & Mate (2007), observando la aparición de restos de alimentos en los excrementos (Rau, 1988; Fedriani, 1996; Dell’Arte *et al.*, 2007), o bien a partir de los contenidos estomacales (Urios y Plou, 1986; Gortázar., 1999; Contesse *et al.*, 2004; Kidawa *et al.*, 2011). Estos trabajos indican que el zorro es un animal omnívoro, pudiéndose alimentar de un amplio espectro de animales, vegetales, carroña y basura. Todos estos estudios coinciden en subrayar su carácter generalista y su comportamiento oportunista.

Su dieta generalista varía mucho de un área a otra, los zorros pueden comer una variedad de alimentos desde frutos a grandes herbívoros (carroña), incluyendo una amplia variedad de invertebrados, principalmente insectos y lombrices, y algunos mamíferos pequeños (Artois, 1989). En ocasiones, pueden consumir materia vegetal, así como también cadáveres de presas muertas por carnívoros más grandes (Helldin & Danielsson, 2007; Elbroch *et al.*, 2017; Sivy *et al.*, 2017), llegando incluso a robar presas a carnívoros como los lobos (Wilmers *et al.*, 2003; Selva *et al.*, 2005). La basura normalmente constituye un buen elemento de recurso en la cadena trófica para los zorros y, por lo tanto, muchas veces se encuentra cerca de vertederos o asentamientos humanos. En ambientes humanizados, aproximadamente la mitad de la dieta está compuesta por basura y carroña de animales domésticos (Palomo *et al.*, 2007).

Algunos autores indican diferencias significativas en la composición de la dieta del zorro rojo según sea invierno o verano, variando además ampliamente en años diferentes, siendo dependiente de la densidad de su presa favorita, los topillos (*Microtus voles*) (O’Mahoney *et al.*, 1999). La gran dependencia de *Microtus voles* puede ser compensada si esta especie escasea, con el aumento en consumo de otros roedores como el topillo rojo (*Clethrionomys glareolus*), el ratón de agua (*Arvicola terrestris*) y la rata almizclera (*Ondatra zibethicus*), como presas alternativas, particularmente durante el invierno (Dell’Arte *et al.*, 2007). Otros datos aportados por estudios han encontrado diferencias significativas en las dietas del zorro no solo dependiendo de la época estival del año, sino también del tipo de hábitat, encontrando diferencias entre estaciones y entre bosques en suelos arcillosos y de buena calidad ecológica y bosques de coníferas áridos y arenosos. Los resultados sugieren que en este tipo de hábitats (Bielorrusia), los zorros rojos tenían una dieta diversificada, que consistía básicamente en diferentes combinaciones de roedores, del tipo topillos (*Clethrionomys glareolus*, *Microtus* spp) y carroña de ungulados salvajes. La importancia de la carroña era mucho mayor en invierno, mientras que las proporciones de aves y frutas crecieron durante la estación cálida. En el bosque ecológicamente rico que se asienta en suelos arcillosos, los zorros confiaban más en roedores, mientras que la carroña y los frutos parecían ser alimentos más importantes del depredador en los bosques áridos dominados por pinares (Sidorovich *et al.*, 2006). En estos climas fríos, las liebres son presas más rentables en términos de biomasa que los roedores, y algunos autores han encontrado que puede compensar la escasez de ratones de *Microtus* spp., en inviernos con nieve profunda (Kauhala & Helle, 2000). En contraposición, otros autores han aportado datos que indican que las liebres fueron cazadas por zorros de manera similar tanto en invierno como en verano (Dell’Arte *et al.*, 2007). Las aves se vuelven más ac-

cesibles en primavera, durante la temporada de cría, y los zorros pueden atrapar aves, especialmente desde los lugares donde se posan y anidan. Por ello, encontramos una tendencia mayor a la predación de aves en primavera y verano que en invierno (Reig & Jędrzejewski, 1988). No se han encontrado diferencias entre el consumo de aves y las densidades de roedores como *Microtus voles*, la presa preferida del zorro, lo que para estos autores sugiere que pese a ser el zorro un depredador generalista, el zorro caza aves como un ritual de juego social (Dell'Arte *et al.*, 2007). Plantas e insectos, han sido reportados como alimentos más elevados durante el verano, estos alimentos se consumieron tanto a altas como a bajas densidades de *Microtus voles* (Dell'Arte *et al.*, 2007).

En el área mediterránea Rau *et al.* (1987) sostienen que la dieta del zorro es muy versátil y que puede ser debida en parte a las diferencias locales de disponibilidad de presas y al elevado oportunismo trófico de estos animales. Por otro lado, variaciones en la distribución de posibles especies de presa en las regiones biogeográficas han sido postulados para afectar los hábitos alimenticios de los carnívoros medianos, por ejemplo, la diversidad dietética en gatos monteses aumenta en latitudes más bajas (es decir, áreas mediterráneas), donde la riqueza potencial de presas es mayor (Lozano *et al.*, 2006). Un estudio en el Valle del Ebro encontró diferencias en la dieta del zorro según el tipo de hábitat, en concreto entre zona de regadío o zona de monte con parches de meseta de cereal (Gortázar, 1999). La misma conclusión es encontrada en el parque de Doñana por Fedriani (1996).

Los efectos de la latitud, longitud y altitud en la composición de las dietas de zorro a mayor escala han permanecido durante muchos años desconocidos. En este sentido, una revisión bibliográfica de 55 estudios previos sobre la dieta del zorro concluyó que había una variación en el consumo de algunas presas preferidas por parte de los zorros, como los lagomorfos o pequeños mamíferos, según las diferentes escalas biogeográficas (Díaz-Ruiz *et al.*, 2013) (tabla 2).

Tabla 2. - Patrón ecológico de alimentación del zorro (Díaz-Ruiz *et al.*, 2013)

	BIOTOPO	TIPO DE ALIMENTOS
Tipo de hábitat	matorral típico mediterráneo	Lagomorfos
	forestal	Pequeños mamíferos
Latitud	hacia el norte	Pequeños mamíferos y frutas
	hacia el sur	Lagomorfos e invertebrados
Longitud	de este a oeste	Pequeños mamíferos
	de oeste a este	Frutas
Altitud	a > altitud	Pequeños mamíferos
	a < altitud	Lagomorfos
Época del año	verano	Reptiles e invertebrados
	otoño	Frutos

En un estudio al noroeste de Portugal (Carvalho & Gomes, 2004), los roedores fueron la presa principal del zorro, compartiendo los recursos de alimentación con otras especies como el gato montés, la jineta o la marta. En estas circunstancias, el zorro ingiere un importante número de roedores en todas las estaciones del año, pero con un pico más pronunciado en la época invernal, mientras que en primavera y verano lo complementa con crías de conejos, incorporando también insectos y artrópodos. Parece que incluso el consumo de estos últimos supone un 30% de media en su dieta en primavera-verano-otoño, especialmente en otoño, en el que se produce un descenso en el aporte a la dieta de roedores debido al incremento de frutas abundantes en esa estación. Se observó un aumento considerable en el aporte de artrópodos en los meses de verano.

Otros datos sobre la alimentación del zorro en la zona oeste de la PI ponen también de manifiesto que el oportunismo del zorro, así como la disposición de alimentos dependen en gran medida del hábitat y de la época del año y de la disponibilidad de alimentos tras compartir hábitat con otros mesocarnívoros con los cuales tiene un alto grado de superposición (> 45%). El patrón observado de plasticidad de los nichos de comida es explicado como una respuesta a las fluctuaciones en la disponibilidad de recursos, característica de los ambientes mediterráneos (Santos *et al.*, 2007). Las poblaciones mediterráneas se tienen que alimentar sobre los recursos disponibles y volverse más omnívoros para subsistir (Santos *et al.*, 2007).

Entre las presas de mayor frecuencia consumidas por los zorros en la PI, podemos hacer un resumen bibliográfico basado en la tabla 3.

Los componentes de la dieta encontrados y que a continuación detallaremos se encuentran en mayor medida, los micromamíferos (ratones, topillos, musarañas); los lagomorfos (conejos de monte y liebres); otros en menor frecuencia como las aves (galliformes, *Sturnus vulgaris*, anseriformes, turdidos, córvidos); los reptiles (culebras, lagartijas, lagartos); peces, anfibios, cangrejos, invertebrados artrópodos (coleópteros, ortópteros); y los no artrópodos (moluscos, anélidos). Otros alimentos circunstanciales o de temporada como carroñas, basuras, o placentas en época de partos, y crías de animales domésticos y frutas de temporada, siempre enfatizando en los recursos concretos y localizados de cada tipo de hábitat (Urios & Plou, 1986). Esta poca especialización responde, principalmente, a que el factor dominante en la dieta del zorro es la disponibilidad espacial y temporal de los recursos alimentarios (Blanco, 1988). Entre los mamíferos, los que con mayor frecuencia son objetivo para ser alimento del zorro son especialmente presas como los lagomorfos (*Oryctolagus cuniculus*) o conejo de monte y los micromamíferos o topillos (*Apodemus* spp., y *Microtus* spp.), predominando los primeros en los ecosistemas mediterráneos del sur Peninsular y los segundos en los ecosistemas templados que se encuentran al norte de España.

Tabla 3. - Descripción de algunas fuentes de alimento según el análisis del contenido gástrico / o de la composición de los excrementos, en términos de frecuencia de aparición (FA).

	Frutas	Lagomorfos	Micromamíferos	Vegetales	Basuras	Carroñas	Aves	Huevos	Reptiles y anfibios	Peces	Insectos
Urios & Plou, 1987. Valencia (n= 130 estómagos + n= 98 excrementos)	9,4	13,4	48,8	12,3	26,3	0,9					
Fedriani, 1996. Doñana (Huelva) hábitat monte (n =129excrementos)	24,8%	55,8 %	7%	7%	27,1%	7%	8,5%				
Fedriani, 1996. Doñana (Huelva) hábitat dehesa (n= 164 excrementos)	6,7%	53%	6,1%	7,3 %	23,2%	16,5%	9,1%				
Gortázar, 1999. Valle Ebro (Zaragoza) regadío (n= 87 estómagos)	6,9%	55,2%	35,6%	57,5	25,3%	1,1 %	18,4%				
Gortázar, 1999. Valle Ebro (Zaragoza) monte y estepa (n=185 estómagos)	32,4	32,4	4,1%	54,2	1,4 %						
Padial <i>et al.</i> , 2002. Sierra Nevada (Granada) hábitat seco (n= 264 excrementos)	24,2%	27,3%	52,5%	2,3%	28,8%	6,1 %	4,6%				
Padial <i>et al.</i> , 2002. Sierra Nevada (Granada) hábitat moderado de humedad (n= 148 excrementos)		52,7%	54,2%	32,4%	4,1%	1,4%					
Ballesteros y Degollada, 2002. Parque N. Sant Llorenç del Munt i l'Obac (Barcelona) (n= 140 excrementos)	44%	1,3%	Hongos 5%	12%	9%	2%					
Fernández & Ruiz de Azua, 2005. Sierra de Árcamo (Álava) (n= 191 excrementos)	37,7%	1,1%	64,3%	2,1%	17,2%	17,8%	0,5%	2,1%			
Santos <i>et al.</i> , 2007. Alentejo (Portugal) (n= 195 excrementos)	2,7%	4,1%							91,2 %		
Barrull y Mate, 2007. Parque Natural Montsant (Barcelona) (n=985 excrementos)	70,8%	1,22%	12,96%	11,6%	7,51 %	1,01%	0,2%				
Martín, 2008. Parque del Garraf (Barcelona) (n= 428 excrementos)	81,4%	4,1%	1,4%	2%	0,1 %						

Así, en la PI, como hemos destacado anteriormente, se diferencian 2 regiones biogeográficas: la región atlántica, caracterizada por un mayor consumo de micromamíferos (Fernández & Ruiz de Azúa, 2005; Carvalho & Gomes, 2004), y la región biogeográfica mediterránea, con mayor consumo de lagomorfos (Rau *et al.*, 1987; Fedriani, 1996). Se considera al conejo como la presa ideal para el zorro por su tamaño, su fácil captura con respecto a otras presas y su valor energético (Blanco, 1988).

Barrull & Mate (2007) describieron que, en términos de frecuencia relativa (FR), definido como el porcentaje de una categoría de alimentos respecto del total numérico, la dieta principal del zorro en el parque nacional del Montsant de Barcelona está formada por materia vegetal (FR = 81,96%) y pequeños invertebrados (FR = 14,77%). Los frutos y las semillas aportan el 63,36% de la biomasa consumida y los invertebrados le proporcionan el 3,31%.

Entre los aportes de artrópodos e invertebrados que el zorro incorpora a su dieta se encuentran los coleópteros. En un estudio realizado en Doñana (Fedriani, 1996), se encontró un mayor consumo de coleópteros de la familia Scarabaeidae en los zorros situados en la dehesa (parches con arbolado), que en los situados en el monte. Una posible explicación es por la presencia de ganado vacuno, y por tanto de su estiércol, únicamente en el área de dehesa. En general, los artrópodos más consumidos en la PI (tabla 4) son los ortópteros y los coleópteros, representados estos últimos principalmente por los carábidos, escarabeidos y cerambícidos (Fedriani, 1996; Ballesteros & Degollada, 2002; Fernández & Ruiz de Azua, 2005; Barrull & Mate, 2007). Otros datos sobre el aporte de artrópodos a la dieta de los zorros han sido los aportados por Carvalho & Gomes (2004), que sugieren que la disponibilidad de los artrópodos está en función de las características del suelo, viéndose favorecidos por la sequedad y la cubierta de matorral bajo, tan característicos del paisaje mediterráneo y parte de las zonas adehesadas. Estos mismos autores destacan el aumento de consumo de artrópodos del zorro como complemento a su dieta en los meses de verano, con un mayor consumo que la de sus competidores directos en el mismo hábitat como son el gato montés, la jineta y la garduña. El consumo significativo de artrópodos por el zorro también se ha informado en otros hábitats mediterráneos por parte de Amores. (1975). Para este autor los invertebrados son los que en mayor número contribuyen a la dieta del zorro en términos de frecuencia de aparición, fundamentalmente coleópteros y ortópteros. Mientras que en términos medios de biomasa o de importancia energética, el aporte de los invertebrados se ve reducido al 0,79% de media anual, frente al 84,32% que representan las presas de mamíferos. Si se tiene en cuenta los datos por épocas del año sería el verano (entre junio y septiembre), donde el porcentaje de alimentación en términos de biomasa del zorro aumentaría al 1,11 % (Amores, 1975).

Tabla 4.- Tipos de alimentos en diferentes lugares que incorpora el zorro en su dieta en la Península Ibérica.

Lugar	Frecuencia de aparición de restos de artrópodos en contenido gástrico	Frecuencia de aparición de restos de artrópodos en excrementos	Autor
Parque Nacional Doñana (Huelva): hábitat monte		83,7 %	Fedriani, 1996
Parque Nacional Doñana (Huelva): hábitat dehesa		93,3 %	Fedriani, 1996
Valle Medio del Ebro (Zaragoza): hábitat regadío	28,7%		Gortázar, 1999
Valle Medio del Ebro (Zaragoza): hábitat secano	52,7%		Gortázar, 1999
Parque Nacional Sierra Nevada: hábitat seco		28%	Padial <i>et al.</i> , 2002
Parque Nacional Sierra Nevada: hábitat húmedo		32,4	Padial <i>et al.</i> , 2002
Parque Natural Sant Llorenç del Munt i l'Obac (Barcelona)		60%	Ballesteros & Degollada, 2002
la Sierra de Arcamo (Álava)		62,3%	Fernández & Ruiz de Azua, 2005
Sierra de Montsant (Tarragona)	52,66 en primavera 17,45 en verano	primavera 58% / verano 57% media 4 estaciones 41,83%	Barrull & Mate, 2007
Alentejo (Portugal)		91,2 %	Santos <i>et al.</i> , 2007
Parque del Garraf (Barcelona)		10,1 %	Martín M., 2008

2.2.1.4.- Determinación de la edad.

La valoración aproximada de la edad en el zorro se puede efectuar basándose en una combinación de varios criterios. En primer lugar, la edad podría calcularse a partir de su fórmula dentaria, con datos como la temporalidad de erupción de las piezas dentales (Sáenz de Buruaga *et al.*, 1991), su desgaste, etc. En segundo lugar, mediante la adjudicación de las fechas de nacimiento en los meses de primavera estimados para esta especie como fechas de reproducción. Se sabe que el zorro es una especie monoéstrica estacional con un único periodo reproductor al año (Voigt y McDonald, 1984; Harris & Trehwella, 1988), que en el caso de la PI se conoce que los apareamientos suelen tener lugar en los meses de enero y febrero (Zapata *et al.*, 1997). Finalmente, un tercer criterio estaría basado en el aspecto externo del zorro combinado con la experiencia adquirida por el examinador en la necropsia de zorros.

2.2.2.- El hospedador intermediario: los escarabajos

Los insectos pertenecientes al orden Coleóptera conforman un grupo de 360.000 especies en todo el mundo, distribuidas a su vez, en 160 familias taxonómicas (Gordón, 2002). Se caracterizan por presentar un primer par de alas muy endurecido denominado élitros, que protegen el resto del cuerpo, de ahí que el término coleóptero provenga del griego coleos=duro y pteron=ala. En el sentido estricto, los escarabajos típicos constituyen la superfamilia Scarabaeoidea, también llamados lamelicornios, por la presencia de antenas o “cuernos” (cornia, ceras) terminando en varios segmentos comprimidos y alargados en forma de laminilla. También tienen tarsos en sus patas con cinco segmentos y larvas de tipo escarabeiforme (Morón, 2003 y Morón, 2004).

Muchos escarabajos coprófagos adultos de la Familia Scarabaeidae o Geotrupidae son hospedadores intermedios de varios helmintos de animales domésticos y salvajes. Son insectos detritívoros que se alimentan y se reproducen en la materia fecal de los vertebrados. Esta dependencia de las heces de los vertebrados implica un contacto frecuente entre los escarabajos peloteros y los parásitos de los vertebrados (Nichols & Gómez, 2014). *Phanaeus* spp., perteneciente a la familia Scarabaeoidea, se ha caracterizado como un importante HI de los espirúridos de cerdos en el sur de Georgia (Porter, 1939; Stewart & Kent, 1963; Fincher *et al.*, 1969). Varios autores encontraron que los adultos de *Phanaeus* estaban asociados con excrementos de ganado (Cooper, 1938; Ritcher, 1945, 1966; Lindquist, 1933, 1935). El nematodo *Gongylonema* spp., se ha visto que se transmite a través del escarabajo *Copris lunaris* (Mowlavi *et al.*, 2009).

Diversos estudios han evaluado la capacidad de los escarabajos coprófagos (Scarabaeidae) para que actúen como HI para la transmisión de *S. lupi*. Como ya se ha mencionado, los escarabajos coprófagos o comúnmente llamados estercoleros o peloteros, se encuadran todos ellos en la Superfamilia Scarabaeidae, siendo las subfamilias más importantes para la parasitación de *Spirocerca* spp., las pertenecientes a Scarabaeinae, Aphodiinae, Geotrupinae y Hybosorinae (Bailey *et al.*, 1963b; Chhabra & Singh, 1972; Van der Merwe *et al.*, 2008; ITIS, 2018).

Se han realizado estudios sobre el estado de infección de los escarabajos recolectados en el campo en ciertos momentos (Du Toit *et al.*, 2008) e infección experimental en laboratorio de ciertos escarabajos y otros artrópodos con *S. lupi* (Mukaratirwa *et al.*, 2010). La susceptibilidad a la infección por *S. lupi* de las diferentes especies de escarabajos coprófagos se ha encontrado que es variable (Bailey *et al.*, 1963b). Los huevos de *S. lupi* consumidos por un escarabajo se desarrollan desde L1 a L3 dentro del escarabajo (Austin *et al.*, 2013). Cuando los huevos larvados (contienen L1) de *Spirocerca spp.*, son ingeridos, éstos eclosionan después de la ingestión y pueden transcurrir hasta 2 meses hasta que estas larvas se desarrollan a la fase infecciosa (L3). Estas larvas infectantes se enquistan principalmente en los túbulos traqueales (Mazaki-Tovi *et al.*, 2002). Experimentalmente se ha visto que los huevos eclosionan en el hemocele del escarabajo pasadas 8 h tras la infección (Rojas *et al.*, 2017a), por lo que este tiempo desde la ingestión hasta la eclosión en el escarabajo y paso a L3 es variable y dependiente de muchos otros factores como Ph (Rojas *et al.*, 2017a), enzimas proteolíticas como la tripsina, CO₂, T^a, y humedad relativa (HR). Cuando estos dos últimos factores son óptimos (una alta T^a, combinada con alta HR) se ve favorecido el paso de L1 a L3 (Gottlieb *et al.*, 2014). El escarabajo coprófago que contiene larvas L3 es ingerido por un HD cerrando el ciclo, o bien puede ser ingerido por un HP como alternativa que prolonga el tiempo de desarrollo del ciclo del parásito hasta la ingestión del HP por parte del HD. Los huevos experimentan una transición de pH desde las heces de los perros (pH 7.2 ± 0.4) al intestino del escarabajo (en *O. sellatus* un pH de 6.0-6.2). Se ha observado que el contenido del intestino medio de *O. sellatus* es más ácido que los de otras especies de escarabajos (Rojas *et al.*, 2017a). No obstante, algunos análisis *in vitro* matizan que, además del pH, hay otros estímulos adicionales que provocan la eclosión del huevo como la T^a, la agitación o la presencia de tripsina. Los contenidos bacterianos del intestino de los escarabajos pueden modificar el pH intestinal (Broderick *et al.*, 2004).

Las especies de escarabajos que intervienen como HI de *S. lupi* son muy conocidas en algunos lugares endémicos, como ocurre en Israel, donde el género *Onthophagus*, especialmente la especie *O. sellatus* es el principal HI (Gottlieb *et al.*, 2011). En Sudáfrica, se han caracterizado como HI a las especies *Onthophagus pugnatus*, *Onthophagus ebenus* y *Gymnopleurus virenas* (Du Toit, *et al.*, 2008). Otros autores encontraron como HI en Sudáfrica a *Pachylomerus femoralis*, *Scarabaeus rugosus*, *Gymnopleurus humanus*, *Kheper nigroaeneus* y *Anachalcos convexos* (Mukaratirwa, *et al.*, 2010). También se ha descrito experimentalmente la transmisión de *S. lupi* por otras especies de artrópodos, incluidos los milpiés (*Daratoagonus cristulatus*) (Mukaratirwa, *et al.*, 2010).

Otros autores han descrito otras especies de invertebrados que actúan de hospedadores intermediarios en distintos lugares (ver tabla 5), pero se sabe que la capacidad de transmisión de los huevos embrionados de *Spirocerca spp.*, es muy dependiente del tamaño del escarabajo (Mönnig, 1938; Holter, 2000; Holter *et al.*, 2002; Du Toit *et al.*, 2012). Las piezas bucales de los escarabajos peloteros restringen la comida, filtrando las partículas más diminutas comprendidas en un rango de 2-150 µm (Holter & Scholtz, 2005). Los huevos embrionados de *S. lupi* tienen 30-37 µm de largo por 11-15 µm de ancho (Du Toit *et al.*, 2012). Como tam-

bién es conocido, que el tamaño de las partículas que ingiere el escarabajo es dependiente de su tamaño (Holter, 2000; Holter *et al.*, 2002; Du Toit *et al.*, 2012), el tamaño del escarabajo para la ingestión de partículas de mayor tamaño se explica por la necesidad de más comida y el proceso evolutivo ha llevado a los escarabajos de mayor tamaño a ser menos selectivos frente a los escarabajos de menor tamaño. Escarabajos de un menor tamaño ven restringida el acceso a partículas de mayor tamaño por lo que los huevos embrionados no lograrán pasar el aparato bucal y estas especies no podrán llegar a ser HI frente a los huevos de *Spirocerca* spp. (Du Toit *et al.*, 2012).

Tabla 5.- Especies de escarabajos coprófagos y otros insectos que potencialmente pueden actuar como posibles hospedadores intermediarios de *Spirocerca lupi*.

Familia	Genero	Especie	Tamaño	Hospedador intermediario (HI)	Autor
Scarabaeidae	Copris	<i>C.hispanus</i>		SI	Seurat, 1916
Blattidae	Periplaneta	<i>P.americana</i> (cucaracha)	40 mm	NO	Faust, 1928 Mukaratirwa <i>et al.</i> , 2010
Blattidae	Periplaneta	<i>P.australasiae</i>	30 a 35 mm	NO	Faust, 1928
Blattidae	Blatta	<i>B. orientalis</i>	25 mm	NO	Faust, 1928
Scarabaeidae	Gymnopleurus	<i>G.sturni</i>		SI	Bailey <i>et al.</i> , 1963b
Scarabaeidae	Scarabaeus	<i>S. variolosus</i>		SI	Bailey <i>et al.</i> , 1963b
Scarabaeidae	Scarabaeus	<i>S.sacer</i>		SI	Bailey <i>et al.</i> , 1963b
Geotrupidae	Geotrupes	<i>G. blackburnii</i>		SI	Bailey <i>et al.</i> , 1963b
Scarabaeidae	Gymnopleurus	<i>G.koenigi</i>		SI	Anantaramam <i>et al.</i> , 1963
Scarabaeidae	Euoniticellus	<i>E. pallipes</i>		SI	Anantaramam <i>et al.</i> , 1963
Geotrupidae	Geotrupes	<i>Geotrupes sp</i>		NO (sin afinidad por excrementos de carnívoro)	Fincher <i>et al.</i> , 1970
Scarabaeidae	Onthophagus	<i>O.pugionatus</i>		SI	Du Toit <i>et al.</i> , 2008
Scarabaeidae	Onthophagus	<i>O. ebenus</i>		SI	Du Toit <i>et al.</i> , 2008
Scarabaeidae	Onthophagus	<i>O. obtusicornis</i>		SI	Du Toit <i>et al.</i> , 2008
Scarabaeidae	Gymnopleurus	<i>G. virens</i>		SI	Du Toit <i>et al.</i> , 2008
Spirostreptidae	Doratogonus	<i>D. cristulatus</i> (ciempiés)	80-200mm	Hospedador Paraténico	Mukaratirwa <i>et al.</i> , 2010
Spirostreptidae	Orthoporoides	<i>O. pyrrocephalus</i>		NO	Mukaratirwa <i>et al.</i> , 2010
Gryllidae	Gryllus	<i>G. assimilis</i> (grillo)	28-32 mm	NO	Mukaratirwa <i>et al.</i> , 2010
Scarabaeidae	Pachylomera	<i>P. femoralis</i>	50mm	SI	Mukaratirwa <i>et al.</i> , 2010
Scarabaeidae	Scarabaeus	<i>S.rugosus</i>	45mm	SI	Mukaratirwa <i>et al.</i> , 2010
Scarabaeidae	Anachalcos	<i>A. convexus</i>	45mm	SI	Mukaratirwa <i>et al.</i> , 2010
Scarabaeidae	Gymnopleurus	<i>G. humanus</i>	11mm	SI	Mukaratirwa <i>et al.</i> , 2010
Scarabaeidae	Kheper	<i>K. nigroaeneus</i>	25-35 mm	SI	Mukaratirwa <i>et al.</i> , 2010
Scarabaeidae	Onthophagus	<i>O.sellatus</i>		SI	Gottlieb <i>et al.</i> , 2011
Scarabaeidae	Onthophagus	<i>O. fritschi</i>		NO	Du Toit <i>et al.</i> , 2012
Scarabaeidae	Onthophagus	<i>O.deterrens</i>		NO	Du Toit <i>et al.</i> , 2012
Scarabaeidae	Onthophagus	<i>O.asperilus</i>		Experimentalmente si HI. No serían los más adaptados	Du Toit <i>et al.</i> , 2012
Scarabaeidae	Onthophagus	<i>O.binodus</i>		Experimentalmente si HI. No serían los más adaptados	Du Toit <i>et al.</i> , 2012
Scarabaeidae	Sarophorus	<i>S. striatus</i>		Experimentalmente si HI. No serían los más adaptados	Du Toit <i>et al.</i> , 2012

Los escarabajos coprófagos encuentran en las heces su alimento, como son los microorganismos y restos de células epiteliales del intestino de los mamíferos (pequeñas partículas) y los componentes de menor valor nutritivo y mayor tamaño como es el alto contenido en agua y paredes de celulosa y lignina de las plantas (Holter & Scholtz, 2005). El movimiento que sufren los huevos con L1 debido a la acción mecánica de las piezas bucales del escarabajo, junto con los movimientos en el interior del intestino medio del escarabajo contribuye al proceso de eclosión de *S. lupi* de L1 a L3 (Miller *et al.*, 1961; Chhabra & Singh, 1972; Rojas *et al.*, 2017a). El efecto mecánico de las piezas bucales de los escarabajos fue probado para huevos de *Ascaris lumbricoides* en especies de escarabajos peloteros (Miller *et al.*, 1961). Estos autores dedujeron que las mandíbulas de algunas especies de escarabajos coprófagos tienen el doble propósito de masticar material fecal para filtrarlo y también destruir o dañar los huevos de helmintos por la acción masticadora de sus mandíbulas.

Los escarabajos coprófagos muestran preferencias para ciertos tipos de estiércol (Lumaret *et al.* 1992). Esto tiene importantes implicaciones en la prevalencia de algunos parásitos en las poblaciones de escarabajos coprófagos (Bailey, 1972). En Sudáfrica todos los escarabajos coprófagos que estaban infectados con el nematodo *Spirocerca* spp., independientemente de la especie, mostraron una preferencia por estiércol omnívoro (cerdo y perro) (Du Toit *et al.*, 2008).

Existen también varios factores que controlan y seleccionan las comunidades de escarabajos coprófagos, como son la naturaleza del sustrato del suelo, fauna y flora de la región específica, lluvia y T^a (Bailey, 1972; Lumaret *et al.*, 1992). Para que exista una determinada especie de parásito, es indispensable que estén presentes las condiciones ambientales y los HI específicos, HD o vectores necesarios para que se cumplan las distintas etapas de los ciclos de vida del parásito, lo que les permite entrar en contacto con los diferentes niveles tróficos y estar presentes en distintos ambientes físicos del sistema al mismo tiempo (Poulin & Morand, 2000; Lafferty *et al.*, 2006; Lafferty *et al.*, 2008; Patterson & Piertney, 2011).

Capítulo 3.- Enfermedades parasitarias.

3.1.-Trichinellosis

3.1.1.- Etiología.

La trichinellosis es una infección zoonótica parasitaria. La infección es producida por nematodos del género *Trichinella* spp., transmitida a través del consumo de carne cruda o poco cocinada (Campbell, 1983). Se trata de un nematodo cuyo descubrimiento se remonta a hace 186 años en el Reino Unido, durante una autopsia en una mujer de origen italiano, nombrándose al parásito como *Trichinela spiralis* por Owen (1835). Sin embargo, la designación de *Trichina* se había utilizado anteriormente para un género de Díptera desde 1830 (Gould, 1970), de modo que en 1895 se produce un cambio de nombre del género a *Trichinella* (Rai-lliet, 1895). En la actualidad se considera al género *Trichinella* dentro de la Familia Trichinelli- dae (tabla 6).

Tabla 6.- Clasificación Taxonómica del género *Trichinella*

Reino	Animalia
Subreino	Metazoa
Phylum	Nematoda
Clase	Clase Enoplea
Subclase	Enoplia
Orden	Trichurida
Superfamilia	Trichinelloidea
Familia	Trichinellidae
Género	<i>Trichinella</i>

En 1846, Joseph Leidy encontró quistes de *Trichinella* en los músculos de un cerdo (Valentín, 1935; Gould *et al.*, 1970). Unos años más tarde, aumentó su interés por la comunidad científica cuando en 1860, el patólogo Zenker demostró patogenicidad para los humanos (Campbell, 1983). A partir de esos momentos fue cuando se le prestó la atención de los veterinarios, médicos y autoridades de salud pública, advirtiendo sobre el importante papel de los cerdos en el ciclo natural y la producción de productos domésticos de carne de cerdo (Campbell, 1983).

Van Knapen (1998) define para Europa qué animales eran indicadores de la presencia de *Trichinella* spp. en el ciclo de vida silvestre, considerando al jabalí y al zorro como los más importantes. Cuando la prevalencia del parásito en estas especies es = 0,1% se consideran áreas endémicas a *T. spiralis* y no endémicas si no hay casos ni brotes los 10 años anteriores.

En España, la presencia de este parásito en suidos y carnívoros silvestres es endémica, lo cual es un riesgo para la salud humana, debido al posible consumo de dichos animales. Es una parasitación de declaración obligatoria, ya que tiene una gran importancia sanitaria, de tal modo, que, ante un caso positivo, se procede al decomiso total del animal infectado (Navarrete *et al.*, 1991).

Los nematodos del género *Trichinella* son parásitos zoonóticos con una distribución cosmopolita y que infectan a más de 2.500 personas anualmente (Murrell & Pozio, 2011). Algunos parásitos zoonóticos transmitidos por los alimentos han acompañado a la especie humana desde su origen y su difusión ha aumentado en muchas ocasiones debido a su comportamiento, representando un peligro importante para la salud humana. Estos patógenos que incluyen *Trichinella* spp., debido a que tanto los animales domésticos como los silvestres juegan un papel importante como reservorios, junto con la influencia humana sobre las biomasas, pueden cambiar sus patrones epidemiológicos. De ello se deduce que la globalización y el cambio climático tendrán un tremendo impacto sobre estos patógenos modificando sus patrones epidemiológicos y ecosistemas debido a los cambios de parámetros bióticos y abióticos. Las consecuencias de estos cambios en los parásitos transmitidos por los alimentos no se pueden prever en su conjunto debido a su complejidad, pero es importante que biólogos, epidemiólogos, médicos y veterinarios evalúen y aborden el problema dentro de un enfoque de una sola salud (Pozio, 2020).

En 1992, estudios isoenzimáticos permitieron la clasificación del género en siete genotipos diferenciables (Pozio *et al.*, 1992a; Pozio *et al.*, 1992b). La percepción de las distintas especies ha ido variando en el último siglo con la llegada de nuevas técnicas genómicas y moleculares (Pozio & Zarlenga, 2013). Actualmente, el genotipado e identificación de *Trichinella* se basa en medios moleculares (Pozio & La Rosa, 2003), a través de los cuales, se reconocen la existencia de 12 especies y genotipos (Krivokapich *et al.*, 2012; Pozio & Zarlenga, 2013; Korhonen *et al.*, 2016), genética y biológicamente divididos en dos Clados, que se diferencian en la presencia o ausencia de la cápsula de colágeno intramuscular (Murrell *et al.*, 2000; Pozio & Zarlenga, 2005; Zarlenga *et al.*, 2006; Pozio *et al.*, 2009a; Krivokapich *et al.*, 2012).

Las distintas especies, según su encapsulación, están resumidas en la Tabla 7.

Tabla 7.- Distribución de *Trichinella* spp., y hospedadores habituales, junto con el autor que ha postulado cada especie o genotipo diferente.

Especies encapsuladas	Hospedador predilecto	Distribución
<i>Trichinella spiralis</i> (T. 1) (Owen, 1835; Railliet, 1895).	Cerdo, jabalí, oso, caballo, zorro, lobo, humano, ratones	Cosmopolita
<i>Trichinella nativa</i> (T. 2) (Britov & Boev, 1972)	Oso, caballo, roedores	Ártica-subárticas (América, Europa, Asia)
<i>Trichinella britovi</i> (T. 3) (Pozio et al., 1992a)	Cerdo, jabalí, caballo, perro, zorro, roedores	Europa, Asia, África (Oeste)
<i>Trichinella murreli</i> (T. 5) (Pozio et al., 2001)	Oso, carnívoros salvajes	Norteamérica (templada)
<i>Trichinella nelsoni</i> (T. 7) (Britov & Boev, 1972)	Jabalí, león, pantera, hiena	Este y sur de África
<i>Trichinella patagoniensis</i> (T. 12) (Krivokapich et al., 2008)	Puma	Patagonia, Argentina
<i>Trichinella</i> T. 6 (Pozio et al., 1992a)	Carnívoros silvestres de las familias Canidae, Felidae, Mustelidae y Ursidae. Resiste a la congelación	Restringida a regiones de Canadá (Ontario, Manitoba, Nunavut) y EEUU (Alaska, Montana, Idaho y Pensilvania). Ártica-subárticas (América)
<i>Trichinella</i> T. 8 (Pozio et al., 1992a)	León, hienas y mamíferos silvestres África	África (Sudáfrica y Namibia)
<i>Trichinella</i> T. 9 (Nagano et al., 1999)	Mamíferos	Japón
Especies NO encapsuladas	Hospedador predilecto	Distribución
<i>Trichinella pseudospiralis</i> (T. 4) (Garkavi, 1972)	Mamíferos y aves	Cosmopolita
<i>Trichinella papuae</i> (T. 10) (Pozio et al., 1999)	Mamíferos y reptiles	Papúa Nueva Guinea
<i>Trichinella zimbabwensis</i> (T. 11) (Pozio et al., 2002b)	Mamíferos y reptiles	Sur del Sahara (África)

3.1.2.- Epidemiología.

Pozio (2001) considera la trichinellosis humana y animal una enfermedad emergente y además reemergente. La reemergencia del ciclo doméstico está asociada a la quiebra de los servicios veterinarios en ciertos estados, y a problemas económicos, así como a conflictos militares. Por otro lado, el ciclo silvestre se ve reforzado por el espectacular incremento continuado de las poblaciones de jabalí, generalizado en toda Europa desde el año 1965, que ha estado causado por las alteraciones en el paisaje, tales como el incremento de cultivos como el maíz (Fredriksson-Ahomaa, 2019; Rosell *et al.*, 2001; Rosell *et al.*, 2002; Bieber & Ruf, 2005; Acevedo *et al.*, 2006).

La distribución global y los variados hábitos culturales alimentarios favorecen las infecciones humanas de *Trichinella* spp. Ha sido documentada en el 27,8% de los países del mundo, aunque en algunos países, solo afecta a minorías étnicas y turistas, ya que los nativos no consumen carne no cocida o ciertas especies animales. La infección ha sido documentada en animales domésticos (cerdos, sobre todo) y en animales salvajes, en el 21,9% y en el 33,3% de países, respectivamente (Pozio, 2007a; Pozio, 2007b).

Clásicamente se han distinguido 2 ciclos de transmisión en España que son los ciclos doméstico y selvático. Las principales especies circulantes son *T. spiralis* y *T. britovi*, que se encuentran ampliamente distribuidas en nuestro medio (Pozio, 1998; Pérez-Martín *et al.*, 2000), aunque también se dan infestaciones mixtas de ambas especies (Rodríguez *et al.*, 2008). A las dos especies anteriores hay que añadir *T. pseudospiralis* (Zamora *et al.*, 2015), que se detectó, por primera vez en 2014 en un jabalí infestado en la provincia de Gerona. La importancia de la detección de esta especie radica en que no forma cápsula y que podría no detectarse por el método triquinoscópico.

La transmisión se realiza únicamente por ingestión de carne que contenga L1 enquistadas, de modo que el hábito depredador, caníbal o carroñero sostiene dicho ciclo. Aun así, surge un abanico de posibilidades por la capacidad de adaptación de *Trichinella* spp. a hospedadores no carnívoros, como lo demuestra la aparición de *T. spiralis* en caballos en Europa (Pozio *et al.*, 1988; Pozio *et al.*, 1999; Dupouy-Camet *et al.*, 1994; Pozio *et al.*, 1997b; Liciardi *et al.*, 2009; Pozio, 2015) o en caballos de México (Arriaga *et al.*, 1995). Por su parte, *T. murreli* se ha encontrado en caballos en Canadá (Scandrett *et al.*, 2018). *T. spiralis* puede sobrevivir a la congelación, durante al menos 4 semanas en tejido de caballo congelado a -5° C, disminuyendo a esta Tª a partir de las cuatro semanas el número de larvas vivas recuperadas en ese tejido (Hill *et al.*, 2007). Esta especie no encapsulada, *T. pseudospiralis*, muestra una distribución cosmopolita detectada tanto en mamíferos (14 especies) como en aves (13 especies de aves) (Pozio, 2005).

La epidemiología de *Trichinella* spp., va muy ligada al tipo de hospedador, que en definitiva será el que conllevará el mayor riesgo de infección para el ser humano. De este modo, en España se ha descrito la trichinellosis en diversos hospedadores. En el norte de España se ha descrito hasta en once especies silvestres infectadas: oso pardo, hurón, garduña, tejón, gineta, lince, gato montés, zorro, lobo, jabalí, rata; además de animales domésticos como

cerdo, perro y gato (Cordero del Campillo, 1974; Pozio *et al.*, 2009b). En la PI, el lobo se encuentra parasitado por *T. britovi* en un 12,8% (Segovia *et al.*, 2004). Los roedores han sido también descritos como hospedadores de *Trichinella*, siendo la rata un animal asociado a la infección (Herrero-Martín & Martín-Calama, 1961; Rodríguez-Pérez *et al.*, 1989). Otros estudios han mostrado una prevalencia del 0,14% en rapaces nocturnas y diurnas en Extremadura (1 positivo en 703 muestras de aves), sin poder determinar especies concretas de *Trichinella* en la mayoría de los casos por las bajas cargas parasitarias (Gamito- Santos, 2011).

En la PI, los ciclos epidemiológicos silvestres (o parantropico), con la fauna salvaje como reservorio, pasan al ciclo rural y doméstico/urbano (sinantropico) directamente al hombre, en toda el área de explotación de razas porcinas ibéricas, pero también, el ciclo puede ser inverso, en el norte peninsular.

El ciclo silvestre tiene como reservorio principal el jabalí, aunque todos los mamíferos silvestres son susceptibles de ser hospedadores de *Trichinella*. Pozio *et al.* (2009b) considera al jabalí como el gran mantenedor de *T. spiralis* en el ciclo silvestre. Algunos datos aportados en regiones como Extremadura citan prevalencias de trichinelosis en el jabalí del 0,15%, frente a las prevalencias del cerdo doméstico que la sitúan en el 0,021%, reduciéndose significativamente cuanto más intensivo sea el sistema de explotación (Blanco *et al.*, 2009).

La presencia de *T. britovi* sugiere la existencia de un ecosistema natural no alterado por el hombre, como es el caso de los parques naturales existentes (Pozio, 1998; Pérez-Martín *et al.*, 2000). El concepto de que los cerdos y las ratas son los principales huéspedes de *T. spiralis*, como todavía se informa en muchos libros, ha sido reevaluado a fondo, y en la actualidad se considera que el foco de la infección por *Trichinella* spp., lo mantienen los animales de vida silvestre (Pozio, 1998).

En numerosos estudios, se ha destacado como hospedador silvestre de *Trichinella* al zorro (Van der Giessen *et al.*, 1998; Criado-Fornelio *et al.*, 2000; Pérez-Martín *et al.*, 2007; Richomme *et al.*, 2010). El zorro puede mantener el ciclo de *Trichinella* spp., gracias a su condición de carroñero en sus territorios. Es habitual que algún jabalí muerto en los lugares más inaccesibles como zarzales, barrancos, incluso en cunetas, bien por causas naturales, bien por estar malherido tras huidas y acaba muriendo, o fruto de atropellos, terminan en todos los casos por ser carroña habitual para el zorro. Las carroñas son definidas como reservorios de *Trichinella* spp., por diversos autores, ya que puede permanecer infectante en los tejidos musculares enterrados en el suelo durante, al menos, tres meses (Jović *et al.*, 2001). El zorro es propuesto como un buen centinela para la predicción de la circulación de *Trichinella* spp. (Pozio *et al.*, 1996; Pozio *et al.*, 1998). En el mismo sentido, la EFSA Journal. (2018), considera al zorro como un animal indicador de la presencia de *Trichinella* spp. en el ciclo de vida silvestre a nivel europeo, estableciendo una prevalencia media del 1,2 % entre los años 2013 y 2017. Anteriormente, entre 2007 y 2009, esas prevalencias medias de *Trichinella* spp., en el zorro a nivel europeo eran del 1,9% (EFSA Journal, 2011).

Hay numerosos estudios de la prevalencia de *Trichinella* spp., en el zorro en España. Así, la hallada en Asturias fue del 30% (Cordero del Campillo, 1974); si bien unos años des-

pués, en el Norte de España se citan prevalencias que varían entre el 6,8% y el 30% (Cordero del Campillo & Rojo Vázquez, 1999). En Guadalajara se sitúa en un 8,9% (Criado-Fornelio *et al.*, 2000). En Cataluña, en un amplio muestreo (1319 zorros), la prevalencia encontrada fue del 0,3% (López-Olvera *et al.*, 2011); en Zaragoza (Valle del Ebro) del 1,19% (Gortázar *et al.*, 1998); mientras que en zorros de la Comunidad Valenciana fue del 0,7% (Sanchis-Monsonís, 2015).

Por su parte, en un estudio realizado en Portugal, mediante el método de digestión enzimática de 25 g de carne por zorro (n=206 zorros), se observó una prevalencia del 13,3% en la zona de Beira Interior, remarcando la importancia del zorro en la epidemiología de la, trichinellosis en Portugal considerando al jabalí como especie con un rol menos importante (Fazendeiro *et al.*, 2004). La prevalencia informada en zorros de Extremadura en el periodo comprendido entre los años 1988-1995 fue del 4,8% (25% *T. spiralis*-75% *T. britovi*) (Pozio *et al.*, 1997a). Pocos años después, en esta misma comunidad ese porcentaje se situó en el 3%, con unas cargas parasitarias medias de 30,6 larvas por gramo de carne (LPG) (Pérez-Martín *et al.*, 2000). En el jabalí, la prevalencia encontrada por estos mismos autores y en la misma zona fue del 0,3%, con una carga parasitaria de 74,8 LPG (Pérez-Martín *et al.*, 2000). La prevalencia en Extremadura entre los años 2003 y 2005 fue del 3,59% en zorros y del 0,17% y del 0,026% en jabalí y cerdo de autoconsumo, respectivamente (Pérez-Martín *et al.*, 2007).

La prevalencia en CyL, en un estudio conjunto con zorros de La Rioja, entre los años 1999 y 2005, fue del 22,86%, siendo 13 de los zorros positivos pertenecientes a CyL (parasitados por *T. britovi*), mientras que los otros 3 positivos fueron de La Rioja (un positivo a *T. spiralis* y dos positivos a *T. britovi*) (Fonseca-Salamanca *et al.*, 2009).

Pozio (1998) explica la estratificación altitudinal de los ciclos doméstico y salvaje de *Trichinella* spp. En zonas de montaña, el comportamiento carroñero y de canibalismo de los zorros, junto con las bajas T^a, prolonga la viabilidad de *Trichinella* spp., en cadáveres y carroña y ayuda a cerrar el ciclo. Advierte que la prevalencia de la infección aumenta con la altitud y con el aislamiento de los hábitats: *T. spiralis* en zonas bajas y *T. britovi* en zonas altas.

Pozio *et al.* (2004) proporcionan datos de 225 muestras de zorro positivas a *Trichinella* spp., pertenecientes a 13 países europeos (*T. spiralis* 4%; *T. britovi* 95,5%; mixtas *T. spiralis* - *T. britovi* 0,5%). Según este estudio, *T. britovi* es la especie prevalente en carnívoros, mientras que *T. spiralis* lo es en suidos domésticos y salvajes.

Existe una amplia información sobre las predilecciones de localización de este parásito en los distintos músculos, así como para los distintos hospedadores, llegándose a la conclusión de que la intensidad de la infección y la distribución muscular están determinadas por la especie parásita y la susceptibilidad del hospedador. Además, los factores ambientales e intrínsecos de cada animal jugarían también un papel importante (Serrano *et al.*, 1999). Por tanto, existen unas distribuciones preferentes para cada especie hospedadora y esta distribución se cumple en mayor medida en los casos en los que las cargas parasitarias son altas. Para infecciones menores, la distribución observada es más aleatoria (Gottstein *et al.*, 2009). Estos mismos autores han señalado que los principales músculos de elección de *Trichinella* en el

zorro diafragma, antebrazo y lengua. Kapel *et al.* (2005) describieron que para las especies de *Trichinella* encapsuladas, el tropismo se centra fundamentalmente en la lengua, seguido de la musculatura de las extremidades y posteriormente, el diafragma.

El ciclo doméstico en la PI está totalmente influenciado por el sistema cultural en torno al consumo de carne de cerdo y matanzas domiciliarias. Esta dependencia de la carne de cerdo en la dieta del hombre es el principal factor de transmisión de *Trichinella*. La trichinellosis provoca brotes familiares por consumo de carnes crudas y/o curadas (crudas, poco cocidas o embutidos) de cerdos caseros y/o jabalíes. Se sugiere que los roedores pueden actuar como agentes propagadores de este ciclo doméstico (Kozar, 1970; Pozio & Murrell, 2006; Takumi *et al.*, 2010). En el ciclo doméstico, los restos de carne de cerdos infectados son la fuente de infección para especies silvestres, como ratas, caballos y gatos callejeros. En España no se han detectado infestaciones en equinos, pero se ha citado un caso, mal documentado, por consumo de carne de un novillo en una espicha en Asturias (Fernández *et al.*, 2005). Con la llegada de un nuevo siglo, las investigaciones se dirigieron a la búsqueda epidemiológica mediante otro tipo de métodos. Estudios serológicos han evidenciado la presencia de anticuerpos frente al parásito en caballos en España (Luzón *et al.*, 2009) y en perros de rehala (Martínez-Pérez, 2011).

Diversos autores como Gottstein *et al.* (2009) y Pozio *et al.* (2010) y Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2022), y la Oficina Internacional de Epizootias (OIE, 2008) han estudiado *Trichinella* spp., desde la perspectiva de la vigilancia y del control oficial/no oficial, como problema de salud pública, y también de sanidad animal, abarcando todas las especies animales domésticas y salvajes implicadas.

Por último, como hospedador de *Trichinella* spp., en España también se encuentra el hombre. De acuerdo con la información de la investigación de brotes o casos aislados de esta enfermedad, éstos se producen principalmente por la ingesta de carne de jabalí procedente fundamentalmente de cacerías sin control sanitario, la ingesta de carne de cerdo procedente de matanzas domiciliarias, o la mezcla de ambas carnes en embutidos (Rodríguez *et al.*, 2008; Granado *et al.*, 2012). Se ha destacado la poca eficacia del hombre como hospedador en la cadena de transmisión del parásito, al no ser ingerido por otros animales (Mantovani *et al.*, 1990).

Algunos brotes declarados han sido, por ejemplo, en la provincia de Cuenca entre 1992- 1993 (De la Cruz- de Julián *et al.*, 1994); en Jaén, causado por consumo de carne de jabalí (Rodríguez-Osorio *et al.*, 1999); en Granada causado por *T. britovi*, con 38 personas afectadas en el año 2000 (López-Hernández *et al.*, 2001) o en la comarca extremeña de La Vera en el año 2002, donde se vieron afectadas 52 personas al consumir carne de cerdo infectada por *T. britovi* (Herráez-García *et al.*, 2003). Gallardo *et al.* (2007) publican un brote en el año 2007, con 21 casos en España (CyL, País Vasco y Baleares) y Suecia, por consumo de chorizo casero de carne de jabalí de origen español, provocado por *T. britovi*, en carne que fue reconocida por un veterinario local mediante placas triquinoscópicas. Se analizó el chorizo por digestión artificial en tres laboratorios diferentes, dando una infestación comprendida entre 1,4-18 LPG. También en el año 2007, Jiménez-Jorge *et al.* (2008) analizan un brote humano

por consumo de longaniza de jabalí en la Montaña Alavesa, con 42 casos con clínica compatible y 1 hospitalizado, detectando *T. spiralis* con una carga parasitaria de 7,6 LPG. Posteriormente, en el laboratorio nacional de referencia detectan 2 LPG en longaniza y 17 LPG en lomo congelado de la misma procedencia. La carne de jabalí también originó 7 brotes en Aragón entre los años 1998-2017, afectando a 103 personas, con 29 hospitalizados y 1 fallecido. De estos brotes, cinco se originaron tras el consumo de carne de jabalí, y los otros dos por el consumo de carne de cerdo, siendo *T. spiralis* el parásito de cuatro de los brotes (tres en jabalí y uno de cerdo) y *T. britovi* en otros dos brotes (los dos en jabalí), en otro de los brotes causado por consumo de embutido de cerdo la especie implicada en el brote de trichinellosis no se pudo determinar (Pérez-Pérez *et al.*, 2020). Según la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN, 2020), el 31 de octubre de 2014 el Centro Nacional de Alimentación informó de la presencia de *T. pseudospiralis* en una muestra de carne de jabalí procedente de Cataluña. Asimismo, también se detectó nuevamente esta especie en una muestra positiva de carne de jabalí procedente de Aragón cazado a finales de 2016 (AESAN, 2020).

3.1.3.- Diagnóstico de la trichinellosis.

El enfoque del diagnóstico de la trichinellosis puede estar basado en pruebas para su detección sobre los productos alimentarios de consumo humano o bien al diagnóstico clínico-patológico de los humanos y/o animales.

Para la primera de las cuestiones, el examen diagnóstico de los productos alimentarios, el único método aceptado es la digestión enzimática de tejido muscular, por el **método de referencia** que marca la norma **ISO 18743:2015** tal como se refleja en el **Reglamento de Ejecución (UE) 2020/1478**. Este Reglamento valida también el método descrito en el Anexo I, Capítulo I (Método de detección de Referencia) del **Reglamento de Ejecución (UE) 2015/1375**. El método de referencia se describe anexo 1 de esta tesis.

La Comisión Internacional sobre trichinellosis no recomienda métodos serológicos para la prueba de canales individuales de animales sacrificados con destino al consumo (Gamble *et al.*, 2000; Nöckler *et al.*, 2000). La legislación para la inspección de carnes y productos cárnicos para detectar la presencia de *Trichinella* spp., incluye únicamente pruebas directas (detección de las larvas mediante digestión enzimática), que, si se realizan correctamente, tienen la sensibilidad y especificidad suficientes para detectar todas las canales con cargas larvianas mayores de 1 LPG, el nivel mínimo de infección que se considera ser motivo de preocupación para la salud pública. De acuerdo con la legislación europea, todos los animales susceptibles a *Trichinella* spp., para consumo humano en la UE, es decir, cerdos domésticos (tanto de engorde como de reproducción), jabalíes y solípedos (équidos), deben ser examinados para detectar la presencia de larvas de parásitos en los músculos, a menos que las canales se congelen adecuadamente para inactivar el parásito.

En España, todos los años se actualiza y publica a través de la web de AESAN el Plan Nacional de Contingencia Frente a *Trichinella*, en todo lo referente a: Protocolos de actuación tras la sospecha y /o identificación del parásito en animales domésticos y silvestres destina-

dos al consumo humano o en personas. En este Plan Nacional de Contingencia del año 2020 se incide en la no validez del método triquinoscópico para el examen de carne procedente de matanzas domiciliarias para autoconsumo o de la caza de jabalíes. **En la actualidad, el método triquinoscópico no se considera un método válido para el análisis de *Trichinella* spp., en ningún caso.**

Al hablar de diagnóstico, también nos hemos referido al diagnóstico como patología en el ser humano o en animales. Según se indica en la EFSA (2018), todos los estados miembros de la UE deben monitorear la circulación de estos nematodos en los principales reservorios naturales (carnívoros y animales omnívoros) para adquirir información sobre el riesgo de transmisión a los animales domésticos y a los humanos, así como obtener información sobre la introducción de nuevas especies de *Trichinella* de países no pertenecientes a la UE. Para cubrir estas necesidades diagnósticas, es donde entran en juego los métodos serológicos. Ya desde comienzos del siglo XX, se ha intentado también realizar un diagnóstico inmunológico, tanto en el hombre como en los animales, debido a que permite realizar un diagnóstico in vivo, bastante sensible, puesto que la respuesta humoral del hospedador es generalmente marcada.

Los métodos inmunoenzimáticos son considerados como un buen método de vigilancia epidemiológica. Algunos autores, en ensayos experimentales, han señalado un 100% de sensibilidad de las pruebas serológicas para casos de cerdos positivos por digestión artificial testados tras 28 días post-infección concluyendo que, mientras con la digestión artificial se identifican casos que reportarían enfermedad en el hombre, las pruebas serológicas identificarían casos de parasitaciones en piaras de cerdos que en el caso de zonas endémicas repercutirían en programas sanitarios preventivos (Ribicich *et al.*, 2000).

Las larvas de *Trichinella* spp., en su migración a través del hospedador y tras instalarse en la musculatura conforman la estructura de la célula nodriza, mediante la cual sobreviven, y a través de la cual tienen una gran interacción con el hospedador. El parásito segrega al entorno muscular metabolitos y enzimas, los cuales inducen una respuesta del sistema inmune del hospedador. La respuesta inmunitaria, se produce tanto por esos residuos del parásito (ES), como por los antígenos que presenta el nematodo en su superficie e interior cuando la larva es destruida.

Uno de los antígenos de *Trichinella* más estudiados es el Extracto Bruto Larvario o complejo proteico (EBL), formado por las proteínas cuticulares, así como por proteínas estructurales del nematodo. Se ha concluido que el EBL es un antígeno capaz de conseguir la detección de anticuerpos frente a *Trichinella* en el suero de organismos parasitados (Nöckler *et al.*, 2009). Este EBL producido a partir de larvas de músculo de primera etapa recolectadas por digestión artificial, no debe usarse para pruebas serológicas de animales o humanos debido a la alta probabilidad de reacciones cruzadas con otros patógenos, como por ejemplo *Trichuris suis* (Chan & Ko, 1992; Gómez-Morales *et al.*, 2008). En humanos, utilizando EBL de *T. spiralis* se observaron reacciones cruzadas en pacientes afectados por anisakiosis, esquistosomiasis, cisticercosis, fasciolosis, filariosis y toxocariosis (Yera *et al.*, 2003).

Debido a esto, posteriormente se comienza a estudiar el antígeno excretor-secretor (ES), obtenido a partir de cultivos in vitro de larvas musculares de *Trichinella*, observándose en los primeros estudios mayor especificidad que el anterior (Gamble *et al.*, 1983). La elección de este producto como antígeno es consecuencia de que el número de proteínas que lo componen es menor y con mayor proporción de las específicas que el EBL (Hassan *et al.*, 2010). Empleando antígeno ES en cerdos infectados con *T. spiralis*, se ha informado de la presencia de elevadas tasas de anticuerpos a partir del día 21 post-infección hasta el sacrificio, unos 60 días post-infección (Kořínková *et al.*, 2008).

El epítipo (determinante antigénico) predominante reconocido por animales y humanos infectados con *T. spiralis*, o cualquiera de las otras especies, es el llamado grupo TSL-1. Los antígenos TSL-1 se encuentran en las células de los esticocitos y en la superficie de la cutícula del parásito, por lo tanto, son secretadas activamente por larvas de primer estadio en el músculo. Se ha informado que los antígenos TSL-1 son abundantes en los productos de excreción y en la superficie de la cutícula del parásito (Ortega-Pierres *et al.*, 1996; Bolás-Fernández & del Corral Bezara, 2006). Los antígenos de TSL-1 comparten un epítipo antigénico formado por un carbohidrato inmunodominante (β -tyvelosa), que es único para *Trichinella* (De Mendoza *et al.*, 1999) y provoca la principal respuesta de anticuerpos en la etapa tardía de la infección. La β -tyvelosa sintética se ha evaluado en varios estudios de investigación, donde su desempeño se comparó favorablemente con los antígenos ES para realizar pruebas en humanos, cerdos y otros animales (Bruschi *et al.*, 2001; Owen *et al.*, 2001; Pozio *et al.*, 2002a). Este antígeno sintético ofrece las ventajas de estabilidad y estandarización y se ha demostrado que proporciona una mayor especificidad en muchas especies, pero puede comprometer la sensibilidad. La serología se ha propuesto como más adecuada para estudios epidemiológicos en la vida silvestre. En estudios de zorros ha sido probados serológicamente los antígenos excretor/secretor (ES) y el antígeno sintético β -tyvelosa glicano, mediante pruebas ELISA indirectas, encontrando que tanto el antígeno beta-tyvelosa como el ES son adecuados para la detección de anticuerpos contra *Trichinella* spp., y *T. nativa*. Ambos antígenos ELISA funcionaron bien, aunque el antígeno ES obtuvo un resultado superior al antígeno β -tyvelosa (Davidson *et al.*, 2009). Algunos informes de posibles reacciones cruzadas obtenidas utilizando el antígeno de β -tyvelosa y la evidencia de glicanos que contienen β -tyvelosa en otros huevos de nematodos han comprometido su especificidad (Dea-Ayuela *et al.*, 2001; Pozio *et al.*, 2002a). Los antígenos TSL-1 son específicos de la etapa LM y se pierden durante la muda larvaria acelerada, siendo este el motivo de que solo sirvan como antígenos para la etapa tardía de la infección (Bolás-Fernández & Del Corral Bezara, 2006). Se ha visto que los epítipos del antígeno TSL-1 reconocidos por anticuerpos en animales y seres humanos infectados por *Trichinella* son comunes a todas las especies encapsuladas y no encapsuladas (Appleton *et al.*, 1991).

Se han ensayado muchos tipos de antígenos, sin que hasta el momento exista uno estándar. Para algunos autores es mejor emplear antígeno ES que el EBL (Gamble *et al.*, 1983; Gamble *et al.*, 1997; Forbes *et al.*, 2004). Otros estudios no han encontrado diferencias en el uso del Ag ES o el Ag EBL, si bien una banda antigénica de 58 kDa sería el punto en común

de los dos tipos de antígenos (Hassan *et al.*, 2010). Otros investigadores han llegado a la conclusión que el EBL es más sensible, debido a que con él se obtienen seroconversiones más tempranas que con los otros antígenos más purificados, indicando que con los antígenos ES se puede reducir la sensibilidad de la técnica, frente a la respuesta más rápida y persistente de los antígenos de carácter somático EBL (Lind *et al.*, 1991; Rodríguez-Osorio *et al.*, 2003).

Estudios en cerdos con Ag ES, establecen una relación entre el número de LPG y el momento de la seroconversión (Nöckler *et al.*, 2005; Bieñ, 2007). También se ha establecido que cuanto mayor sea el número de LPG más precocidad en presentarse los anticuerpos. En el mismo sentido se ha determinado la influencia del número de LPG y la especie infectiva estableciendo en 40 días el periodo de seroconversión para *T. spiralis*, frente a los 60 días de seroconversión que se necesitarían para *T. britovi* a igualdad de LPG ingeridas de ambas especies. Por tanto, la precocidad en la presentación de anticuerpos es dependiente de la dosis (Nöckler *et al.*, 2005).

Según Yang *et al.* (2016), los antígenos de *Trichinella* se dividirían en:

- Un grupo de respuesta inmunológica rápida, compuestos principalmente por antígenos somáticos (EBL) y se detectan después de dos semanas de infección. Los antígenos somáticos son menos específicos y pueden dar reacciones cruzadas con anticuerpos de otros parásitos. Esta reacción cruzada se debe a la presencia de fosforilcolina dentro de los antígenos somáticos.
- Un grupo de respuesta inmunológica lenta, que se componen principalmente de antígenos que se encuentran en la cutícula y excretos / secretos (ES) de las larvas musculares (LM) y se detectan después de 4-5 semanas de infección. Los antígenos cuticulares de las L1 o LRN son cuatro, mientras que en la LM se han descrito tres antígenos (Cui *et al.*, 2013). Los antígenos ES de las LM por su parte se clasificarían en ocho grupos (TSL-1 a TSL-8) en función de su reconocimiento por diferentes anticuerpos monoclonales.

En la última década, se identificó GalNAc1-4 (Fuca1-3), GlcNAc-R (LDNF) como un antígeno de glucano potencial para el diagnóstico de trichinellosis humana, a través de la técnica de microarrays de glucanos. Los ELISA basados en cinco moléculas de glucano LDNF mostraron una alta sensibilidad (Aranzamendi *et al.*, 2011.)

Los enfoques proteómicos (ADN cromosómico) deben ser considerados como nuevos componentes antigénicos (Liu *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2014)

El suero es la muestra preferida para realizar pruebas serológicas para *Trichinella*. Otras muestras que se han utilizado incluyen plasma, sangre total y fluidos tisulares (Gamble & Patrascu, 1996). El exudado muscular puede ser una buena alternativa, especialmente para analizar muestras de animales salvajes. En estos casos se debe tener en consideración que la concentración de anticuerpos es aproximadamente 10 veces menor (Møller *et al.*, 2005). Este mismo autor evaluó una técnica de ELISA indirecta tanto en sueros como en fluidos musculares de zorros, cerdos y jabalíes infectados experimentalmente utilizando antígenos ES y un antígeno glicano sintético (la β -tyvelosa), detectando anticuerpos IgG específicos contra

Trichinella en ambas muestras. Con los dos tipos de antígenos se obtuvieron buenos resultados pese a que β -tyvelosa, parece ser menos sensible que los antígenos ES.

Parece que la seroconversión y permanencia de inmunoglobulinas en un hospedador de la familia canidae (perros), mediante ELISA indirecto se ha descrito como de gran precocidad, manteniéndose los títulos positivos durante más de seis meses tras la infección con *T. spiralis* en perros (Reina *et al.*, 1987).

Los estudios experimentales en zorros mostraron que el uso de un antígeno ES en un ELISA es un método adecuado para la detección serológica de la infección por *Trichinella* en esta especie (Kapel, 2000). Se detectaron anticuerpos específicos en todos los zorros infectados con 500 o 2000 larvas entre dos y seis semanas después de la infección, y estos anticuerpos persistieron durante todo el experimento (30 y 76 semanas después de la infección) con una tasa media de recuperación larvaria post mortem de 4,3 a 11,3 larvas por gramo de tejido (Nöckler & Voigt, 1998). Los resultados de los estudios de campo demostraron una seroprevalencia de *Trichinella* 100 veces mayor en la población de zorros rojos (7,7%) en comparación con una prevalencia del 0,07% en los zorros examinados por digestión artificial (Wacker *et al.*, 1999). Al igual que en los jabalíes, la enorme diferencia entre la seroprevalencia y la detección real de parásitos puede deberse, en parte, a la mayor sensibilidad de ELISA (0,01 larvas por g) y la capacidad limitada para detectar larvas de músculo en pequeñas muestras de tejido muscular digeridas. Se debe considerar que la tasa de recuperación de larvas en la mayoría de los zorros puede ser muy baja, es decir, alrededor o menos de 0,1 larvas por g de musculatura mediante digestión enzimática, según lo publicado por Enemark *et al.* (2000) y Van der Giessen *et al.* (2001). La seroconversión en zorros ha sido establecida a partir de las 5 semanas post-infección, siendo en este hospedador el descenso de anticuerpos sobre las 10 semanas post-infección. Sobre las 32-43 semanas post-infección la respuesta humoral es inapreciable (Davidson *et al.*, 2009).

3.1.4.- Legislación.

A nivel nacional:

El Real Decreto 2210/1995, de 4 de julio, por el que se crea la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica.

Real Decreto 1940/2004, de 27 de septiembre, sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos.

Orden SSI/445/2015, de 9 de marzo, por la que se modifican los anexos I, II y III del Real Decreto 2210/1995, de 28 de diciembre, por el que se crea la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica, relativos a la lista de enfermedades de declaración obligatoria, modalidades de declaración y enfermedades endémicas de ámbito regional.

Real Decreto 1086/2020 por el que se regulan y flexibilizan determinadas condiciones de aplicación de las disposiciones de la Unión Europea en materia de higiene de la producción

y comercialización de los productos alimenticios y se regulan actividades excluidas de su ámbito de aplicación. Se regula el sacrificio de ungulados domésticos para consumo doméstico privado, debido al riesgo que supone la trichinellosis, en el caso de especies sensibles a la triquina, incluidas las de caza destinadas al autoconsumo, se deberán someter a un análisis de detección de triquina.

A nivel europeo:

- Directiva 2003/99 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 17 de noviembre de 2003, sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos.
- El Reglamento de Ejecución (UE) 1375/2015 de la Comisión de 10 de agosto de 2015 por el que se establecen normas específicas para los controles oficiales de la presencia de triquinas en la carne establece requisitos concretos para prevenir la enfermedad humana provocada por el consumo de carne infectada por triquinas (DOUE nº 212-2015).
- **Reglamento (UE) 2017/625** del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de marzo de 2017, relativo a los controles y otras actividades oficiales realizados para garantizar la aplicación de la legislación sobre alimentos y piensos, y de las normas sobre salud y bienestar de los animales, sanidad vegetal y productos fitosanitarios. Este Reglamento establece excepciones a la condición de acreditación obligatoria para determinados laboratorios oficiales, estableciendo como válidos a los laboratorios: cuya única actividad consista en la detección de triquinas en la carne (artículo 40 del Reglamento (UE) 2017/625).
 - Que solo utilicen para la detección de triquinas los métodos a que se refiere el artículo 6 del Reglamento de Ejecución (UE) 2015/1375.
 - Que efectúen la detección de triquinas bajo la supervisión de las autoridades competentes o de un laboratorio oficial designado de conformidad con el artículo 37, apartado 1, y acreditado de acuerdo con la norma EN ISO/IEC 17025.
 - Que participen regularmente y con resultados satisfactorios en los ensayos interlaboratorios comparados o en los ensayos de aptitud organizados por los laboratorios nacionales de referencia para los métodos que los laboratorios oficiales utilicen para la detección de triquinas.
- El **Reglamento** de Ejecución **(UE) 2020/1478** de la Comisión de 14 de octubre de 2020 por el que se modifica el Reglamento de Ejecución (UE) 2015/1375 en lo relativo al muestreo, y al método de referencia para la detección y las condiciones de importación respecto al control de las triquinas ha sido publicado en el DOUE nº 338-2020).

ISO 18743: 2015 especifica un método de detección de larvas de *Trichinella* spp., en estadio muscular en la carne de canales individuales de animales destinadas al consumo humano (AENOR, 2016), (adjuntamos resumen de la norma ISO 18743: 2015 como anexo 2 de esta tesis). Es aplicable al examen de carnes de especies animales domésticas y silvestres, que puedan estar infectadas por nematodos del género *Trichinella*. La ISO 18743:2015 es la

primera norma internacional sobre parásitos en microbiología alimentaria, y podría considerarse como un documento de impacto para la industria alimentaria, debido a su coherencia con la Comisión Europea (en el bloque de anexos adjuntamos las principales diferencias entre el método de referencia para detección de triquinas recogido en el anexo 1 del Reglamento de Ejecución (UE) 2015/1375 y la sustitución por el nuevo método para la detección de triquinas mediante la norma ISO 18743:2015, establecido con la entrada en vigor del nuevo Reglamento (Reglamento (UE) 2020/1478).

3.2.-*Spirocerca* spp.

3.2.1 Etiología.

Hasta 2018 el nematodo *S. lupi*, un parásito que afectaba a perros y otros cánidos silvestres, era considerado el único agente causal de la espirocercosis (Bailey, 1972). Sin embargo, en este mismo año 2018 se propuso una nueva subespecie *Spirocerca vulpis* sp. nov., (Rojas *et al.*, 2018a), la cual hasta la fecha solo se ha descrito en el el zorro rojo (*Vulpes vulpes*) (Sanchis-Monsonis *et al.*, 2019; Martín-Pérez *et al.*, 2020). Algunas incógnitas deben aún ser resueltas respecto a esta nueva subespecie, como es el abanico de especies a las que parasita, hospedadores intermediarios, localización orgánica, patogenicia, etc.

El ciclo biológico de *Spirocerca* spp., es indirecto, involucrando a escarabajos coprófagos como hospedadores intermediarios (Bailey., 1972; Du Toit *et al.*, 2008), si bien puede haber HP, como pequeños pájaros, reptiles y roedores (Chhabra & Singh, 1972; Fox *et al.*, 1988). Los HD serían animales de la familia Canidae, como el perro doméstico (*Canis lupus familiaris*) (Bailey *et al.*, 1963a; Dvir *et al.*, 2001; Lobetti, 2000; Mazaki-Tovi *et al.*, 2002), cánidos silvestres (Bailey, 1972; Pence *et al.*, 1978), lobo ibérico (Domínguez & de la Torre, 2002), e incluso infecciones atípicas, como en el gato (Mense *et al.*, 1992) (tabla 8).

Tabla 8.- Hospedadores silvestres de *Spirocerca* spp.

Especie carnívoro	Lugar	Localización anatómica	Referencia del autor
<i>Vulpes vulpes</i>	Antigua Checoslovaquia	----	Prokopic, 1960
<i>Vulpes vulpes</i>	Antigua Yugoslavia	Necropsia	Pavlovic <i>et al.</i> , 1997
<i>Vulpes vulpes</i>	Irán	Necropsia	Meshgi <i>et al.</i> , 2009
<i>Vulpes vulpes</i>	Azerbaiyán	----	Fataliev, 2011
<i>Vulpes vulpes</i>	Bulgaria	Necropsia	Kirkova <i>et al.</i> , 2011
<i>Vulpes vulpes</i>	Grecia	Necropsia (Estomago)	Diakou <i>et al.</i> , 2012
<i>Vulpes vulpes</i>	Italia	Necropsia (Estomago)	Leoni <i>et al.</i> , 1985
<i>Vulpes vulpes</i>	Italia	Necropsia (Estomago)	Ferrantelli <i>et al.</i> , 2010
<i>Vulpes vulpes</i>	Italia	Necropsia (Estomago)	Guardone, 2013
<i>Vulpes vulpes</i>	Italia	Estomago; aneurisma aórtico	Morandi <i>et al.</i> , 2014
<i>Vulpes vulpes</i>	Italia	Necropsia (Estomago)	Magi <i>et al.</i> , 2015
<i>Vulpes vulpes</i>	España	----	Martinez <i>et al.</i> , 1978
<i>Vulpes vulpes</i>	España	Ganglios linfáticos	Reina <i>et al.</i> , 1994
<i>Vulpes vulpes</i>	España	Necropsia	Gortazar <i>et al.</i> , 1998
<i>Vulpes vulpes</i>	España (CyL)	Necropsia (Estomago)	Gonzalez <i>et al.</i> , 2009

Espece carnívoro	Lugar	Localización anatómica	Referencia del autor
<i>Vulpes vulpes</i>	España	Necropsia (Estomago) Linfonodos epigástricos	Calero-Bernal <i>et al.</i> , 2011
<i>Vulpes vulpes</i>	España	Estomago; Omento mayor ; Mesenterio ; Pericardio	Sanchis-Monsonis, 2015
<i>Vulpes vulpes</i>	España (Ciudad Real)	Necropsia (Estomago)	Valcárcel <i>et al.</i> , 2018
<i>Vulpes vulpes</i>	Península Iberica	Necropsia (Estomago)	Segovia <i>et al.</i> , 2004
<i>Vulpes vulpes</i>	Portugal	Necropsia	Segovia <i>et al.</i> , 2001
<i>Vulpes vulpes</i>	Portugal	Necropsia	Eira <i>et al.</i> , 2006
<i>Vulpes vulpes</i>	Dinamarca	(Necropsia) Estómago y omento	Al-Sabi <i>et al.</i> , 2014
<i>Vulpes vulpes</i>	Ucrania	(Necropsia) Estómago y esófago	Varodi <i>et al.</i> , 2017
<i>Vulpes vulpes</i>	Finlandia	Necropsia (Estomago)	Isomursu <i>et al.</i> , 2010
Zorro colorado (<i>Lycalopex culpaeus</i>)	Perú	Esófago y aorta	Gómez-Puerta <i>et al.</i> , 2018
Zorro gris (<i>Urocyon cinereoargenteus</i>)	EE.UU. (West Texas)	Aorta	Pence & Stone., 1978
Perro venadero (<i>Speothos venaticus</i>)	Argentina	Aorta	Rinas <i>et al.</i> , 2009
Chacal (<i>Canis aureus</i>)	Irán	Necropsia	Meshgi <i>et al.</i> , 2009
Chacal (<i>Canis mesomelas</i>)	Sudáfrica	lesiones aórticas ; nódulo ocasional esofágico	Bumby <i>et al.</i> , 2017
Chacal (<i>Canis mesomelas</i>)	Sudáfrica	Aorta	Rothmann & de Waal, 2017
Coyote (<i>Canis latrans</i>)	Utah (EE.UU.)	Hígado	Conder & Loveless, 1978
Coyote (<i>Canis latrans</i>)	EE.UU. (Arizona , Colorado , Kansas , Nuevo México)	Aorta y ocasional Esófago	Morrison & Gier, 1979
Coyote (<i>Canis latrans</i>)	Texas (EE.UU.)	Necropsia	Henke <i>et al.</i> , 2002
Coyote (<i>Canis latrans</i>)	EE.UU.	Esófago y aorta	Pence & Meinzer, 1979
Coyote (<i>Canis latrans</i>)	México	Intestino Grueso	Estrada <i>et al.</i> , 2017
Lobo (<i>Canis lupus signatus</i>)	España		Cordero del Campillo <i>et al.</i> , 1994
Lobo (<i>Canis lupus signatus</i>)	España	Carpología	Domínguez & De la Torre, 2002
Lobo (<i>Canis lupus</i>)	Bielorrusia	Necropsia	Shimalov & ShiMalov, 2000
Lobo (<i>Canis lupus</i>)	Polonia	Coprologia	Szczęśna & Popiołek, 2007
Lobo de crin (<i>Chrysocyon brachyurus</i>)	Brasil	Lobulos pulmonares	Blume <i>et al.</i> , 2014
Felinos Salvajes (Familia Felidae)	EE.UU.	----	Bowman & Lynn, 1999
Felinos Salvajes (Familia Felidae)	EE.UU.	----	Anderson, 2000
Felinos Salvajes (Familia Felidae)	Península Iberica	Necropsia	Segovia <i>et al.</i> , 2004
Gato montes (<i>Felis silvestris</i>)	Bulgaria	Necropsia	Kirkova <i>et al.</i> , 2011
Guepardo (<i>Acinonyx jubatus</i>)	Kenia	Aorta	Murray <i>et al.</i> , 1964
Lince Americano (<i>Felis rufus</i>)	EE.UU.	Aorta	Pence & Stone., 1978
Gato domestico (<i>Felis silvestris catus</i>)		Estudios experimentales	Gundlach & Sadzikowski, 2004
Gato domestico (<i>Felis silvestris catus</i>)	Inglaterra	Coprologia	Wright <i>et al.</i> , 2016
Mustélidos (Familia Mustelidae)	Bielorrusia	Necropsia	Shimalov & ShiMalov, 2002
Viverridae (Familia Viverridae)	España	----	Cordero del Campillo <i>et al.</i> , 1994
Viverridae (Familia Viverridae)	España	----	Simón Vicente, 1975.
Lemur (<i>Lemur catta</i>)	Magadascar	----	Blancou & Albignac, 1976
Lemur (<i>Lemur catta</i>)	Magadascar	Carpología	Alexander <i>et al.</i> , 2016
Mapache boreal (<i>Procyon lotor</i>)	Polonia	Carpología	Popiołek <i>et al.</i> , 2011
Conejos (Familia Leporidae)	India	----	Chowdhury & Pande, 1969

3.2.2.- Taxonomía de *Spirocerca*.

La espirocercosis es una enfermedad parasitaria que afecta a cánidos domésticos causada por el nematodo *Spirocerca lupi* (Rudolphi, 1819), Spirurida Spirocercidae (Anderson, 2000; Van der Merwe *et al.*, 2008; Elías *et al.*, 2016). La clasificación taxonómica es la siguiente (tabla 9).

Tabla 9.- Clasificación Taxonómica de la especie *Spirocerca lupi*.

Reino	Animalia
Filo	Nematoda
Clase	Secernentea
Orden	Spirurida
Familia	Spirocercidae
Género	<i>Spirocerca</i>
Especie	<i>Spirocerca lupi</i>

Aunque este nematodo puede ser cosmopolita, se suele encontrar en regiones tropicales y subtropicales con climas cálidos (Bailey, 1972). Los parásitos adultos son de color rojo y de 30 a 80 mm de largo, enrollado en forma de espiral que producen nódulos con cavidades llenas de líquido lechoso en los cuales viven las larvas adultas del parásito (Neveu-Lemaire, 1936). La especie *S. lupi* parasita principalmente a perros domésticos (Bailey *et al.*, 1963a), aunque también infecta a otros miembros de la familia Canidae (Bailey *et al.*, 1972; Mazaki-Tovi *et al.*, 2002). Se han reportado infecciones naturales en otros miembros de la familia Canidae como coyotes, lobos, zorros y chacales, que sirven como importantes reservorios (Bailey, 1972; Pence & Stone, 1978; Domínguez & de la Torre, 2002; Bumby *et al.*, 2017).

Se han postulado dos haplotipos (genotipos), encontrados mediante el estudio del gen mitocondrial que codifica la subunidad 1 del citocromo c oxidasa (*cox1*) de *S. lupi*: haplotipo 1, especímenes de Europa (Italia y Austria) y haplotipo 2, especímenes de Asia (Israel e Irán) y Sudáfrica (Traversa *et al.*, 2007).

Por otra parte, la teoría de que especies parásitas distintas (o subespecies) afecten a las distintas especies hospedadoras de cánidos fue sugerida por Al-Sabi *et al.* (2014), encontrando un aislado genéticamente distinto de *S. lupi* en el zorro rojo en Dinamarca, a los publicados anteriormente en la base de datos de Gen-Bank procedentes de perros.

Como ya se comentó, diferencias morfológicas por microscopía electrónica (SEM), entre muestras de *Spirocerca* encontradas en zorros en España, Bosnia y Herzegovina e Italia frente a las encontradas en perros domésticos de Israel, India y Suráfrica, junto con una combinación de los análisis genéticos utilizando el gen ITS1 y la subunidad 1 del citocromo c oxidasa han revelaron una nueva subespecie de *Spirocerca*, descrita en zorros en Europa y denominada *S. vulpis* sp. nov. (Rojas *et al.*, 2018a). Las diferencias entre las 2 subespecies son:

- Diferencias genéticas en las secuencias de ADN de los loci *cox1* e ITS-1 entre *S. lupi* y *S. vulpis*, variaciones del 6.8% y 6.1%, respectivamente.
- Diferencias morfológicas, que ayudan en la diferenciación entre *S. lupi* y *S. vulpis* como es la presencia de estructuras similares a dientes que emergen de la cápsula bucal en *S. vulpis* y su ausencia en *S. lupi*. (Tabla 10) (imágenes de microscopía de la 1 a la 9 *)
- *S. vulpis* se encuentra predominantemente en la mucosa gástrica, mientras que los adultos de *S. lupi* se encuentran principalmente en nódulos esofágicos (imágenes 10, 11)

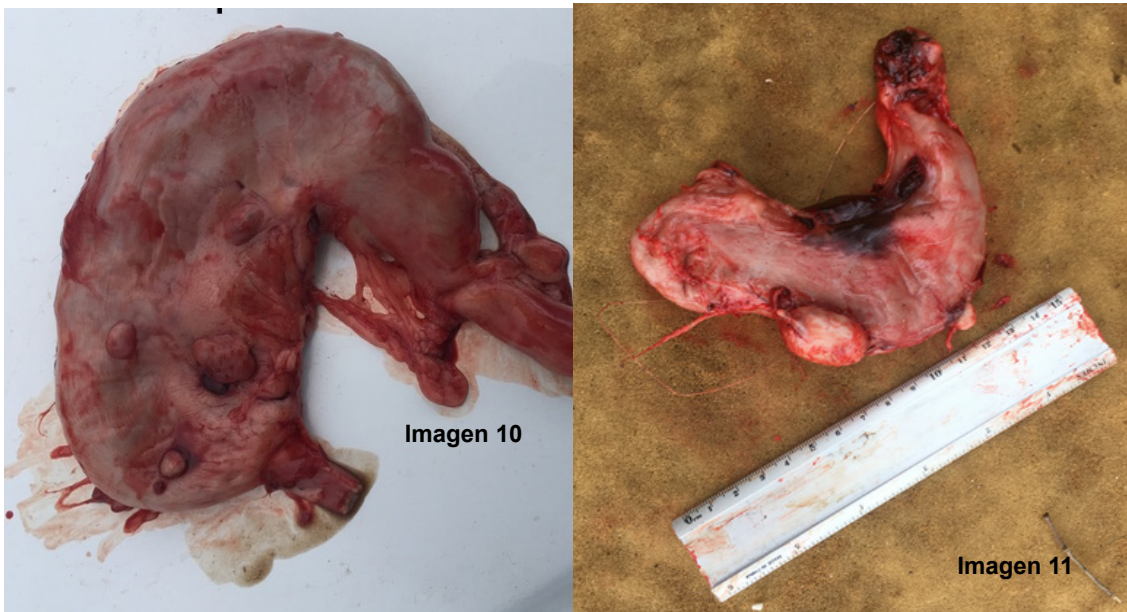


Imagen 10 y 11.- Localización principal de *Spirocerca vulpis* sp. nov., en zorro rojo.

Tabla 10. - Diferencias morfológicas encontradas por microscopía electrónica y de barrido entre *Spirocerca lupi* y *Spirocerca vulpis sp. nov* (Rojas *et al.*, 2018a; Rojas *et al.*, 2019).

	<i>Spirocerca lupi</i>	<i>Spirocerca vulpis sp. nov.</i>
Localización nódulo parasitario	Localización principal en nódulos esofágicos	Localización principal en nódulos pared gástrica
Estructuras comunes en extremo anterior a <i>Spirocerca spp</i>	Cápsula bucal altamente esclerotizado con papilas cefálicas con un par de anfidios	Cápsula bucal altamente esclerotizado con papilas cefálicas con un par de anfidios
Estructuras de la capsula bucal	Ausentes	presencia de seis estructuras de cápsulas bucales similares a dientes triangulares
Gusanos hembra la distancia de la abertura de la vulva al extremo anterior		Son mayores (P <0.006).
Gusanos hembra la relación de las longitudes del esófago glandular a muscular		Son mayores (P <0.006).
En los machos	Las longitudes de todo el esófago y la parte glandular fueron menores en <i>S. lupi</i> (P <0.044)	
En los machos	La relación entre el esófago glandular y muscular fueron menores en <i>S. lupi</i> (P <0.044)	
En los machos	La comparación del esófago con la longitud total del cuerpo fue menores en <i>S. lupi</i> (P <0.044)	

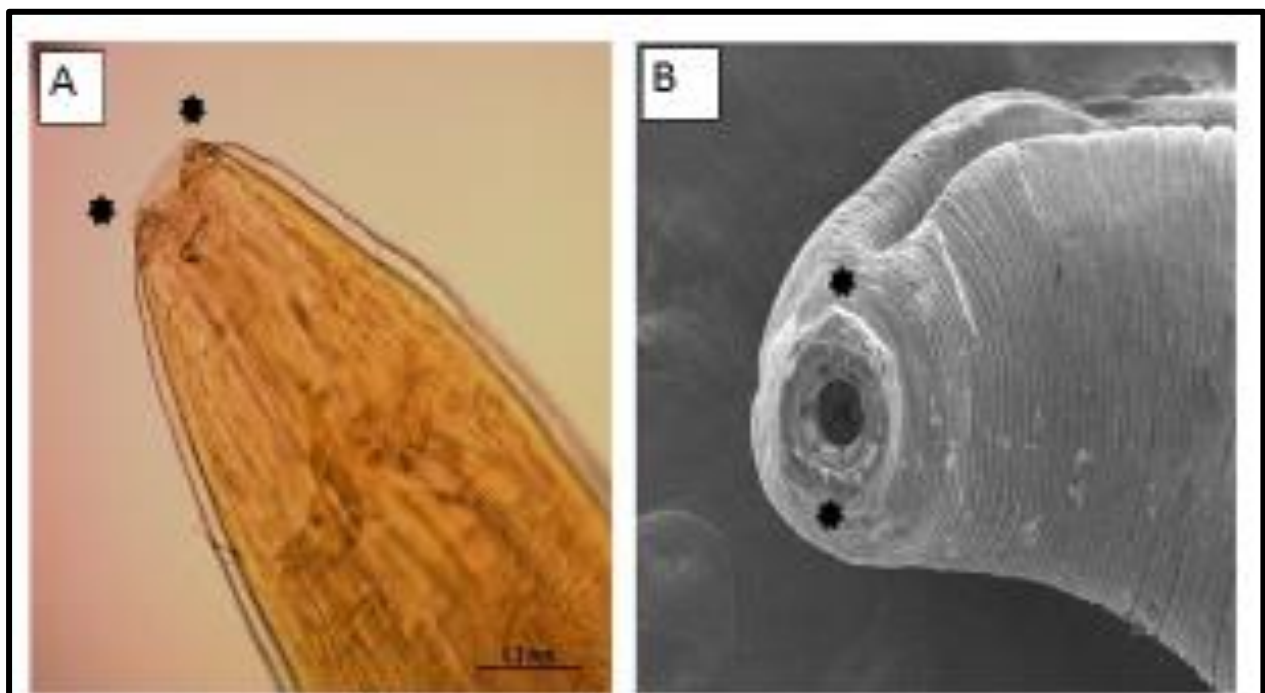
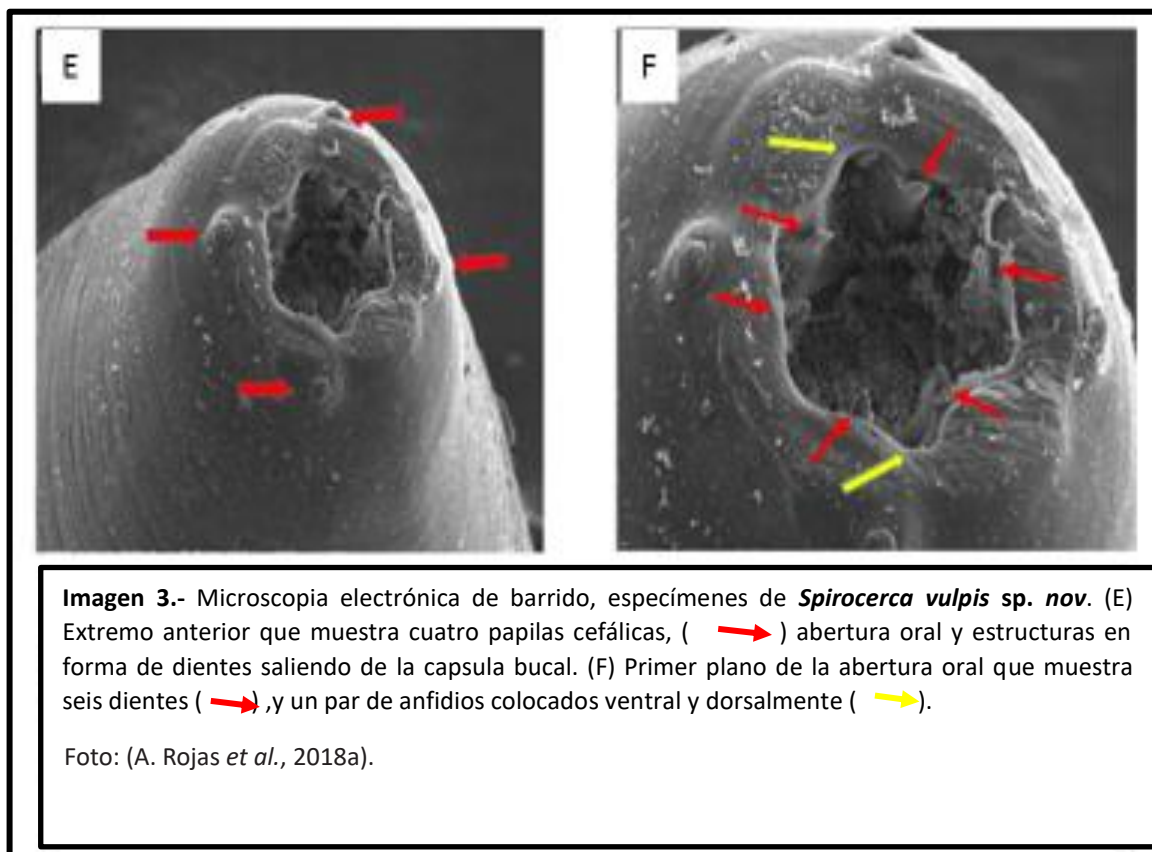
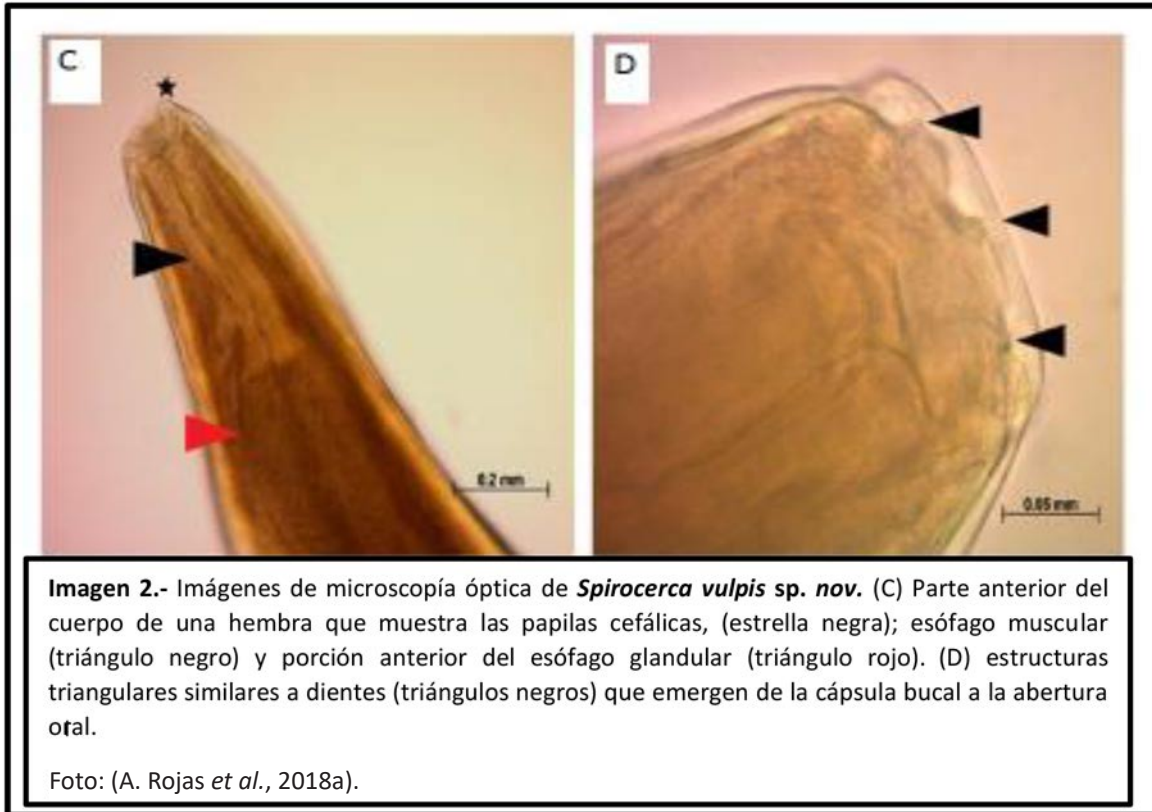
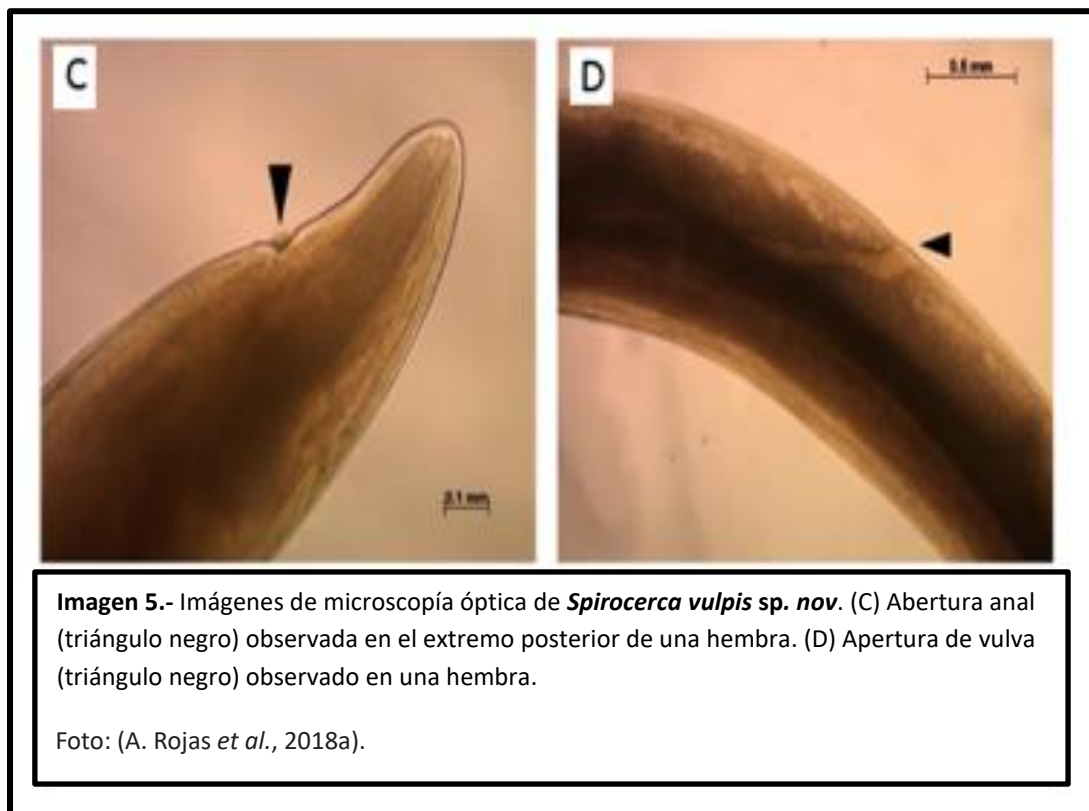
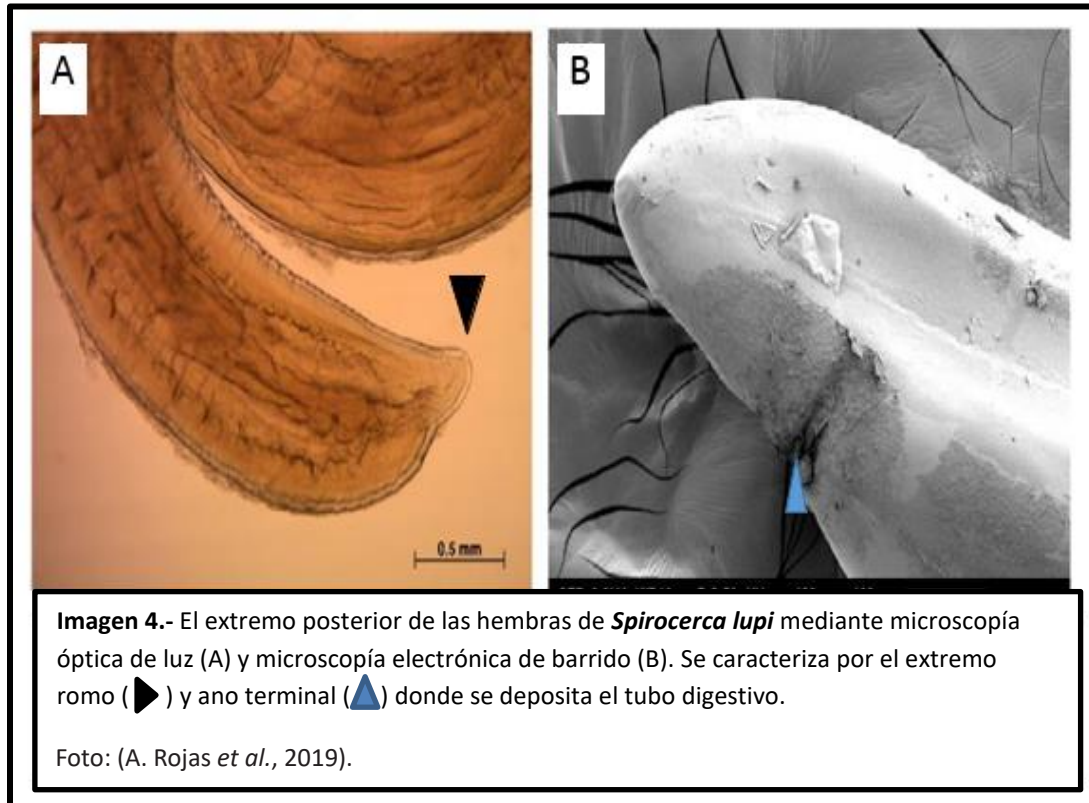
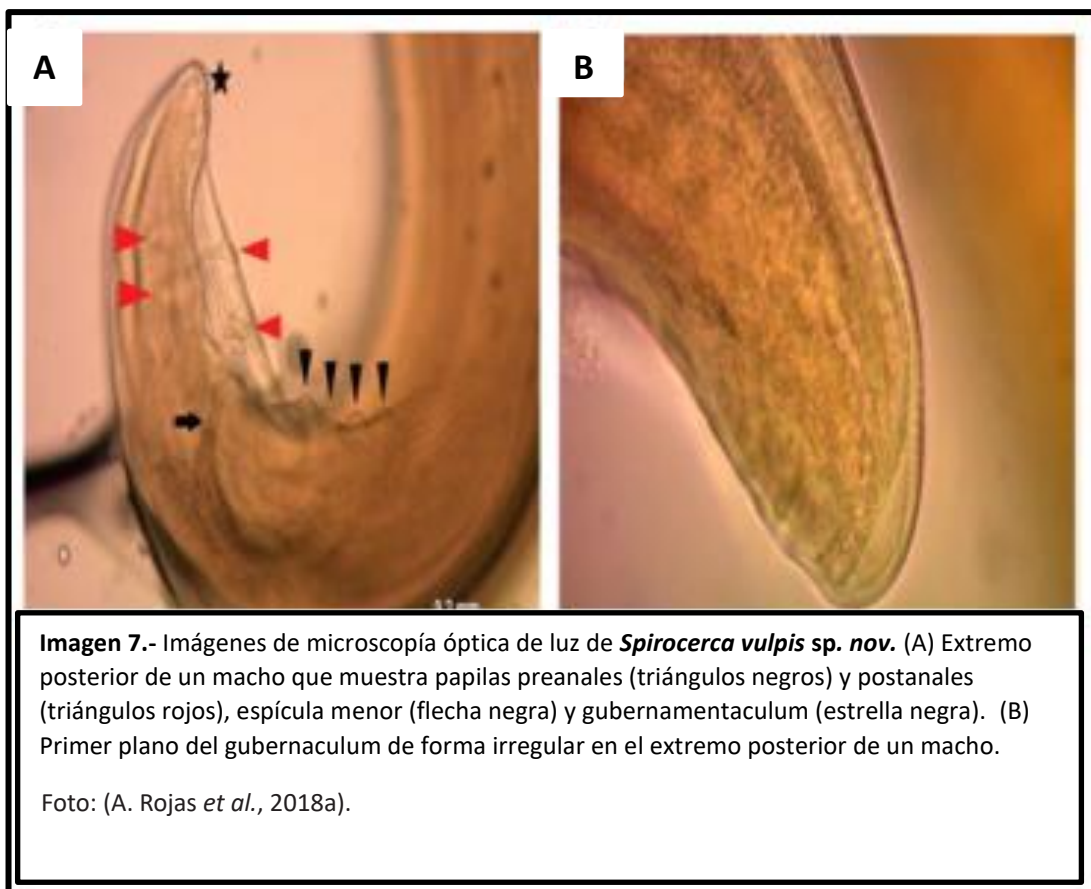
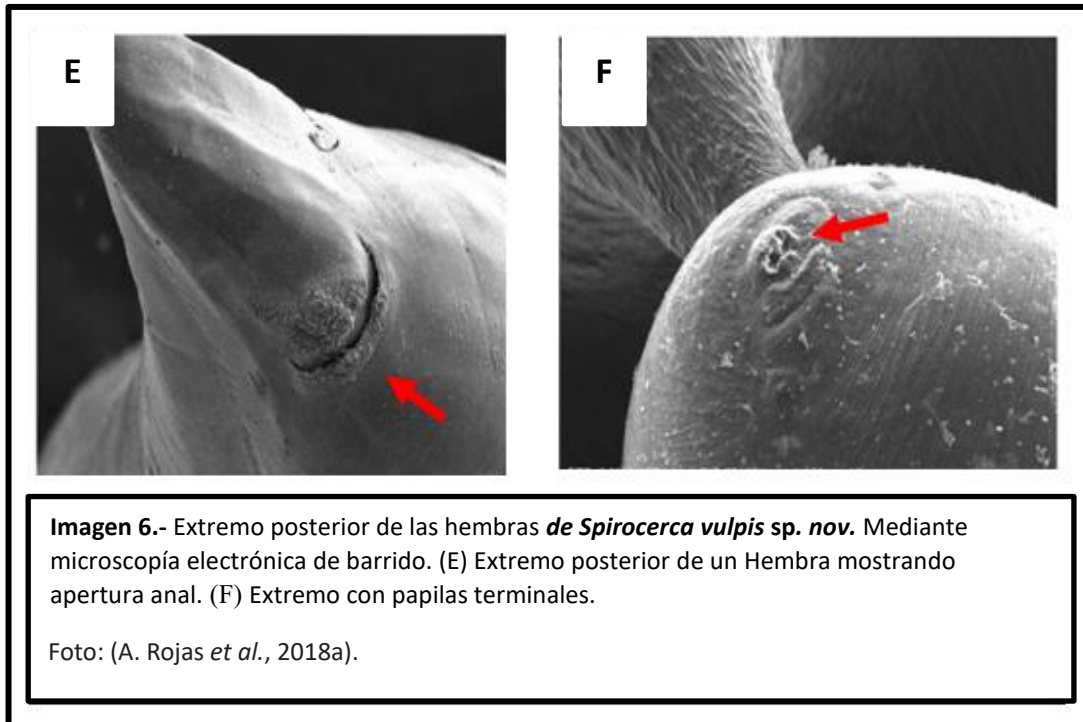


Imagen 1.- Morfología de la cápsula bucal hexagonal de larvas adultas de *Spirocerca lupi* mediante microscopía óptica de luz y microscopía electrónica de barrido, con un par de anfidios y dos pares de papilas cefálicas son evidentes en (A) y (B). ★

Foto: (A. Rojas *et al.*, 2019)







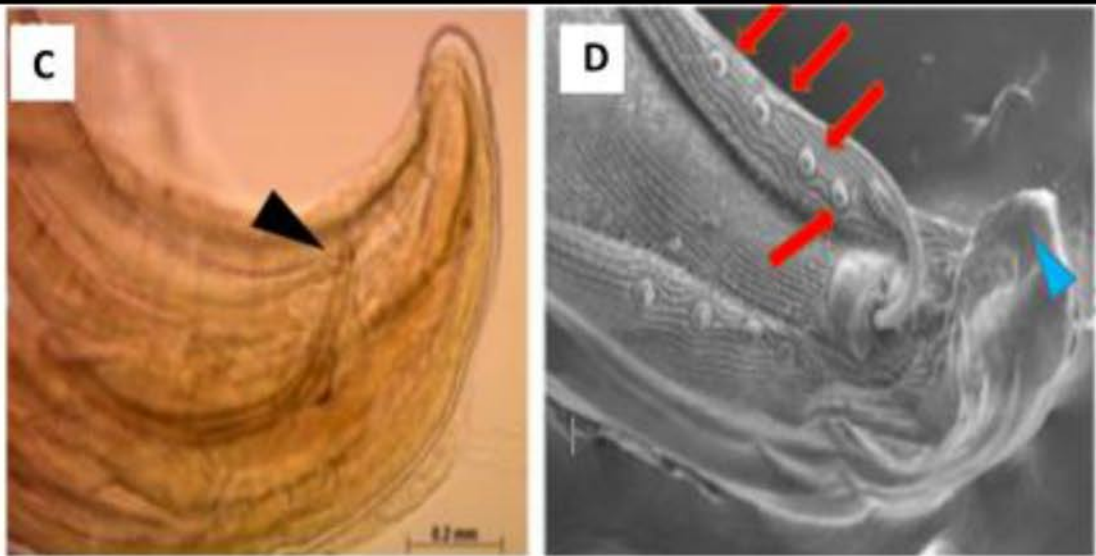





Imagen 8.- Extremos posteriores de los adultos de *Spirocercus lupi*, mediante microscopía óptica de luz (C) y electrónica de barrido (D), permite el sexado de los gusanos. (C) muestra la espícula menor de un macho (). (D) describe más detalles del extremo posterior de un macho con espículas menores, estriación paralela de la cutícula, cuatro pares de papilas preanales equidistantes () y gubernaculum ().

Foto: (A. Rojas *et al.*, 2019).

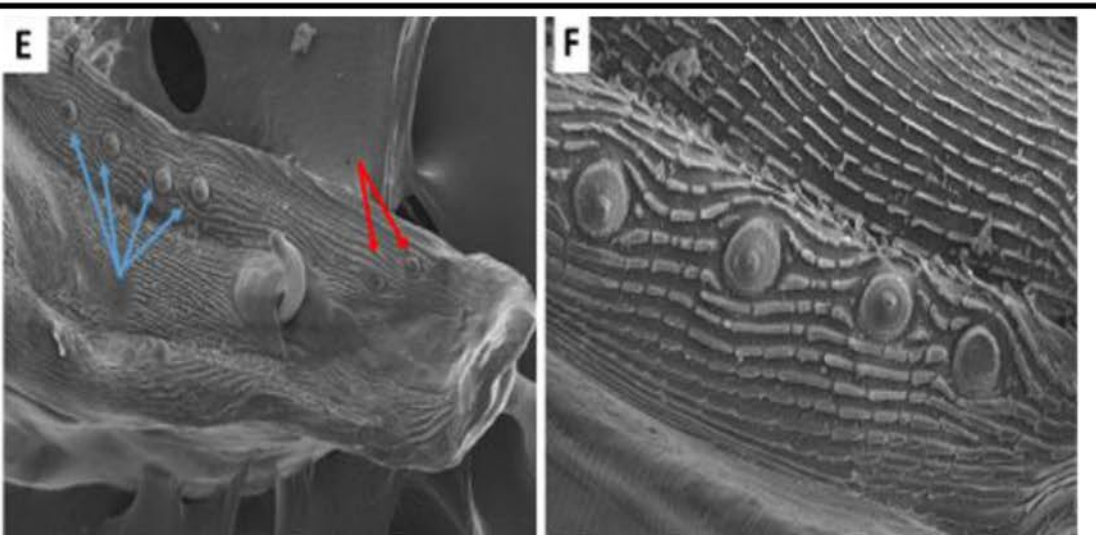




Imagen 9.- Microscopía electrónica de barrido del extremo posterior de un macho de *Spirocercus vulpis* sp. nov. (E) Parte posterior de un macho que muestra espícula menor, papilas preanales () y posanal (). (F) Primer plano de papilas preanales y estrías longitudinales paralelas cortas.

Foto: (A. Rojas *et al.*, 2018a).

Sin embargo, aún quedan algunas incógnitas por aclarar en cuanto a *S. vulpis*, como los hospedadores o el origen geográfico y evolutivo de este parásito, ya que, por ejemplo, vermes reportados del zorro andino *Lycalopex calpaeus* en Perú, están genéticamente relacionados con *S. lupi* de Israel y también su localización son los nódulos esofágicos (Rojas *et al.*, 2018b).

Estudios más pormenorizados genética y morfológicamente deben ser llevados a cabo cuando se detecten infecciones producidas por *Spirocerca* spp., en animales de vida silvestre. La evidencia genética sugiere que *S. lupi* podría ser un complejo de especies, compuesto por varios genotipos y especies crípticas, y que existe diferencias determinantes entre *Spirocerca* spp., que parasitan cánidos salvajes, respecto a *Spirocerca* spp., de cánidos domésticos.

3.2.3.- Ciclo biológico de *Spirocerca lupi* y *Spirocerca* spp.

Como ya se ha mencionado, el ciclo de vida de *S. lupi* involucra cánidos como HD, (Bailey *et al.*, 1963a), y escarabajos coprófagos como HI (Bailey, 1972; Du Toit *et al.*, 2008; Gottlieb *et al.*, 2011) (figura 2).

La localización definitiva típica del parásito en el perro doméstico es el esófago en la forma adulta (Bailey *et al.*, 1963a). Se observan también migraciones de larvas de tercer estadio (L3) que dañan la aorta torácica (Kirberger *et al.*, 2013). Los huevos larvados con L1 de *S. lupi* son eliminados por los adultos desde el nódulo hacia el lumen del esófago (en el caso del zorro, los nódulos son gástricos y los huevos se eliminan directamente hacia la luz gástrica). De una u otra forma, los huevos son dispersados posteriormente en las heces del HD (Chhabra & Singh, 1972; Rojas *et al.*, 2017a), y a veces también en el vómito, (Van der Merwe *et al.*, 2008), permaneciendo sin eclosionar hasta no ser ingeridos por el HI (Rojas *et al.*, 2017a).

Como HI actúan escarabajos coprófagos, aunque según la susceptibilidad a la infección por *S. lupi* puede ser variable según la especie (Bailey *et al.*, 1963b). En algunos lugares endémicos, como Israel, ha sido bien descrita la especie de escarabajo que actúa como HI, que es *Onthophagus sellatus* (Gottlieb *et al.*, 2011). En Sudáfrica se han caracterizado como HI a *Onthophagus pugionatus*, *Onthophagus ebenus* y *Gymnopleurus virenas* (Du Toit *et al.*, 2008). Otros autores encontraron como HI en Sudáfrica a *Pachylomerus femoralis*, *Scarabaeus rugosus*, *Gymnopleurus humanus*, *Kheper nigroaeneus* y *Anachalcos convexos* (Mukaratirwa *et al.*, 2010). También se han descrito experimentalmente otras especies de artrópodos, incluidos los milpiés (*Daratoagonus cristulatus*), los cuales pueden desarrollar las etapas de L3 después de la alimentación de huevos de *S. lupi* y ser posibles HI (Mukaratirwa *et al.*, 2010). Las L3 se pueden observar en los escarabajos tras su disección, en agua destilada y examen a la luz bajo una lupa estereoscópica, observando su presencia, técnica descrita por Mönnig en 1938.

En el ciclo parasitario, los huevos que contiene la L1 son ingeridos por el HI. Las larvas mudan de L1 a L2 y L3 en el hemocele del escarabajo (Chhabra & Singh, 1972;

Van der Merwe *et al.*, 2008, Austin *et al.*, 2013), enquistándose principalmente en los tubos traqueales (Mazaki-Tovi *et al.*, 2002).

Se ha visto que la ingestión de los huevos por el escarabajo es dependiente del tamaño del mismo (Du Toit *et al.*, 2012), dependencia que afectaría también a la mayor progresión para el desarrollo de la L1 a L3 en el interior del escarabajo (Mukaratirwa *et al.*, 2010). Las piezas bucales de los escarabajos de la familia Scarabaeidae permiten el paso de partículas de alimentos en el rango de 2–150 μm , y por lo tanto, son compatibles con la ingestión de huevos embrionados de *S. lupi* que tienen 30-37 μm de largo y 11-15 μm de ancho (Du Toit *et al.*, 2012). Los huevos eclosionan en la cavidad bucal del escarabajo y el intestino medio aproximadamente 8 h después de la infección. Este proceso se ve facilitado por la fuerza mecánica inducida por las piezas bucales del escarabajo, aunque también por un cambio en las condiciones encontradas dentro del HI, así como por el pH, la T^a, la concentración de CO₂ y enzimas proteolíticas (Rojas *et al.*, 2017a). Diversas especies de aves domésticas y silvestres, pequeños mamíferos, anfibios y reptiles, incluso otros artrópodos, pueden actuar como hospedadores de transporte u HP (Chowdhury & Pande, 1969; Chhabra & Singh, 1972; Fox *et al.*, 1988; Van der Merwe *et al.*, 2008; Ravindran *et al.*, 2014; Aroch *et al.*, 2017). Si el escarabajo infectado es ingerido por un HP, las L3 se enquistan nuevamente en el esófago, mesenterio u otros órganos de este HP, pudiendo ser transferida de un HP a otro. El HD final puede infestarse por ingestión directa del escarabajo infectado (HI) o ingestión de otros animales con formas quísticas de L3 (HP). Está documentado que las larvas enquistadas en las vísceras de pollos pueden ser de especial importancia en la transmisión de la infestación a perros a los que se alimente con vísceras de desecho (Soulsby, 1987; Flynn, 1973). Se ha visto que los perros también se infectan por coprofagia de sus propias heces o de otros perros (Du Toit *et al.*, 2008; Yogeshpriya, 2016).

Una vez que la L3 es ingerida por el HD, es liberada en el estómago, permaneciendo en el estómago del perro 2 días (Nazaroa, 1963), para posteriormente penetrar en la pared intestinal y pared gástrica y comenzar a migrar a través de las paredes de las arterias gástricas (de la gastroepiplónica a la celíaca), que potencialmente pueden causar irritación y vómitos (Bailey, 1972; Lavy *et al.*, 2003). La migración de las L3 desde el estómago comienza por tanto entre 24-28 horas post-infección (Beugnet *et al.*, 2016). Aproximadamente entre el día 10 después de la infección y el día 21, se pueden encontrar vermes en la pared de la aorta torácica caudal hasta 100 días aproximadamente, a partir de entonces migrarán cranealmente a través de la pared del vaso (Van der Merwe *et al.*, 2008). En este período la L3 muda a la etapa preadulta L4 (Sen & Anantaraman, 1971; Soulsby, 1987). Una vez que se ha desarrollado la L3 a L4 preadulta de *S. lupi*, el parásito migra hacia su localización final a través de la pared íntima de la aorta y no alcanzan la luz aórtica donde enfrentarían un fuerte flujo sanguíneo que le impediría avanzar (Sen & Anantaraman, 1971). Entre el día 93-100 después de la infección, la mayoría de las larvas de *S. lupi* alcanza el esófago en una posición donde está adyacente a la aorta en el mediastino y madura en la submucosa esofágica, induciendo la formación de un nódulo comunicado con el lumen esofágico a través de un opérculo o fístula permanente (Van der Merwe *et al.*, 2008). Macho y hembra adultos completan su desarrollo. Los órganos

están completamente maduros aproximadamente entre el día 140-161 después de la infección (Rojas *et al.*, 2019). La máxima producción de huevos se alcanza entre 140 y 205 días después de la infección (Van der Merwe *et al.*, 2008; Beugnet *et al.*, 2016). La localización final más habitual de los adultos de *S. lupi* en el perro doméstico es el esófago (Bailey, 1972), aunque se han visto migraciones aberrantes en la cavidad torácica y vertebras (Bailey *et al.*, 1963; Harrus *et al.*, 1996; Dvir *et al.*, 2001; Mazaki-Tovi *et al.*, 2002), sistema nervioso (Chai *et al.*, 2018), así como tejido subcutáneo o el tracto urinario (Singh *et al.*, 1999).

El período de prepatencia de la infección del perro es de 121-180 días (Bailey *et al.*, 1963b; Chhabraand & Singh, 1977), y el adulto *S. lupi* puede sobrevivir en el perro durante 2 años o más diseminando huevos (Bailey, 1972). Debido a la duración del ciclo de vida del nematodo, los perros menores de 6 meses de edad, aunque infectados, aún no han desarrollado enfermedad esofágica y tampoco presentan los signos clínicos clásicos (Fox *et al.*, 1988; Wandera, 1976), siendo, por tanto, mayor la frecuencia de aparición de la infección en perros de edad más avanzada (Aroch *et al.*, 2015a).

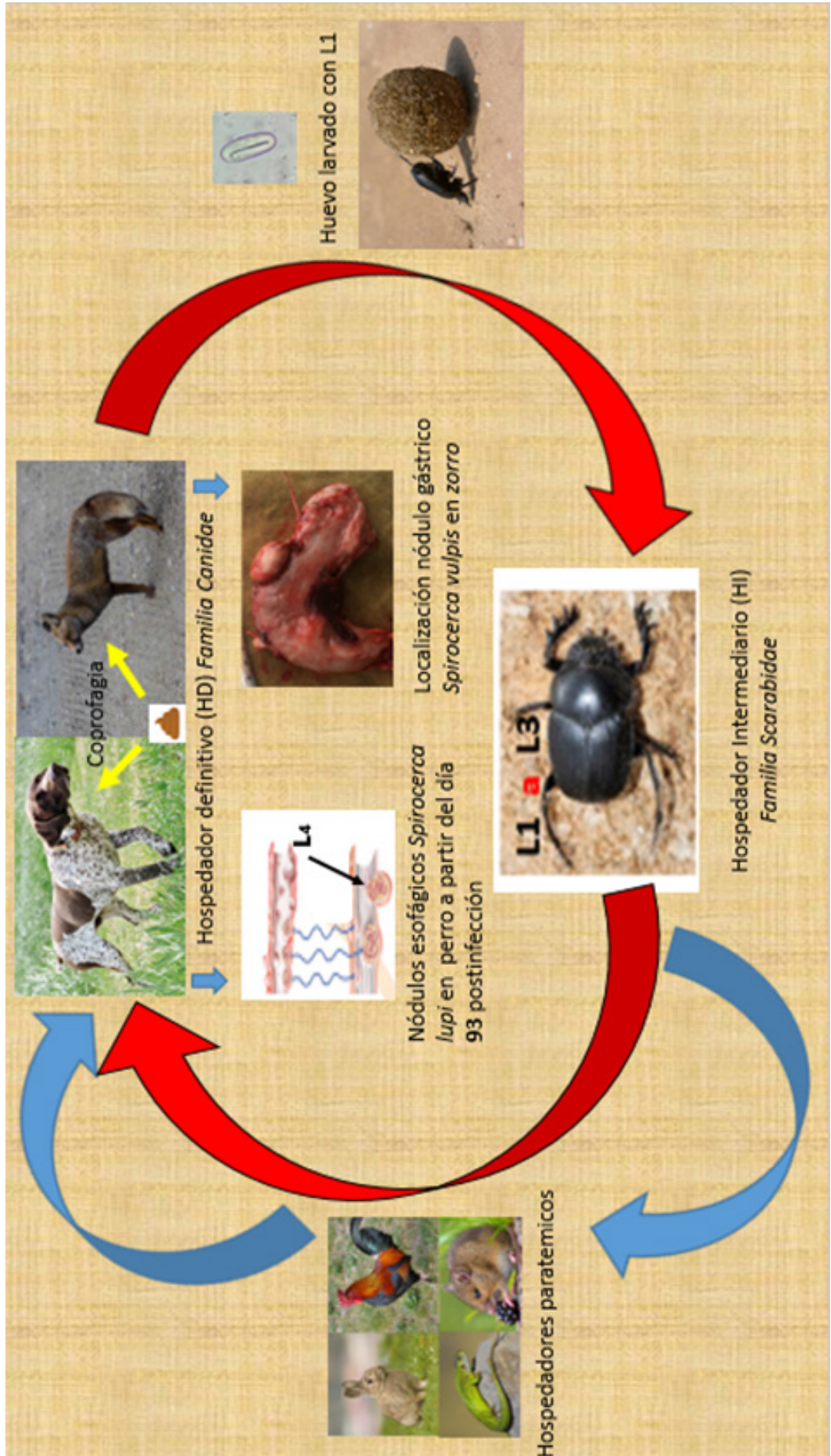


Figura 2.- Ciclo Biológico de *Spirocerca* spp.

3.2.4.- Epidemiología

La enfermedad tiene una ocurrencia cosmopolita, con mayor prevalencia en países tropicales y subtropicales (Bailey, 1972; Van der Merwe *et al.*, 2008), afectando a los miembros de la Familia Canidae (Bailey, 1972; Dvir *et al.*, 2001). La literatura también describe la espirocercosis afectando al hombre, y seguramente esto pueda ser así cuando los hábitos alimentarios lleven al hombre al consumo de sus HI, HP con L3 viables (Biocca, 1959; Yogeshpriya, 2016). La enfermedad es endémica en algunos lugares del mundo como en Sudáfrica y en Israel (Lobetti., 2000; Mazaki-Tovi *et al.*, 2002), y se descrito su presencia en numerosos países como Turquía o India (Ramachandran *et al.*, 1984), Pakistán (Anantaraman & Sen, 1966), el sur de los Estados Unidos (Dixon & McCue., 1967), Brasil (Oliviera-Sequeira *et al.*, 2002), Kenia (Brodey *et al.*, 1977) o en España (Cordero del Campillo *et al.*, 1994), algunos datos sobre prevalencia de *S. lupi* en perros pueden verse en tabla 11.

También se ha informado de determinadas características epidemiológicas en algunos lugares del mundo. En Israel, la mayoría de las infecciones (62%) son diagnosticadas en invierno (Mazaki-Tovi *et al.*, 2002), y en algunos lugares del país, como Tel Aviv, la enfermedad es más frecuente en áreas urbanas, en contraste con la información de los Estados Unidos, donde la enfermedad es más común en áreas rurales (Dixon & McCue, 1967). En Sudáfrica, en cambio, no se encontró estacionalidad de la infección (Lobetti, 2000). En Grecia se ha encontrado más prevalencia en perros de caza (Mylonakis *et al.*, 2001), mientras que en las Antillas del Caribe la prevalencia es mayor en perros callejeros (Chikweto *et al.*, 2012), (ver tabla 11 y tabla 12).

Tabla 11.- Prevalencias de *Spirocerca lupi* en algunos lugares del mundo

País	Prevalencia (%)	Autor
Sur Túnez	100	Neveu-Lemaire, 1936
Japón	10	Neveu-Lemaire, 1936
India	42	Neveu-Lemaire, 1936
Argelia	70-90	Neveu-Lemaire, 1936
Indonesia	40-50	Kraneveld & Djaenoedin, 1952
Sudáfrica	20	Kaschula & Malherbe, 1954
Tel Aviv (Israel)	74 (Diagnostico combinado)	Mazaki-Tovi <i>et al.</i> , 2002
Grecia	10 (Coprología)	Mylonakis <i>et al.</i> , 2001
Brasil	1,9 (Coprología)	Oliveira-Sequeira <i>et al.</i> , 2002
Sierra Leona	57 (Coprología)	Kamara, 1964
Kenia	56 (Coprología)	Brodey <i>et al.</i> , 1977
India	23 (Coprología)	Chandrasekharon <i>et al.</i> , 1958
Sur EE.UU	33,5-47 (Coprología)	Dixon & McCue, 1967
Isla Reunión	5 (Coprología)	Prunaux & Guignard, 1991
Malawi	100 Perros nativos (Necropsia)	Fitzsimmons, 1960
India	23,5 (Necropsia)	Ramachandran <i>et al.</i> , 1984
Marruecos	54,5 (Necropsia)	Pandey <i>et al.</i> , 1987
Kenia	3-78 (Necropsia)	Minnaar <i>et al.</i> , 2002
Sudáfrica	13-14 (Necropsia)	Minnaar <i>et al.</i> , 2002; Minnaar & Krecek, 2001
Isla de Grenada	8,8 Perros de la propiedad (Necropsia)	Chikweto <i>et al.</i> , 2012
Isla de Grenada	14,2 Perros callejeros (Necropsia)	Chikweto <i>et al.</i> , 2012

Tabla 12.- Características epidemiológicas de presentación de *Spirocerca lupi*, en el perro doméstico según algunos autores.

Características		Autor	Lugar
Presentación en meses fríos	Mayor frecuencia de aparición otoño / invierno 62% de aparición en los meses más fríos Los informes más altos se registraron en la temporada de invierno (5.91%) frente a (1,06%) en la temporada de verano	Sasani <i>et al.</i> , 2014 Mazaki-Tovi <i>et al.</i> , 2002 JyothiSree & Hafeez, 2013	Irán Israel India
Presentación todo el año	No hay estacionalidad en la presentación Frecuente en todo momento del año No varió significativamente la infección con respecto a la época año No se observó diferencia de parasitación en las distintas épocas del año	Lobetti <i>et al.</i> , 2000 Psáder <i>et al.</i> , 2017 Mylonakis <i>et al.</i> , 2006 Oliveira –Sequeira <i>et al.</i> , 2002	Sudáfrica Hungria Grecia São Paulo
Presentación razas grandes de perros	La raza Pastor Alsatian (P. Alemán) fue la más afectada Razas de perro de caza de rastro más predisuestas El peso de los perros con espirocerosis fue significativamente mayor que el peso de los perros de control (P < 0,001). Razas grandes predisuestas	Ramachandran <i>et al.</i> , 1984 Dvir <i>et al.</i> , 2001 Mylonakis <i>et al.</i> , 2001 Mylonakis <i>et al.</i> , 2006 Lobetti <i>et al.</i> , 2000 Chikweto <i>et al.</i> , 2012 Sasani <i>et al.</i> , 2014 Aroch <i>et al.</i> , 2015a	India Sudáfrica Grecia Grecia Sudáfrica Grenada (Antillas) Irán Israel
Presentación razas pequeñas de perros	Razas de perro ≤ 12 kg (Fox terrier y Jack Russell, razas terrier) estaban predisuestas a desarrollar sialorrea concurrentemente con el nódulo esofágico inducido por <i>S. lupi</i>	Van der Merwe <i>et al.</i> , 2012	Sudáfrica
Presentación en adultos respecto jóvenes	Mayor incidencia en el grupo de edad de 1 a 5 años La espirocerosis es más probable en perros > 1 año Edad media de presentación 5 años Edad de presentación media de 5,1 años La edad promedio de los casos era de 4,73 Edades > 5 años tenían una probabilidad 100 veces mayor de infectarse en comparación con los perros de ≤ 1 año La espirocerosis es más probable en perros > 1 año (P < 0,001)	Ramachandran <i>et al.</i> , 1984 Oryan <i>et al.</i> , 2008 Mazaki-Tovi <i>et al.</i> , 2002 Chikweto <i>et al.</i> , 2012 Sasani <i>et al.</i> , 2014 Aroch <i>et al.</i> , 2015a	India Irán Israel Grenada (Antillas) Irán Israel
No hay diferencias de presentación por edades	No hubo relación entre la prevalencia y la edad No hubo relación entre la prevalencia y la edad La edad varió de 7 meses a 12 años sin especificación	Mylonakis <i>et al.</i> , 2006 Mylonakis <i>et al.</i> , 2001 Van der Merwe <i>et al.</i> , 2012 Dvir <i>et al.</i> , 2001	Grecia Grecia Sudáfrica Sudáfrica
Aumento de la espirocerosis camina en últimas décadas	1991–1999 Aumento siete veces el n° casos Entre los años 2004-2009 se ha extendido respecto informe previos Aumento entre el 2007 y 2016	Mazaki-Tovi <i>et al.</i> , 2002 Aroch <i>et al.</i> , 2015a Psáder <i>et al.</i> , 2017	Israel Israel Hungria

Tabla 13. - Características epidemiológicas de presentación de *Spirocerca spp.*, en el zorro rojo (*Vulpes vulpes*), según algunos autores.

<u>Características</u>		<u>Autor</u>	<u>Lugar</u>
Estudio Zorro rojo (Vulpes vulpes) n= 286	Prevalencia de El sexo y la edad de los zorros no fueron significativos en relación con la presencia de <i>S. lupi</i> . A mayor distancia de zonas urbanizadas encontramos una mayor prevalencia. No hay diferencias significativas en la presentación por épocas del año. La mayoría de las localizaciones a nivel gástrico, ninguno en el esófago	Sanchis-Monsonis, 2015	España (Comunidad Valenciana)
Estudio Zorro rojo (Vulpes vulpes) n= 61	Prevalencia del 18,03% La prevalencia de infección fue similar para jóvenes y adultos grupos. Mayor prevalencia en mujeres que en hombres Niveles más altos de infección en primavera y otoño Localización únicamente a nivel gástrico	Valcárcel <i>et al.</i> , 2018	Zona centro Península Ibérica (Ciudad Real)
Estudio Zorro rojo (Vulpes vulpes) n= 55	Prevalencia 9,16 % Localización exclusivamente pared gástrica	Ferrantelli <i>et al.</i> , 2010	Italia (Sicilia)

La epidemiología de la espirocercosis en el zorro se describe en la tabla 13. Se señala por los autores como *S. lupi*, pero hay una alta probabilidad de que se trate de *S. vulpis*, gracias a lo que se conoce por los estudios recientemente publicados que atribuyen a la subespecie *S. vulpis* sp. nov. como la que afecta al zorro (Rojas *et al.*, 2018a) y además debido a la falta de estudios moleculares y de SEM en el momento de los estudios publicados por los autores (tabla 13).

La espirocercosis es una enfermedad emergente y los factores más importantes que afectan la prevalencia son la proximidad a HI y HP, o de transporte y la densidad poblacional de HD y HI infectados (Lobetti., 2000; Mazaki-Tovi *et al.*, 2002). Los huevos consumidos por un escarabajo pelotero se desarrollan de L1 a L3 en el escarabajo (Austin *et al.*, 2013). Solo un pequeño porcentaje de escarabajos expuestos a heces contaminadas con huevos de *Spirocerca* sp que ingieren estos huevos desarrollarán el proceso infeccioso del paso de L1 a L3 (Gottlieb *et al.*, 2011). Además, los huevos pueden requerir largos tiempos de exposición dentro del artrópodo, si bien en óptimas condiciones este paso va a ser más corto. El período de desarrollo de L1 a L3, en condiciones de Tª de 29.4 – 37.7 °C fue descrito como de 8 días (Chhabra & Singh, 1972). La capacidad de los vectores artrópodos para actuar de manera más activa o pasivamente dependería por lo tanto de varias causas, entre las que incluyen condiciones climáticas favorables al HI, a la supervivencia y al desarrollo de patógenos dentro del hospedador vector (Reisen, 2009). Algunos de estos factores climáticos serían la Temperatura ambiente (TA) y la HR. Un aumento en la TA puede promover una mayor probabilidad de que el HI se infecte con nematodos (Genchi *et al.*, 2009; Laaksonenet *et al.*, 2010). Algunos autores, como Gottlieb *et al.* (2011), han llegado a la conclusión que tras la exposición experimental de los escarabajos (*Onthophagus sellatus*) a 27 ° C y 60% de HR los excrementos de cánidos infectados por *Spirocerca* spp., se detectan las larvas L1 desde el día 4 después de la alimentación con heces infectadas. La etapa infectiva de *S. lupi*, la L3, ha sido detectada en un periodo de 7 días después de la alimentación de las heces infectadas. La HR y la TA a las que se expone previamente el escarabajo *O. sellatus*, influyen en la capacidad de *S. lupi* para desarrollarse y sobrevivir en el HI, y puede usarse para predecir el riesgo de infección por *S. lupi* en perros en Israel (Gottlieb, 2014). En otras ocasiones, como ya se ha mencionado, pueden transcurrir hasta 2 meses después de la ingestión hasta que los huevos eclosionan y se desarrollan a la fase infecciosa (L3). En estos casos, las larvas infectantes se enquistan principalmente en los túbulos traqueales (Mazaki-Tovi *et al.*, 2002). Cuando los escarabajos están expuestos a condiciones desfavorables, es probable que estos períodos sean más largos, y los escarabajos pueden ser incapaces de soportar un período de desarrollo más largo que las larvas de *S. lupi*. También se sabe que la respuesta inmune en los artrópodos es dependiente de la Tª frente a las infecciones bacterianas (Murdock *et al.*, 2012). El impacto de la TA y la HR también es probable que sea crítico para la supervivencia de los huevos de *S. lupi* antes de su adquisición por el HI Scarabaeidae (Gottlieb *et al.*, 2014). En conclusión, las fluctuaciones anuales y mensuales en las prevalencias parasitarias de las larvas de *S. lupi* en *O. sellatus* se ha visto que pueden reflejar cambios en la capacidad del escarabajo para sostener el desarrollo de larvas de *S. lupi* debido a cambios climáticos, por lo que se podría concluir que los cambios en TA y HR también pueden explicar los cambios estacionales en la probabilidad de

las prevalencias parasitarias en los HD (Gottlieb *et al.*, 2011). En determinados microambientes hay mayor conversión de L1 a L3 dentro del mismo HI. En un estudio en Israel entre dos zonas próximas, en el que no variaban las condiciones climáticas entre ellas, se encontró mayor proporción de L3 en los escarabajos (*O. sellatus*) en la zona arbolada y de riego respecto a la zona más seca y sin cobertura herbácea y menos sombreada, concluyendo que el % de humedad de las heces las mantenía durante más tiempo en mejores condiciones de T^a, lo que favorecería la actividad del escarabajo y mejor evolución de las larvas (Gottlieb *et al.*, 2011). También se ha sugerido que, dado el período prepatente en el ciclo de vida del nematodo en el perro, la mayoría de los perros diagnosticados con espirocercosis durante el invierno han sido infectados al menos 3–6 meses antes, probablemente durante la estación cálida (Mazaki-Tovi *et al.*, 2002), pero teniendo en cuenta que un microambiente de desecación rápida podría reducir la probabilidad de ingerir L3 escarabajos infectados (Gottlieb *et al.*, 2011).

El efecto de diferentes factores químicos en el embrionamiento y la eclosión de los huevos de *S. lupi* también ha sido estudiado, ya que puede determinar la progresión en el desarrollo temprano de este parásito. Entre estos factores se encuentran el pH y la T^a. Rojas *et al.* (2017a) sugiere que el cambio de pH que sufre el huevo embrionado con L1 de *Spirocerca spp*, desde las heces del perro pH 7.2 ± 0.4 en comparación con del intestino del escarabajo *O. Sellatus* que es 6.0-6.2, puede inducir la eclosión en el escarabajo. El contenido del intestino medio de *O. Sellatus* es más ácido que los de otras especies de escarabajos. Distintas pruebas *in vitro* matizan que el pH no sería la única causa de la eclosión de los huevos larvados en el interior de los escarabajos coprófagos, sino que habría otros factores adicionales, como la T^a, la agitación intestinal o el paso por las mandíbulas del escarabajo, así como la presencia de tripsina (Rojas *et al.*, 2017a).

La incidencia de espirocercosis fue significativamente mayor entre los perros grandes de raza pura en comparación con razas más pequeñas. Esto se ha visto en Sudáfrica, donde en un estudio de 39 perros se observó que el 85% de los perros infectados eran de razas grandes (Dvir *et al.*, 2001). Muy probablemente, las razas de perros de gran tamaño son más propensas a ser infectadas por *S. lupi* porque pasan más tiempo al aire libre (Mazaki-Tovi, *et al.*, 2002).

Sin embargo, los datos epidemiológicos y las prevalencias deben interpretarse con referencia a la especie de HI, o con los datos del HD muestreado. En el caso de que el HD sean perros, se ha de tener en cuenta si son animales callejeros versus mascotas, la región del país de muestreo, zona urbana versus rural y el método de diagnóstico (necropsia versus flotación fecal, versus endoscopia o radiografía) tabla 11. En el caso de que el HD se trate de un cánido silvestre será mucho más determinante el hábitat en el que se desarrolle este tipo de cánido.

En relación con la epidemiología de *Spirocerca spp*, en hospedadores silvestres, se puede decir que es mucho más dependiente de la interacción con el medio ambiente y las condiciones climáticas y ambientales de una determinada zona y de los distintos hospedadores. Así, los hábitos alimenticios de cada especie, la disponibilidad de recursos alimentarios

en función de las épocas del año o la mayor o menor abundancia de los tipos de hospedadores en cada momento puede influir en la presión de infección. Algunos estudios de prevalencia en el zorro rojo se muestran en la tabla 13.

3.2.5.- Patogenia

La espirocercosis es la consecuencia de una serie de patologías únicas con las que se asocia esta parasitosis. La patogenia y las lesiones han sido estudiadas mayoritariamente en el perro doméstico atribuidas todas ellas a *S. lupi*, y varían en severidad dependiendo de la localización definitiva del parásito, migración aberrante de las larvas, localización en los distintos órganos, del tipo de nódulo, del grado de malignidad, etc. Las lesiones cuando acontecen en la localización preferente, como es a la altura del esófago, conllevan desde la regurgitación de alimento no digerido por bloqueo parcial del esófago por nódulos inflamatorios que contienen gusanos, hasta la disfagia esofágica, que es una manifestación común en perros infectados (Dvir *et al.*, 2001 ; Mazaki-Tovi *et al.*, 2002; Van der Merwe, *et al.*, 2008), o incluso a la progresión de los nódulos esofágicos a un sarcoma maligno descrito en el 25% de las ocasiones (Dvir *et al.*, 2008). Los nódulos esofágicos en perro han sido clasificados como neoplásicos o no neoplásicos. Los no neoplásicos a su vez son clasificados como: nódulos con inflamación temprana (caracterizada por fibrocitos y colágeno abundante) y nódulos en etapa pre-neoplásica, (caracterizada por fibroblastos activados y colágeno reducido) (Dvir *et al.*, 2010). El predominio de las células de la serie mieloide (precursores de células granulocíticas (eosinófilos, basófilos y neutrófilos), en bolsas alrededor de los tractos migratorios de los gusanos y en áreas necro-ulcerosas se ha destacado en nódulos de carácter neoplásico (Dvir *et al.*, 2010). Las células T presentes hasta en el 23% de las ocasiones, no han mostrado predilección por el tipo de nódulo indistintamente de su carácter neoplásico o no neoplásico. Tampoco se observó evidencia de una acumulación local de células FoxP3 (marcador de células reguladoras T) en ninguno de los dos tipos de nódulos (Dvir *et al.*, 2010, 2011). La reacción inflamatoria se describió como un infiltrado linfoplasmocítico con una tendencia hacia un patrón de distribución focal – multifuncional, localizados periféricamente dentro de los nódulos en la mayoría de los casos no neoplásicos. En los casos neoplásicos predominaron los neutrófilos (Dvir *et al.*, 2011). La superficie de L2 y L3 es rica en moléculas de carbohidratos y su composición varía entre las dos etapas larvarias, como lo demuestra la unión de varios tipos de lectina a las larvas (Aroch *et al.*, 2017).

Otras veces las lesiones son consecuencia de cicatrización aórtica con formación de aneurisma (Gal *et al.*, 2005; Kirberger *et al.*, 2013), espondilitis vertebral torácica (Mylonakis *et al.*, 2006 ; Dvir *et al.*, 2008) u otras localizaciones aberrantes como estómago, mediastino e intestino (Dvir *et al.*, 2001) diafragma (Harrus *et al.*, 1996), corazón (Garg *et al.*, 1989), pulmón (Stephens *et al.*, 1983; Singh *et al.*, 1999), riñón (Thanikachalam *et al.*, 1984; Singh *et al.*, 1999) y mucosa anal y recto (Borah *et al.*, 2015; Georgi *et al.*, 1980).

La investigación sustancial en la última década ha mejorado la comprensión de la genética y la patología asociado con *S. lupi* y ha ayudado a mejorar el diagnóstico y el tra-

tamiento de esta infección. Además, los estudios informando de la infección por *S. lupi* en especies de cánidos domésticos y salvajes han destacado el papel de reservorios potenciales de este parásito en la vida silvestre. Simultáneamente se han ido descifrando las relaciones filogenéticas de *Spirocerca spp.*, de diferentes regiones geográficas y hospedadores (Rojas *et al.*, 2018b), revelando la diversidad de especies y haplotipos dentro del género *Spirocerca* (Traversa *et al.*, 2007; De Waal *et al.*, 2012; Rothmann & De Waal, 2017; Rojas *et al.*, 2018a). Los análisis genéticos de 3 poblaciones distintas que distaban las unas de las otras más de 600 km en un estudio sobre *S. lupi* en Sudáfrica, mostraron que las poblaciones no son muy distintas, que los nematodos dentro de los perros son más similares entre sí que los parásitos aleatorios de cada población, y que el apareamiento de los nematodos es aleatorio dentro de los perros. La conclusión fue que el parásito se transportaba con frecuencia a grandes distancias (Greeff *et al.*, 2018).

Por otro lado, la patogenicidad y las lesiones producidas por *Spirocerca spp.*, y *S. vulpis* en los hospedadores silvestres y en los zorros solo ha podido ser estudiada tras la necropsia de este tipo de animales muertos fruto de un atropello o cazados por un control cinegético, con lo que en el momento del examen post-mortem hay lesiones difíciles de discernir por los daños primarios causados en el origen de esas muertes. Han sido descritos aneurismas en la aorta en el perro venadero argentino (*Speothos venaticus*) (Rinas *et al.*, 2009); nódulos pulmonares en el lobo de crin brasileño (*Chrysocyon brachyurus*) (Blume *et al.*, 2014); o por ejemplo lesiones a nivel esofágico similares a la del perro, pero sin nematodos y aneurismas aórticos en el chacal de lomo negro (*Canis mesomelas*) (Bumby *et al.*, 2017). En el zorro, las lesiones principalmente se han descrito a nivel gástrico por diversos autores (tabla 13). Todas estas descripciones en cánidos silvestres se han reportado con anterioridad al descubrimiento de la nueva subespecie *S. vulpis* en 2018 (Rojas *et al.*, 2018a). Con el reciente descubrimiento se plantean ahora varias hipótesis; que todas las descripciones en estos otros cánidos silvestres se corresponderían con *S. vulpis*, aunque se describiesen en su día como *S. lupi*; otra hipótesis sería el de la ubicación principal de las lesiones, que podría deberse a una afinidad diferente por otros órganos diana de la subespecie de *S. vulpis* respecto a *S. lupi*. También se plantea ahora la hipótesis referida al ciclo biológico, el cual no llegaría a terminarse con éxito, y la consecuencia sería una ubicación diferente de la localización definitiva del parásito, o una posible variación en el ciclo biológico descrito para el perro con *S. lupi*. Es decir, es posible que el ciclo de *S. vulpis* se vea simplificado y la fase de migración a través de la capa muscular de la aorta torácica no se produzca, sino que la migración sea directamente desde el estómago a la mucosa gástrica o al omento.

3.2.6.- Sintomatología y lesiones de *Spirocerca spp.*

S. lupi es un nematodo que se ha encontrado en muchas especies, pero afecta principalmente a los carnívoros, especialmente a la *Familia canidae* (Dvir *et al.*, 2001; Lobetti, 2000; Mazaki-Tovi *et al.*, 2002). Como ya se ha mencionado, la espirocercosis en el perro doméstico se ha observado principalmente en nódulos esofágicos, aunque tiene una variedad de presentaciones clínicas (Dvir *et al.*, 2001; Lobetti, 2000; Mazaki-Tovi *et al.*, 2002). En regiones

geográficas consideradas libres de espirocercosis, las neoplasias malignas del esófago son raras en perros y generalmente se clasifican como carcinomas. Por lo tanto, la espirocercosis se considera una causa importante de malignidad neoplásica esofágica en caninos domésticos (Meléndez & Suárez-Pellín, 2001; Dvir *et al.*, 2008). Los signos clínicos más habituales se asocian a las localizaciones del parásito, incluyendo regurgitación, vómitos y disfagia debido a los granulomas esofágicos (Van der Merwe., 2008). Cuando la localización no es el esófago, los signos clínicos se deben principalmente a la migración y persistencia de las larvas dentro del huésped y a las infecciones bacterianas. Los principales signos clínicos y lesiones de *S. lupi* según algunos autores se muestran en la tabla 14.

Los nódulos esofágicos tienden a tener macrófagos de manera dispersa, aunque sin ser predominantes, por lo que han sido denominados como granulomas de manera incorrecta en el pasado, pues la característica del granuloma es el predominio de los macrófagos (Dvir *et al.*, 2008, 2011). El análisis histológico muestra estos nódulos como sarcomas esofágicos. Los sarcomas malignos en la espirocercosis muestran abundantes células fusiformes y un alto índice mitótico y puede distinguirse claramente de los nódulos no neoplásicos.

Tabla 14.- Porcentaje de signos clínicos y lesiones encontrados en infecciones de *Spirocerca lupi*.

Alteraciones clínicas y patológicas	Prevalencia (%) de presentación lesiones y signos clínicos	Autor
Vómitos	60-66	Lobetti <i>et al.</i> , 2000 Mazaki-Tovi <i>et al.</i> , 2002
Caquexia	27	Lobetti <i>et al.</i> , 2000
Melena	18	Mazaki-Tovi <i>et al.</i> , 2002
Pirexia	24	Mazaki-Tovi <i>et al.</i> , 2002
Debilidad	22	Mazaki-Tovi <i>et al.</i> , 2002
Anormalidades Respiratorias	21-22	Lobetti <i>et al.</i> , 2000 Mazaki-Tovi <i>et al.</i> , 2002
Anorexia	18	Mazaki-Tovi <i>et al.</i> , 2002
Osteopatía hipertrófica	38	Lobetti <i>et al.</i> , 2000
Hemotórax agudo	30	Lobetti <i>et al.</i> , 2000
Aneurisma aórtico	43	Mazaki-Tovi <i>et al.</i> , 2002
Anemia	53	Mazaki-Tovi <i>et al.</i> , 2002
Aumento de la CPK	54	Mazaki-Tovi <i>et al.</i> , 2002
Espondilosis torácica	33	Mazaki-Tovi <i>et al.</i> , 2002
Masa radiográfica	53	Mazaki-Tovi <i>et al.</i> , 2002
Neoplasia esofágica	41	Lobetti <i>et al.</i> , 2000
Complicaciones respiratorias	77	Dvir <i>et al.</i> , 2001
Complicaciones locomotoras	23	Dvir <i>et al.</i> , 2001

Se han descrito cuatro tipos de sarcomas malignos en la espirocercosis (Ranen *et al.*, 2004; Dvir *et al.*, 2010; Wijekoon *et al.*, 2018):

- Osteosarcoma, los cuales presentan focos de osteoblastos poligonales, números variables de osteoclastos multinucleados y presencia de matriz osteoide, con o sin focos de diferenciación condroide (Dvir *et al.*, 2010)
- Fibrosarcoma, caracterizados por colágeno matriz intercelular, haces de células pleomórficas que varían en su apariencia de matriz, y un alto índice mitótico (Seibold *et al.*, 1955)
- Sarcoma indiferenciado, caracterizado por la presencia de células fusiformes malignas sin la presencia de abundante matriz intercelular (Dvir *et al.*, 2010)
- Condrosarcoma, los cuales contienen condroblastos atípicos proliferativos dentro de una matriz cartilaginosa (Wijekoon *et al.*, 2018).

Cuando el HD no es el perro doméstico, y la parasitación se ha encontrado en zorro rojo, la mayoría de las lesiones de espirocercosis se han notificado localizadas exclusivamente en nódulos gástricos (ver tabla 13), localizadas en su mayoría en la pared gástrica y algunas a nivel del omento (Al-Sabi *et al.*, 2014; Sanchis-Monsonis, 2015). Se ha informado de lesiones en la aorta torácica en un solo zorro gris (*Urocyon cinereoargenteus*) en América del Norte (Pence & Stone, 1978). En el lobo de crin (*Chrysocyon brachyurus*) la localización parasitaria ha sido en forma de nódulos encapsulados en pulmón (Blume *et al.*, 2014). En el chacal de lomo negro (*Canis mesomelas*) se ha encontrado de manera muy puntual nódulos a nivel esofágico (en 1 de 93 chacales analizados) (Bumby *et al.*, 2017).

3.2.7.- Diagnóstico de *Spirocerca lupi*.

El diagnóstico mediante coprología representa un método sencillo, que bien gestionado podría ser útil en algunas ocasiones, como ocurre en medios rurales con menos medios técnicos o en determinados hospedadores, donde monitorear estos procesos con otros métodos resulta de una enorme complejidad. La identificación de los huevos de *S. lupi* en las heces permite un diagnóstico definitivo de espirocercosis, pero es poco confiable para proporcionar un diagnóstico definitivo en caso de resultar negativo (Euzéby, 1961; Evans, 1983; Fox *et al.*, 1988), ya que carece de baja sensibilidad (por debajo del 3% en ocasiones) y debe combinarse con otros métodos complementarios. Los huevos de *S. lupi* no se recuperan fácilmente de muestras fecales, y se han implementado varios métodos microscópicos con niveles variables de recuperación que varían de 6.4% (Dvir *et al.*, 2001) a 70.3% (Perera *et al.*, 2013). No obstante, los métodos copromicroscópicos a veces son útiles como métodos no invasivos para la detección y el seguimiento de infecciones por *S. lupi*, especialmente en los hospedadores de vida silvestre (Szczena & Popiolek, 2007). El tamaño relativamente pequeño y la alta densidad de los huevos limitan la utilidad de tales métodos (Chhabra & Singh, 1972; Markovics & Medinski, 1996). Es necesario realizar un diagnóstico diferencial con huevos de otros parásitos que afectan a los cánidos con los que pudieran llegar a confundirse como por ejemplo *Physoleptera* spp. Por lo tanto, el diagnóstico por microscopía para ganar en efectividad debería

ser realizado sobre heces de varios días y por técnicos bien experimentados (Fox *et al.*, 1988; Markovics & Medinski, 1996; Dvir *et al.*, 2001; Mazaki-Tovi *et al.*, 2002).

Los resultados del análisis fecal pueden verse afectados por varios factores. En primer lugar, el paso de los huevos a las heces ocurre durante un período impredecible y relativamente corto de la vida de las hembras adultas (Fox *et al.*, 1988), por lo que si el HD solo se encuentra parasitado por nematodos machos o en un periodo de no ovoposición no habrá huevos en las heces (Rojas *et al.*, 2017b). Y en segundo lugar, los huevos se encontrarán solo en las heces cuando el adulto hembra se encuentra en un nódulo con comunicación directa hacia el tracto gastrointestinal y esto no sucede ni en las primeras etapas de la infección, cuando los nematodos aún no son adultos (L4), ni en casos de migración aberrante de gusanos sin comunicación directa con el tracto gastrointestinal ni en los casos donde el nódulo esofágico evoluciona hacia sarcoma neoplásico, ya que los nematodos están ausentes (Traversa *et al.*, 2008).

Los huevos son relativamente pesados pese a su tamaño y requieren técnicas especiales y soluciones, como la solución de nitrato de sodio (gravedad específica 1.36), solución de sulfato de zinc al 33% y solución sobresaturada de azúcar (Markovics & Medinski, 1996). La técnica para el análisis coprológico ideada por Markovics & Medinski (1996) es una flotación que se ha denominado como la técnica MM. La técnica MM estimó un % de diagnóstico superior al 60% en un muestreo superior a 200 heces recogidas en parques públicos.

Otros autores, como Lobetti *et al.* (2000), encontraron una sensibilidad diagnóstica por examen coprológico del 14%, mientras que Mazaki-Tovi *et al.* (2002) alcanzó el 80. Para Aroch *et al.* (2015a), la sensibilidad encontrada mediante examen fecal fue del 55%. Traversa *et al.* (2008) también evaluó los métodos coprológicos como herramienta diagnóstica, encontrando una baja sensibilidad y alta variabilidad, lo que demuestra la falta de fiabilidad de los métodos convencionales para detectar huevos de *S. lupi*. Este autor mejora las expectativas diagnósticas de los métodos convencionales mediante la técnica copromicroscópica del FLOTAC, obteniendo un mayor número de positivos y un número significativamente mayor de huevos de *S. lupi* por campo microscópico en comparación con los otros métodos copromicroscópicos habituales. Pese a todo el técnico FLOTAC solo fue efectiva en el diagnóstico en el 32% de los casos.

Christie *et al.* (2011) también ensayaron distintas técnicas coprológicas usando distintos medios de flotación, alcanzando una sensibilidad que varió entre el 42% y el 67%. La solución de NaNO_3 mostró la sensibilidad más alta de todas las soluciones. Estos mismos autores aumentan la sensibilidad de la técnica añadiendo a la flotación simple con NaNO_3 una centrifugación. El método fecal de flotación centrífuga modificada utilizando esta solución tiene el recuento de huevos más alto que cualquiera de las otras 4 combinaciones. El estudio también encontró que los perros con nódulos neoplásicos emiten significativamente menos huevos que los perros con nódulos no neoplásicos.

Se ha utilizado también en el diagnóstico en heces un protocolo de PCR semianidado específico para una región interna al gen de la subunidad 1 del citocromo c oxidasa mitocon-

drial de *S. lupi*. Con 0,5 g de material fecal se extrajo el ADN genómico de *S. lupi*, incrementando hasta en un 45 % la sensibilidad diagnóstica de los falsos negativos obtenidos por las técnicas tradicionales de coprología mediante flotación modificada con solución de azúcar y hasta en un 38,2 % la sensibilidad diagnóstica de los falsos negativos de la técnica FLOTAC (Traversa *et al.*, 2008). Otros tres ensayos de PCR cuantitativa de fusión de alta resolución (HRM qPCR) dirigidos a fragmentos de los loci ITS1; loci 18S; loci *cytb* de *S. lupi* han sido evaluados como método diagnóstico. Estos tres métodos de PCR cuantitativa se sometieron a un desafío frente al método de PCR semianidado de la subunidad 1 del citocromo oxidasa y frente al diagnóstico por flotación fecal, obteniendo como resultado que la de HRM qPCR para ITS1 y 18S pudieron detectar una concentración mínima de 0.2 huevos de *S. lupi* por gramo heces (hpg), mientras que la qPCR de HRM para el *cytb* y la PCR semianidada para la *cox1* detectaron 6 hpg y 526 hpg, respectivamente. Estos métodos diagnósticos mediante HRM qPCR también han sido útiles para identificar *S. lupi* en líquido cefalorraquídeo (LCR) extraído por punción de perros sospechosos de migración aberrante a médula espinal (Chai *et al.*, 2018).

El diagnóstico temprano de espirocercosis resulta aún hoy un desafío, especialmente en las primeras etapas de la enfermedad, cuando los gusanos adultos y signos clínicos están ausentes. Por lo tanto, se necesitan enfoques alternativos para promover el diagnóstico precoz. Mediante el uso de métodos moleculares basados en ADNr 16S, se ha encontrado ADN en huevos, larvas y estadios adultos de *S. lupi* de un nuevo simbiote bacteriano que está estrechamente relacionado con las especies *Comamonas*. La PCR específica permitió la detección de ADN de esta especie simbiote en sangre obtenida de perros diagnosticados con espirocercosis, lo cual invita a abrir enfoques innovadores para el diagnóstico y control de espirocercosis en perros (Gottlieb *et al.*, 2012).

La presencia de *S. lupi* ha sido asociada por algunos autores al estilo de vida de los perros (Mylonakis *et al.*, 2001; Mylonakis *et al.*, 2006; Chikweto *et al.*, 2012). Otros autores han destacado que los animales jóvenes arrojan con mayor frecuencia huevos de nematodos en las heces que los animales adultos (Oliveira-Sequeira *et al.*, 2002).

En hospedadores silvestres, como el zorro, se vio que el examen parasitológico por tres métodos copromicroscópicos (sedimentación, flotación con solución saturada de azúcar y sal, y posterior tamizado) no detectó huevos de *Spirocerca* spp., en las heces recogidas del colon de un zorro con nódulos conteniendo adultos de *Spirocerca* spp., en la pared gástrica (Al-Sabi *et al.*, 2014). A estos datos hay que añadir, en cambio, que en la fauna silvestre la espirocercosis es complicada de monitorear por otros métodos distintos de los coprológicos y prácticamente la alternativa consiste en realizar necropsias. No obstante, también se ha de considerar que monitorear una especie silvestre en su conjunto no es lo mismo que el diagnóstico certero de una patología concreta de un perro que acude a una consulta veterinaria. En el caso de los cánidos silvestres, la coprología parasitaria puede proporcionar una información bastante fidedigna sobre el tipo de helmintofauna que realmente soporta una determinada población hospedadora, las prevalencias observadas por coprología son casi siempre estadísticamente inferiores a las reales (obtenidas por necropsia) (Torres *et al.*, 2001).

Para el diagnóstico de las infecciones causadas por *S. lupi* en perros en zonas endémicas deben utilizarse métodos diagnósticos complementarios basados en imágenes (radiografía, tomografía computarizada y endoscopia).

La sensibilidad de la radiografía como método diagnóstico en los casos de espirocercosis en perros causada por *S. lupi* se ha establecido sobre el 86% cuando se analizan radiografías Dorso ventrales (DV) y ventro dorsales (VD), mientras que en las vistas con radiografías laterales (lateral izquierdo reclinado (LLR) y radiografías torácicas reclinadas laterales derechas (RLR)), solo se identificó el 50% de las masas. Se recomiendan, por tanto, vistas de DV y RLR, ya que también permiten una mejor visualización de aneurismas en la aorta descendente y para evitar interpretar el esófago normalmente visible en LLR en perros grandes como una masa (Kirberger *et al.*, 2009). La sensibilidad del estudio radiográfico se ve disminuida en los perros que contienen los nódulos esofágicos pequeños localizados en puntos de localización atípica (Dvir *et al.*, 2001). Por último, muchos de los animales han de ser sometidos a tranquilización o sedación, lo que añade un punto más de complejidad.

La tomografía computarizada (T.C) también se ha mostrado recientemente como un método valioso en el diagnóstico de lesiones pequeñas o para la planificación del tratamiento (Dvir *et al.*, 2001).

La endoscopia esofágica se destaca como el método diagnóstico que tiene una mayor sensibilidad diagnóstica, superando a la radiografía, variando entre el 87.1% (Aroch *et al.*, 2015a) al 100% (Mazaki-Tovi *et al.*, 2002). Las tomas de las biopsias endoscópicas en una sola ocasión no son sensibles para la detección de la transformación neoplásica y serían necesarias múltiples biopsias espaciadas en el tiempo. (Dvir *et al.*, 2001; Van der Merwe *et al.*, 2008). La endoscopia se ha utilizado a menudo en estudios para determinar la eficacia de los procedimientos terapéuticos en el tratamiento de la espirocercosis progresiva (Berry, 2000; Lavy *et al.*, 2003; Kelly *et al.*, 2008; Le Sueur *et al.*, 2010; Lobetti, 2012; Austin *et al.*, 2013). No obstante, existen algunas desventajas como su moderado-alto coste, requieren personal muy especializado y la necesidad de una sedación en el perro, pero es sin duda la mejor herramienta diagnóstica a nivel individual.

El diagnóstico basado en el análisis de los parámetros sanguíneos no es muy eficaz, ya que no se ha visto correlación entre las células y el recuento de la serie blanca con la existencia de *Spirocerca* que difiera de cualquier otro proceso inflamatorio asociado (Mazaki-Tovi *et al.*, 2002). No hay cambios bioquímicos típicos reportados en perros con enfermedad temprana que no sea una creatina quinasa ligeramente elevada en el 54% de los perros (Mazaki-Tovi *et al.*, 2002). Otros autores no reportaron diferencias químicas o diferencias hematológicas en sangre de perros de Kenia con espirocercosis y sin ella (Ranen *et al.*, 2004; Brodey *et al.*, 1977).

En cuanto al diagnóstico serológico se ha observado que los sueros obtenidos de perros infectados con *S. lupi* pueden reaccionar de forma cruzada con test comerciales y ensayos serológicos que detectan antígenos circulantes de *Dirofilaria immitis*, por lo que el diagnóstico diferencial con otras enfermedades se vería interferido (Aroch *et al.*, 2015b).

3.3.- *Gongylonema* spp.

3.3.1 Etiología.

El gusano del esófago, *Gongylonema pulchrum* (Molin, 1857), se distribuye ampliamente en el mundo. Toma un amplio espectro de mamíferos como HD, tales como bovinos, cebúes, búfalos, ovejas, cabras, venados, camellos, cerdos, jabalíes, caballos, burros, osos, roedores, monos y seres humanos (Sato, 2009; Mowlavi *et al.*, 2009; Kinsella *et al.*, 2016; Cordeiro *et al.*, 2018). La posibilidad de infección humana existe, incluso en ausencia de factores de riesgo obvios para la adquisición de parásitos (Halajian *et al.*, 2010).

Aproximadamente 50 especies de insectos actúan como huéspedes intermediarios, los escarabajos peloteros y cucarachas desempeñan uno de los papeles principales como hospedadores intermedios (Lichtenfels, 1971; Kirkpatrick *et al.*, 1986; Anderson, 2000; Haruki *et al.*, 2005; Sato, 2009; Mowlavi *et al.*, 2009; Mukaratirwa *et al.*, 2010; Setsuda *et al.*, 2016; Kinsella *et al.*, 2016). Pero no debemos de olvidar que, sin embargo, la escasez de observaciones disponibles impide estimar la red de relaciones entre estos parásitos y escarabajos peloteros para determinar con mayor amplitud los posibles hospedadores intermediarios de cada una de las especies parasitarias (Nichols *et al.*, 2017).

La infección por *Gongylonema* spp, en humanos no debe caer en el olvido, siendo reportada en varios países, y es causada principalmente por el consumo de agua contaminada, alimentos crudos o la ingestión accidental del HI (Xiaodan *et al.*, 2018). Además, el cambio climático, el aumento de la población mundial, sumado a la globalización cultural, suponen un incremento en la demanda de alimentos, lo que podría derivar en un incremento en el consumo de artrópodos en el futuro, consumo que actualmente se estima que produce para un tercio de la población mundial (Van Huis *et al.*, 2013).

Gongylonema pulchrum es la especie que se cree que es responsable de la mayoría de las infecciones humanas (Molavi *et al.*, 2006).

Tabla 15.- Clasificación Taxonómica del género *Gongylonema*.

Reino	Animalia
Filo	Nematoda
Clase	Secernentea
Orden	Spirurida
Superfamilia	Spiruroidea
Familia	Gongylonematidae
Género	<i>Gongylonema</i>

Se reconocen alrededor de 48 especies como pertenecientes a este género, 10 de las cuales parasitan aves y 38 mamíferos (incluidos los humanos) (Kinsella *et al.*, 2016). El géne-

ro ha promovido discrepancias y confusiones a lo largo de los años en cuanto a la clasificación debido a la variabilidad existente entre las diferentes especies a nivel larvario y también a una gran variabilidad morfológica intraespecífica a nivel de adulto (Quentin & Seureau, 1978) (tabla 15). Los miembros del género *Gongylonema* se reconocen porque su cutícula está cubierta por grandes engrosamientos verruciformes, especialmente prominentes en la parte anterior del cuerpo (Quentin & Seureau, 1978). A continuación, describimos las principales especies de *Gongylonema* que son conocidas:

Una de las especies tipo del género fue considerada como *Gongylonema minima* (Molin 1857), especie sinónima de *Gongylonema musculi* (Rudolphi, 1819). Las descripciones que hacen referencia a la morfología de *G. minima* han sido más bien escasas. En la revisión realizada por Skrjabin *et al.* (1971) la descripción que se hizo de la especie tipo carecía de las medidas morfológicas más significativas. En cambio, en el mismo trabajo, *G. brevispiculum* se describe con mucho mayor detalle. De esta forma, las dos únicas características que permiten comparar *G. minima* y *G. brevispiculum* son, por un lado, el número de papilas presentes en los machos (14 preanales y 4 postanales en *G. minima*, y de 4 a 6 pares de papilas preanales y 4 postanales en *G. brevispiculum*), y por el otro, las dimensiones de los huevos en las hembras (0,045 × 0,022-0,023 mm) en *G. minima*, y (0,042 × 0,025 mm) en *G. brevispiculum*. Por lo tanto, se ha sugerido la sinonimia de *G. brevispiculum* con *G. musculi* como una única especie que parasita *Mus musculus* (ratón común) (Desportes *et al.*, 1949; Bernard, 1963). Sin embargo, debido a las variaciones de los caracteres fenotípicos crípticos, la identificación morfológica es difícil y es posible que se haya subestimado el número real de especies (Set-suda *et al.*, 2018). La problemática del género *Gongylonema* está aún por resolver. Así en la mucosa gástrica de ejemplares de *Rattus rattus* y *Rattus norvegicus* de las Islas Canarias se encontraron nematodos que inicialmente se asociaron morfológicamente a *Gongylonema brevispiculum* (Bernard, 1963; Skrjabin *et al.*, 1971), pero que podrían ser de *G. neoplasticum* como así se ha quedado atribuido para estos hallazgos descritos en las Islas Canarias (Sánchez Vicente, 2013).

G. neoplasticum es la única especie de *Gongylonema* que ha sido hallada parasitando a micromamíferos, como así se ha documentado en el ratón común en Granada por González-Castro (1944) y también en rata gris por López-Neyra (1947). Pero no está completamente aclarado si esa descripción se correspondería a *G. neoplasticum* o al binomio *G. brevispiculum* / *G. musculi* descrito para el ratón común por otros autores Milazzo *et al.* (2003), quienes citan *G. musculi* encontrado como hospedador a ratón común en Sicilia. Las citas en España, como venimos diciendo, son confusas. Feliu *et al.* (1983) hallaron dos ejemplares de *Gongylonema* en el ratón procedentes del Delta del Ebro, que tan solo pudieron ser identificadas como *Gongylonema* spp., debido al mal estado que presentaban, sospechando de *G. musculi* como causante de la parasitación.

Otra de las especies tipo es *Gongylonema pulchrum*, asociado comúnmente en rumiantes, pero también en mamíferos de todo el mundo, incluido el ser humano. Se localiza en la mucosa y submucosa del esófago de rumiantes, y en ocasiones del rumen (Reina *et al.*, 1991), aunque también ha sido descrita en roedores (Tung *et al.*, 2009), osos (Crum *et al.*,

1978), primates no humanos (Ryan *et al.*, 2012) y cerdos (Zinter *et al.*, 1970). En España, se ha descrito en ciervos (*Cervus elaphus*) en Castilla la Mancha (García-Romero *et al.*, 2000), en Los Yébenes, (Toledo) (San Miguel *et al.*, 2001) y en Extremadura (Habela *et al.*, 2006). También ha sido descrita la presencia de *G. pulchrum* en España en jabalí (Höfle *et al.*, 2004). Hay varios informes de infecciones humanas por *G. pulchrum* en varias áreas del mundo, incluyendo Francia (Pesson *et al.*, 2013; Battistelli, 2013) y otros países de Europa, Asia y los Estados Unidos, causando afecciones en el fondo de la cavidad bucal y esófago (Jelinek & Loscher., 1994; Eberhard & Busillo, 1999; Wilson *et al.*, 2001; Urch *et al.*, 2005; Molavi *et al.*, 2006; Allen & Esquela-Kerscher, 2013; Huang *et al.*, 2016; Xiaodan *et al.*, 2018). Los signos clínicos en los humanos incluyen irritación local de la mucosa oral, así como expectoración de sangre ocasional, heces alquitranadas, entumecimiento de la lengua, dolor en el pecho y el abdomen, vómitos, distensión abdominal, faringitis y estomatitis (Cappucci *et al.*, 1982). El diagnóstico diferencial se ha de realizar frente a candidiasis oral y los posibles problemas psicóticos deben ser tenidos en cuenta (Molavi *et al.*, 2006; Ayala *et al.*, 2012). El estudio del genoma mitocondrial (gmt) completo de *G. pulchrum* mediante PCR, ha dado como resultado las primeras secuencias del gmt para la familia Gongylnematidae, lo que en la última década está dando la oportunidad de desarrollar nuevos marcadores genéticos para estudios de epidemiología, genética poblacional y sistemática de este nematodo de importancia para la salud humana y animal (Liu *et al.*, 2015). Un estudio en Japón para dilucidar la dinámica de transmisión de *G. pulchrum* sobre los análisis del gen del ARN ribosómico (ADNr), 18S al 28S, principalmente las regiones de los espaciadores transcritos internos (ITS) 1 y 2, y una región de la subunidad I (COI) de la citocromo c oxidasa del ADN mitocondrial de *G. pulchrum* utilizando parásitos tanto de huéspedes de vida silvestre (ciervos y jabalíes, macacos) como de mamíferos domésticos y animales de zoológico, demuestran que los genotipos de ADNr, así como los haplotipos de ADNmt de COI de *G. pulchrum* prevalentes en animales salvajes y mamíferos domésticos se dividen en dos grupos de haplotipos, es decir, los de la mayoría de animales silvestres y los de ganado y animales de zoológico, se diferenciaron claramente. Este hallazgo indica que *G. pulchrum* tiene múltiples orígenes y su ciclo de transmisión es diferente entre animales salvajes y domésticos. Estos hallazgos indican que en Japón están presentes los dos ciclos de transmisión de *G. pulchrum*, tanto el doméstico como el selvático (Makouloutou *et al.*, 2013).

Gongylnema neoplasticum (Fibiger et Ditlevsen, 1914) (Gongylnematidae) se encuentra principalmente en los roedores, los cuales actuarían como reservorios para la transmisión al hombre y, por lo tanto, con un carácter marcadamente zoonótico (Parshad, 1999; Stojcevic *et al.*, 2004; Abad *et al.*, 2016). La distribución de *G. neoplasticum* está muy ligada a la de sus dos hospedadores habituales, rata común (*Rattus rattus*) y rata parda (*Rattus norvegicus*). La especie ha sido citada en Argelia (Seurat, 1916), Túnez (Bernard, 1963), Brasil (Chieffi *et al.*, 1980), Taiwán (Hasegawa *et al.*, 1994), Vietnam (Pham *et al.*, 2001) y Malasia (Zain *et al.*, 2012). En España, los trabajos sobre la rata parda, cuyo hábitat está siempre muy ligado al ser humano, la describen como portadora de *G. neoplasticum* (Galán-Puchades *et al.*, 2018). *G. neoplasticum* ha sido descrito en España también en ratón moruno (*Mus spretus*) (Lataste, 1883) en un estudio en el Parque Nacional de Doñana (Torres *et al.*, 2003).

Este nematodo también ha sido descrito para el conejo *Oryctolagus cuniculus* (Lagomorpha, Leporidae) en Portugal (Eira *et al.*, 2006a) y en España (Gálvez-Bravo, 2017).

En otro estudio para tratar de analizar las diversidades genéticas de tres especies de *Gongylonema* (*G. pulchrum*, de ganado vacuno y caprino en Mongolia y China; *G. aegypti*, en ratones de Egipto; *G. neoplasticum*, en rata negra de Japón) y su posible variación genética interespecífica basada en estudios de las secuencias de nucleótidos del gen del ARN ribosómico (ADNr) y la región de la subunidad I (COI) de la citocromo c oxidasa del ADN mitocondrial de múltiples aislados de diferentes orígenes, permitió resolver la posición taxonómica de *Gongylonema* spp., que mostraban pocas o nulas diferencias morfológicas (Setsuda *et al.*, 2016).

Gongylonema nepalenses toma varias especies de rumiantes como HD y tiene una cierta distribución geográfica en Europa (Varcasia *et al.*, 2017).

Gongylonema ingluvicola afecta a ciertas aves (Permin *et al.*, 2002; Mukaratirwa *et al.*, 2010), pero hasta el momento su presencia no ha sido confirmada en la PI.

3.3.2.- Especies de *Gongylonema* descritas en España

En España se han reportado siete especies del género *Gongylonema* (Cordero del campillo *et al.*, 1994; Fernández de Mera *et al.*, 2003; Cordeiro *et al.*, 2018). Además de las especies descritas anteriormente (*G. pulchrum* y *G. neoplasticum*) y la más que probable presencia de *G. musculi*, hay que añadir la descripción de *Gongylonema pacoi* (*Progongylonema*) un subgénero de *Gongylonema* (Hernández-Rodríguez & Gutiérrez-Palomino, 1992). Para el género *Gongylonema* se habían propuesto ya dos subgéneros: *Gongylonema* y *Gongylonemoides* (Skrjabin, 1971; Chabaud, 1975), caracterizados por la usencia de papilas cuticulares.

El subgénero *Gongylonema* (Molin, 1857), presenta numerosas protuberancias cuticulares, muy desiguales, con un gubernaculum. Son parásitos de los mamíferos y pájaros.

El subgénero *Gongylonemoides* (Cuaresma y Freitas, 1937) presenta parches cuticulares raros, espículas sublinguales, con ausencia de gubernaculum. Son parásitos de marsupiales.

La especie *Gongylonema pacoi* (*Progongylonema*) se caracteriza por la ausencia de protuberancias cuticulares, pero con presencia de papilas y alas laterales. Los machos tienen espículas muy desiguales, gubernaculum presente y cloaca prominente con un borde festoneado. *G. pacoi* fue descrito por primera vez en 1992 parasitando la mucosa debajo de la lengua de córvidos (Orden Paseriformes: Familia Corvidae) del norte de la provincia de Córdoba (Hernández-Rodríguez & Gutiérrez-Palomino, 1992).

La quinta especie de *Gongylonema* que se ha detectado en aves en España se ha encontrado en Madrid, en varios ejemplares de autillo europeo (*Otus scops*) (Esperón *et al.*, 2013). El proceso cursaba con una enfermedad oro faríngea necrótica basada en lesiones macroscópicas. Se identificaron vermes, mediante citología, que presentaban rasgos morfo-

lógicos similares a larvas de tercer estadio de un nematodo Spiruridae, sin poderse concretar la especie de *Gongylonema*, aunque mostrando mayor afinidad por *G. pulchrum* (97,8%). El estudio sirvió para considerar las larvas dentro del género *Gongylonema*. Dado que no se encontró evidencia de la presencia de parásitos adultos, los autores sugieren que estos búhos se consideren huéspedes accidentales de *Gongylonema* spp. Recientemente se ha descubierto que son las cucarachas los hospedadores intermediarios de esta especie de *Gongylonema*, que, como hemos mencionado, afecta exclusivamente a autillos de la comunidad de Madrid (Lopes *et al.*, 2022).

Gongylonema soricis (Fain, 1955) se ha visto parasitando musarañas de Zaire, Togo, Ruanda y Burundi (Mas-Coma, 1977). Su larva infecciosa se ha obtenido experimentalmente de *Periplaneta orientalis* como HI. Se caracteriza por su tamaño, de 1545 µm-1580 µm, y su ornamentación caudal, en la que se visualiza un mechón de digitaciones cuticulares (Quentin & Gunn, 1981). *G. soricis* solo se ha descrito ocasionalmente en España en la comunidad Valenciana en 1996, parasitando la musaraña gris (*Crocidura russula*) (Portoles *et al.*, 1996). Teniendo en cuenta que la musaraña gris está ampliamente distribuida por la PI, es de esperar que estas descripciones no sean más numerosas por la falta de estudios en esta dirección.

Siguiendo con las especies de *Gongylonema* descritas en España, *Gongylonema pithyusensis* (Gongylonematidae) fue descrita por primera vez en 1977 parasitando la mucosa del esófago del lirón (*Eliomys quercinus*) (Mas-Coma., 1977) en las Islas Baleares. El macho de *G. pithyusensis* se caracterizó por el tamaño de sus espículas y un gubernaculum; la hembra por la morfología de la cola, la situación posterior de la vulva y las dimensiones de los huevos. Una nueva detección de *G. pithyusensis* fue realizada en Murcia (Esteban *et al.*, 2004).

La última de las especies de *Gongylonema* entre las descritas en España es *Gongylonema mucronatum*, que ha sido descrita parasitando el erizo del norte de África (*Atelerix algirus*) y también en la sierra Calderona de la Comunidad Valenciana (Ferrer *et al.*, 2000). La distribución de este erizo se limita al este de la PI.

3.3.3.- Ciclo de vida de *Gongylonema* spp.

El ciclo vital del género *Gongylonema* es indirecto, con coleópteros coprófagos como HI (Anderson, 2000) (figura 3). Los adultos ponen huevos embrionados y de cubierta gruesa que se excretan con las heces y eclosionan una vez son ingeridos por hospedadores intermediarios. Dentro del hemocelo de los artrópodos se desarrolla a larvas infectivas en aproximadamente 4 semanas (L3). El ganado, o el HD (pequeños micromamíferos o humanos), ingiere los coleópteros al pastar, o accidentalmente con su forraje u otro tipo de alimentos (Kudo *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 2007). Las larvas se liberan en el cuajar, desde donde emigran a lo largo de la pared del estómago hacia la submucosa del esófago superior y la cavidad oral, donde se fijan y completan el desarrollo a adultos. Las hembras adultas depositan sus huevos en estos lugares y, a medida que el epitelio se descama, los huevos viajan a través del sistema digestivo y se excretan con las heces. Los seres humanos también se infectan por ingestión accidental del insecto huésped o por beber agua contaminada (Wilson *et al.*, 2001).

Gongylonema spp., apenas causa daños al ganado, caballos o mascotas, salvo una ligera inflamación de la mucosa del esófago o del rumen. Pero los órganos que podrían utilizarse en charcutería resultan decomisados en matadero. Es muy raro que las infecciones de *Gongylonema* produzcan síntomas clínicos. El diagnóstico suele ser casual tras necropsia.

Como ya se ha comentado, los coleópteros coprófagos son los hospedadores intermediarios, aunque se ha descrito un caso humano en EE. UU sin que se tenga constancia de factores de riesgo obvios para la adquisición de este parásito. El paciente no había viajado fuera del país durante muchos años y no había consumido a sabiendas o intencionalmente ningún insecto. El paciente había consumido agua de un pozo rural en los meses anteriores a la detección. Pese a todo, se sospechó que la posible fuente de infección se debió a alimentos contaminados con restos de algún insecto (Wilson *et al.*, 2001; Allen & Esquela-Kerscher, 2013).

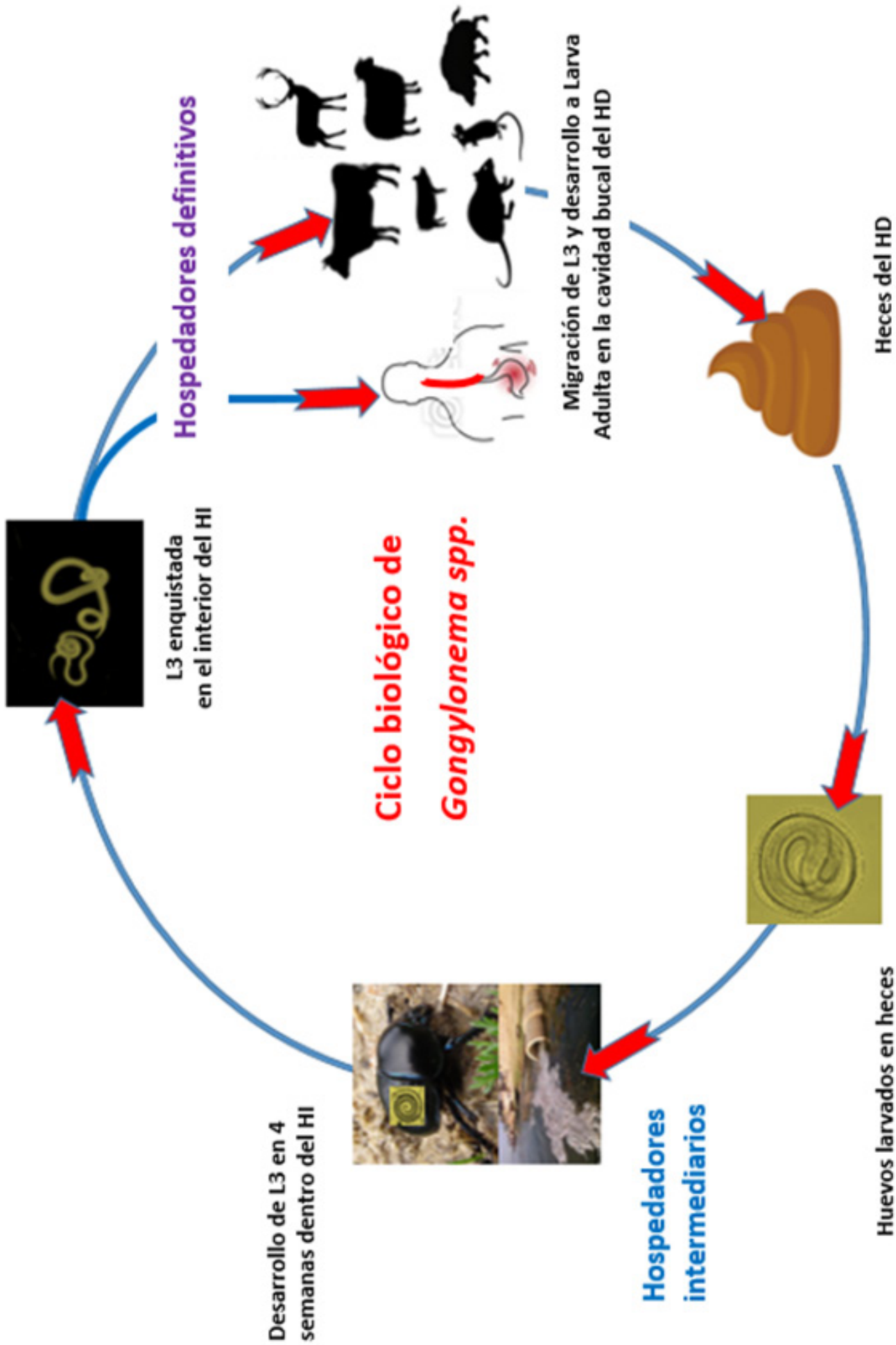


Figura 3.- Ciclo de vida de *Gongylonema* spp.

3.3.4.- Hospedadores intermediarios de *Gongylonema* spp.

Sobre la base de la aparente baja especificidad del huésped de *G. pulchrum*, es razonable especular que el ciclo de transmisión de *G. pulchrum* puede ser compartido por mamíferos domésticos y salvajes a través de la ingestión accidental de escarabajos peloteros infectados que sirven como HI. Otros datos han postulado, en cambio, que *G. pulchrum* tiene múltiples orígenes y su ciclo de transmisión es diferente entre animales salvajes y domésticos. Esto es apoyado por datos en Japón donde parecen circular los dos ciclos de transmisión de *G. pulchrum*, tanto el doméstico como el silvestre (Makouloutou *et al.*, 2013), por lo que cabe plantearse la posibilidad de que pudiera deberse a distintos HI involucrados.

Algunos de los HI descritos para *Gongylonema* spp., son escarabajos de géneros conocidos. Así, han sido señalados como hospedadores intermediarios: *Amphimallon*, *Aphodius*, *Blaps*, *Chironitis*, *Copris*, *Dermestes*, *Geotrupes*, *Gymnopleurus*, *Onoticella*, *Onitis*, *Onthophagus*, *Pentodon*, *Scarabeus* y *Sisyphus* (Anderson, 2000). Otros autores también han descrito algunas especies de escarabajos como hospedadores intermediarios, tales como *Copris minutus* y *Phanaeus vindex*, y la cucaracha *Blatella germanica* (Soulsby, 1965). Por su parte, en pastizales de ganado al noroeste de Irán, se ha visto que el escarabajo peloteros *Copris lunaris* fue el único naturalmente infectado con los estadios larvales de *Gongylonema* spp., (Mowlavi *et al.*, 2009). La especie de escarabajo *Gymnopleurus humanus* ha sido descrita en estudios experimentales como HI de *G. ingluvicola* (Mukaratirwa *et al.*, 2010). En la isla de El Hierro, como hospedadores intermediarios de *G. neoplasticum*, se han descrito dos especies de escarabajos tenebriónidos endémicas de esta isla como son *Pimelia laevigata costipennis*, y *Hegeter amaroides* (Montoliu *et al.*, 2013). En Tenerife y Gran Canaria, donde también se ha encontrado este nematodo, otras especies de coleópteros o blátidos podrían albergar la larva infectante de *G. neoplasticum*.

Capítulo 4.- Inmunidad por parásitos.

4.1.- Inmunidad.

Los parásitos han coevolucionado con el sistema inmune de los vertebrados, lo que ha llevado a desarrollar sofisticadas estrategias que permiten una mayor supervivencia de los nematodos en el hospedador infectado (Van Die & Cummings, 2010). Este tipo de infecciones por parásitos representan un gran desafío para los sistemas inmunes, tanto por el tamaño del organismo patógeno como por su capacidad de producir moléculas inmunomoduladoras, que le permiten evadir el ataque por parte del hospedador (Finlay *et al.*, 2014). En general, los helmintos desarrollan infecciones crónicas en el hospedador mamífero. Las características tan particulares de estos organismos y su multicelularidad explican porqué los helmintos inducen una respuesta inmune muy diferente a la generada por otros microorganismos patógenos. En mamíferos, la respuesta inmune dominante es de tipo II, o Th2 e involucra tanto a células del sistema inmune innato y adaptativo, como a células no hematopoyéticas (células epiteliales y musculares) (Allen & Maizels, 2011). Esta respuesta de tipo Th2 es modificada, pudiendo suprimir respuestas inflamatorias, ocasionando que el hospedador posea mayor susceptibilidad a infecciones secundarias que requieren una inmunidad Th1 (Hewitson *et al.*, 2009).

4.1.1.- Tipos de inmunidad.

El hospedador puede emplear dos mecanismos de respuesta inmune. En primer lugar, la inmunidad innata de respuesta rápida, siendo la primera línea de defensa ante la invasión de un parásito. El principal mecanismo de respuesta innata rápida es la inflamación aguda; Y en segundo lugar está la inmunidad adquirida, que queda representada por la inmunidad humoral y por la inmunidad celular. Desde el punto de vista conceptual y didáctico, los tipos de respuesta inmune se pueden clasificar según la tabla 16, pero debemos tener en cuenta que ambos sistemas se encuentran estrechamente enlazados.

Es probable que la inmunidad innata frente a parásitos sea mucho más específica de especie que la inmunidad innata que se encuentra frente a virus y bacterias. Una diferencia clave entre la inmunidad innata y la adquirida reside en el uso de los receptores para reconocer a los microorganismos invasores (Tizard, 2009).

Tabla 16. - Patrón característico de la inmunidad innata y de la inmunidad adquirida (Collado et al., 2008).

Inmunidad		
	Innata	Adquirida
Tiempo en la respuesta	Minutos / horas	Días / semanas
Células principales	Macrófagos, células asesinas naturales (NK), granulocitos, monocitos	Linfocitos T (CD4+ y CD8+) y Linfocitos B.
Receptores	Definidos en el genoma Receptores de membrana: * Receptores tipo Toll (TLR) * Receptores tipo NOD (NLR) * Lectinas tipo C (CLRs) Solubles: * Ficolinas * Colectinas * Diversas Lectinas	Variable por recombinación * Receptor de linfocitos T (TCR) * Receptor de linfocitos B(BCR) * Inmunoglobulinas
Especificidad	El mismo receptor (con igual especificidad) puede encontrarse en varias células.	Cada célula tiene un receptor con especificidad única

4.1.1.1.- Inmunidad innata.

La inmunidad innata carece de memoria inmunológica, es menos específica que la adquirida, pero esto está compensado por la rapidez de la misma, ya que se produce en horas, y además, su intensidad no está ligada a un contacto previo con el agente extraño. Su actuación es fundamental para el desarrollo posterior de la defensa inmune adquirida, a la que ha de exponerse el agente una vez superadas estas barreras. La respuesta innata requiere la actuación de varios mecanismos:

1. Barreras físicas, químicas y biológicas: tales como la piel y las mucosas, diferentes enzimas de secreciones corporales (lisozima, lactoperoxidasa, etc) (Smith, 2010) y la microbiota autóctona (intestinal, vaginal, etc) (O'Hara & Shanahan, 2006). Ejemplos de inmunidad innata abarcan, por ejemplo; el reflejo de la tos; el moco, que atrapa bacterias y partículas pequeñas; o el ácido gástrico.

2. Factores químicos solubles: cuyos principales componentes son el complemento, las proteínas de inflamación y las citoquinas e interleucina 1 (que causa la fiebre) (Murphy *et al.*, 2009).

3. Respuesta innata producida por células: incluyendo, las células fagocíticas, tanto polimorfonucleares (neutrófilos), como mononucleares (macrófagos y células dendríticas), y células asesinas: K (killer), NK (natural killer) y LAK (lymphokine activated killer) (Whiteside, 1996; 2000).

Los parásitos han desarrollado mecanismos de evasión de la inmunidad innata pudiendo inhabilitar por diversas vías el sistema del complemento. Un ejemplo de evasión lo representa el parásito *T. spiralis*, que forma un complejo larva-célula nodriza ("célula nodriza"), estructura funcional diferente de cualquier otra célula de mamíferos, la cual pierde sus características de célula muscular estriada, adquiere una cápsula de colágeno, evidenciando un alto grado de angiogénesis. El complejo se constituye por una membrana interna procedente de la fibra muscular invadida y una membrana externa homogénea y hialina, derivada del sarcolema, y sobre la superficie se desarrolla una red capilar que completa el enquistamiento de las larvas (Ramírez Valenzuela, 1981). Este complejo célula nodriza, modula de alguna manera la respuesta inmune del hospedador y puede permanecer viable durante años.

4.1.1.2.- Inmunidad adquirida.

Posiblemente la inmunidad adquirida o adaptativa surgió evolutivamente mucho después que la innata, y por esta circunstancia se encuentra muy subordinada a ésta, aunque son muchas las formas en las que la inmunidad innata y adquirida colaboran (Beutler, 2004). La respuesta adaptativa antihelmíntica se caracteriza por la diferenciación de los linfocitos T (CD4+), hacia un perfil Th2; la secreción de las citoquinas IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13; el cambio de linfocitos B a IgE y también IgG1; o la expansión de poblaciones celulares como eosinófilos, basófilos y mastocitos, entre otras. Mediante la secreción de dicho perfil de citoquinas se suprime la diferenciación hacia perfiles más inflamatorios como Th1 y Th17 (Allen & Maizels, 2011).

La inmunidad adquirida se inicia con una serie de fases en cascada como son:

- Presentación del antígeno: los neutrófilos captan y destruyen a los agentes patógenos, pero los macrófagos, junto con las células dendríticas, además de destruirlo, lo procesan y lo presentan combinado con moléculas especiales, denominadas del complejo mayor de histocompatibilidad o CMH, a una subpoblación especializada de linfocitos T, los linfocitos Th ("helper", que son CD4+). Las células T no pueden identificar por sí solas un patógeno, solo cuando una de las células mencionadas presenta antígenos tiene lugar el siguiente proceso. Sin la función vital de presentación de antígeno y sin la producción de citoquinas activantes originadas por células de la inmunidad innata (tales como IL-12, IL-1, los interferones de tipo I o el TNF), las respuestas inmunes adquiridas no se producen (Gómez-Lucía *et al.*, 2007).

- Activación de las células T y la producción masiva de interleuquinas. Una vez que ha reconocido al antígeno en el contexto del CMH, los linfocitos Th activan a dos subpoblaciones de células de la inmunidad adquirida:

- Los linfocitos T citotóxicos (Tc), que destruirán células infectadas o alteradas.
- Los linfocitos B, que madurarán hacia células plasmáticas que secretan anticuerpos (IgE, IgG1) y citoquinas.

Son estos anticuerpos, al reaccionar con los patógenos, los que van a contribuir a que la inmunidad innata mejore sustancialmente. Por su parte, los complejos patógeno-anticuerpo van a adherirse a las células que poseen un receptor para la fracción constante de las inmunoglobulinas, tales como los macrófagos o los neutrófilos, y así serán fagocitados más fácilmente. Estos complejos van a activar al complemento, una molécula típica de la inmunidad innata.

Las respuestas Th2 están claramente implicadas en la inmunopatología durante las infecciones por helmintos (Cheever *et al.*, 2000; Marquet *et al.*, 1996). En el caso de la infección crónica, se ha sugerido que el mismo helminto participa en la secreción de factores inhibidores de la migración y reclutamiento de macrófagos y pudiera desviar esta respuesta de predominantemente Th2 a una respuesta con predominio de células T reguladoras, inmunosupresión y cambio hacia respuesta de los linfocitos B y a la producción de IgG4, si bien se sugiere un delicado equilibrio entre la respuesta Th1, Th2 y por células T reguladoras (Yazdanbakhsh *et al.*, 2001). En humanos, se ha visto que los pacientes con una respuesta predominante por células T reguladoras con cantidades marcadas de IgG4, tienen mayor susceptibilidad para el desarrollo de nematodos adultos activos metabólicamente en tejidos periféricos; los pacientes con respuesta predominantemente Th1, son identificados con enfermedad clínica clásica; y finalmente, los individuos con equilibrio en las respuestas por Th1, Th2 y células T reguladoras son resistentes a la infección (Hernández *et al.*, 2006).

En algunas infecciones parasitarias crónicas, como las producidas por filáridos o *Schistosoma*, la inmunoregulación que caracteriza la infección inicial es la marcada capacidad de respuesta de las células T, respuesta inmune que se ve amortiguada a medida que la infección se vuelve crónica. La producción de citocinas, por parte de los linfocitos de tipo Th1 y Th2 están regulados negativamente durante la infección crónica. El tratamiento farmacológico

restablece la capacidad de respuesta en ambas enfermedades, lo que indica un vínculo entre la infección y la supresión inmune. Curiosamente, las respuestas inmunológicas en sujetos portadores de infecciones recientes se caracterizan por una fuerte proliferación del antígeno parásito y la producción de IFN- γ , que es un tipo de citocina producida por los linfocitos TCR $\alpha\beta$ (linfocitos Th helper y linfocitos reguladores, todos ellos CD4+) y también producida por las células natural killer (NK) (Maizels & Yazdanbakhsh, 2003). La función más importante de esta citocina IFN- γ es la activación de los macrófagos, con aumento en la capacidad fagocitaria.

En el caso de *T. spiralis* los mecanismos inmunológicos de protección del huésped contra el nematodo están dirigidos contra los vermes adultos y contra las larvas recién nacidas o migrantes. El ataque inmunológico contra el verme adulto se manifiesta por un rechazo acelerado en el intestino, mediado por linfocitos T y mastocitos. Este fenómeno coincide con la máxima respuesta inflamatoria intestinal caracterizada por citocinas proinflamatorias, aumento en el recambio de enterocitos, aumento de células caliciformes, incremento de eosinófilos y de células epiteliales situadas en las criptas de la pared del intestino delgado (Venturiello & Gentilini, 2011). Después de tal ingestión, las larvas del parásito se liberan tras la digestión gástrica en el nuevo huésped, y se incrustan en la mucosa intestinal, sufriendo varias mudas hasta el estado adulto. De 5 a 7 días tras la infección, las hembras comienzan a dar a luz nuevas generaciones de larvas recién nacidas, lo que origina que tras varias semanas, se establezca una respuesta del hospedador mediada por la inmunidad intestinal, produciéndose una diferenciación e infiltración de células que conduce a la secreción de mediadores inespecíficos de inflamación (leucotrienos, histamina, serotonina, prostaglandinas) y aumento de enzimas lisosomales leucocitarias que cambian el flujo a través de la membrana y aumentan el peristaltismo, siendo los mastocitos esenciales para el rechazo de estas etapas larvales de L1 infectiva y L4 reproductiva (Gottstein *et al.*, 2009). Conjuntamente, la IL-25, una citocina derivada de células epiteliales, regula las respuestas inmunitarias de tipo Th2 y Th9, estimulando la diferenciación de linfocitos Th2 y Th9 al promover el complejo mayor de histocompatibilidad tipo 2 (CMH-II). Estos procesos ayudan a la expulsión de L4 de *Trichinella* por el intestino (Angkasekwina *et al.*, 2017). Estos mecanismos efectores inmunitarios afectan la viabilidad de los parásitos hembras, lo que da como resultado una expulsión continua de gusanos adultos por incremento peristáltico (Pozio, 2007a). Las modificaciones de las diferentes poblaciones celulares sanguíneas y tisulares del hospedador en las infecciones por *T. spiralis* generan consecutivamente anticuerpos específicos, como la IgE e IgG para las diferentes etapas larvales del parásito, evidenciándose la importancia de eosinófilos, macrófagos y neutrófilos como células efectoras y de anticuerpos específicos dirigidos contra la superficie de la larva recién nacida (L1) (Wang & Bell, 1988).

Una vez se forma el complejo larva muscular-célula nodriza, un grupo de glicoproteínas muy inmunogénicas denominadas TSL-1 estimulan la respuesta celular y humoral y confieren protección ante una reinfección, induciendo producción de anticuerpos específicos que se utilizan para el diagnóstico (Sofronic-Milosavljevic *et al.*, 2015; Cvetkovic *et al.*, 2016).

En el caso de la infección por el nematodo *S. lupi*, tanto en el proceso inflamatorio como en la respuesta inmune que desencadena en el HD, hay que tener en cuenta los cambios de

estadio larvario que transcurren en el ciclo de vida del parásito en el interior del hospedador. Tales cambios pueden desempeñar un importante papel en las interacciones del nematodo con los tejidos de los HI y HD, y en su capacidad para evadir la respuesta inmune, su larga supervivencia dentro del hospedador e incluso inducir la transformación neoplásica. En el largo periodo de prepatencia, ya se han desencadenado los procesos de inmunidad y el sistema inmune ya ha iniciado respuestas reconociendo como extraños los antígenos de las L3 en su muda a la pared de los vasos sanguíneos, así como en el encapsulamiento que sufre en ellos hasta que pasa L4. El mecanismo de defensa del parásito logra burlar o ralentizar la respuesta del hospedador (Aroch *et al.*, 2017). Entre las lesiones originadas por *S. lupi* en el hospedador se han encontrado los nódulos parasitarios en el esófago, bien sean de carácter no neoplásico o bien con evolución neoplásica a sarcoma esofágico. Según el conocimiento de algunos autores de los nódulos no neoplásicos, se diferenciarían dos etapas en su desarrollo: una primera etapa de inflamación temprana, donde se observa un severo infiltrado inflamatorio con focos de neutrófilos, infiltración linfoplasmática, fibrocitos inactivos y colágeno abundante. En algunos de estos casos, la inflamación se caracterizó por un predominio de eosinófilos, si bien estos casos particulares pueden representar todavía Infección más temprana, o pueden ser representativas de nódulos que contiene parásitos muertos. Posteriormente, se produciría una segunda etapa, denominada como pre-neoplásica, donde el nódulo se caracteriza por la presencia de fibroblastos activados y colágeno reducido, así como inflamación linfoplasmática. Posteriormente, el nódulo evolucionaría ya a un estado neoplásico (sarcoma) (Dvir *et al.*, 2010). Un estudio inmunohistoquímico de los nódulos esofágicos de carácter neoplásico producidos por *S. lupi* reveló que la serie mieloide era la predominante (la serie mieloide origina eritrocitos, monocitos y granulocitos) y, especialmente con presencia de neutrófilos, que jugarían un papel importante en la respuesta inflamatoria local innata en el nódulo inducido por *S. lupi* (Dvir *et al.*, 2011). En ninguna etapa de la génesis del nódulo hay un predominio de los macrófagos, que es el sello distintivo de inflamación granulomatosa (Dvir *et al.*, 2008; Van der Merwe *et al.*, 2008). El mecanismo por el cual *Spirocerca* spp. logra evadir parcialmente el sistema inmune del hospedador y continuar su ciclo originando nódulos de distinto grado de evolución no está del todo aclarado. Sin embargo, se han argumentado varios aspectos que ayudan a la comprensión de la evasión de esta respuesta inmune por parte del parásito. Por un lado, las células mieloides pueden tener un papel importante en la inducción del cáncer al generar proteasas radicales libres causando daño por oxidación al ADN (Vennervald & Polman, 2009). Las células mieloides también pueden jugar un papel crucial en el establecimiento de rechazo de tumor inducido por citoquinas, y también juegan un papel importante en la mediación endotelial de linfocitos y presentación de antígenos. Los leucocitos polimorfonucleares (granulocitos) han mostrado pro y anti-actividades inflamatorias. Podrán participar en el cambio a la supresión inmune por Th2 y Tregs mediante regulación ascendente de IL-10 (Di Carlo *et al.*, 2001). Además, los neutrófilos han demostrado que desempeñan un papel fundamental en la regulación de la respuesta inflamatoria contra el cáncer (Mattarollo & Smyth, 2010). Las células del sistema inmune tanto innato como adquirido pueden prevenir el desarrollo de neoplasias en un proceso denominado inmunovigilancia, así los neutrófilos cuando son inducidos por el amiloide sérico A 1 (SAA-1) para segregar interleucina IL-10 (antiinflamatorios), inducen a la supresión de la inmunovigilancia. (De Santo *et al.*, 2010).

4.2.-Marcadores inmunohistoquímicos.

4.2.1.- Origen de los marcadores.

Los linfocitos tienen receptores de antígeno en su superficie por los que pueden reconocer y responder a los antígenos para realizar su principal función, que es la de ser los encargados de la producción de anticuerpos y de la respuesta inmune mediada por células. Estos receptores de antígeno se conocen como TCR (receptor de antígeno del linfocito T), o como BCR (receptor de antígeno del linfocito B). Las células NK no tienen estos receptores de antígeno como los linfocitos T y B, pero poseen receptores de superficie que solo se encuentran entre los componentes moleculares de las células sanas, por lo que reconocen a las mismas, pero no a las células enfermas o anómalas. Las células NK eliminan a todas las células que no expresan dichas moléculas de superficie (Martín *et al.*, 2013).

Se han caracterizado muchas moléculas (receptores de antígeno, TCR, BCR) de superficie de los linfocitos (especialmente en seres humanos o ratones), asignando a cada molécula un nombre químico, funcional, o con la designación del marcador CD (del inglés cluster of differentiation). Como norma general, el sistema de designación CD proporciona números secuenciales de cada molécula (CD3, CD4, y así sucesivamente hasta CD350).

CD3 es el nombre con el que se denomina a un conjunto de proteínas de los TCR que participa en la activación de la señal. Estos CD3 están presentes en todos los linfocitos T, (Th1, Th2, Th17), sirviendo de marcador, por lo tanto, a células T CD4 + reguladoras productoras de TGF- β , y células TCR $\gamma\delta$ (Belghith *et al.*, 2003; García-Jiménez *et al.*, 2012; Martín *et al.*, 2013), tabla 17.

Tabla 17.- Principales marcadores inmunohistoquímicos de las células sanguíneas (Tizard, 2009).

Clasificación	División	Marcador	Características
Células serie B	B1-a	CD5+; CD45RA+; CD7+; CD20	CD79 +
	B1-b	CD45RA+; CD79+; CD20	
Neoplasias de células B		CD79+	
Linfocitos (TCR$\alpha\beta$)	Helper	CD4+	CD2 + CD3 +
	Reguladores	CD4+CD25+ Principal marcador CD3	
	Citotóxicos	CD8+	
Linfocitos (TCR$\gamma\delta$)		CD4- CD8-	
Célula Dendrítica	Activada	CD4+; CD31+; CD123	
	Folicular	CD21+; CD33+; CD35+	
Célula madre	Mieloide	CD34+; CD38	CD34 +
	Hematopoyética	CD34+	
Monocitos		CD68+	CD68 +
Macrófagos	CD11c+; CD14; CD163+	CD68+	

CD79 forma parte de una glicoproteína de la membrana de las células B y está asociado a las Ig de superficie de las mismas, constituyendo el receptor de las células B (BCR) (Mason *et al.*, 1995). Se expresa casi exclusivamente en células B y neoplasias de células B, y se constituye de componentes CD79a y CD79b. La expresión de CD79a y CD79b precede a la reordenación del gen de la cadena pesada de Ig y a la expresión de CD20 durante la ontogenia de células B, y desaparece más tarde que CD20 en la etapa tardía (células plasmáticas) de diferenciación de células B. Por lo tanto, los anticuerpos contra CD79a y CD79b son útiles en el diagnóstico diferencial de las neoplasias de células B, de las neoplasias de células T o las neoplasias mieloides, o el linfoma de Hodgkin, con predominio de linfocitos L y H del linfoma de Hodgkin clásico, tabla 17 (Chu & Arber, 2001; Gómez-Laguna *et al.*, 2010; Arroyo, 2017).

CD68 es un marcador de monocitos/macrófagos en el análisis de tejidos inflamados y tejidos tumorales (Arroyo, 2017; Chistiakov *et al.*, 2017). Es de uso frecuente como marcador para los macrófagos asociados a tumores (TAM). Los TAM son macrófagos activados alternativamente que mejoran la progresión tumoral al promover la invasión, migración y angiogénesis de las células tumorales. El marcador CD68 reconoce macrófagos M1 tumoricidas y antiinflamatorios M2 (Bingle *et al.*, 2002). La función de CD68 parece ser la captación de lipoproteínas de baja densidad.

Estudios sobre *S. lupi* en perros han determinado algunos aspectos químicos que ayudan a clasificar las lesiones nodulares en neoplásicas y no neoplásicas, según figura en la tabla 18. Estas moléculas podrían ayudar en el diagnóstico inmunológico en muestras de suero y, por lo tanto, servir como elementos de detección temprana o de confirmación donde los métodos de diagnóstico por imagen no sean concluyentes.

Tabla 18.- Parámetros químicos asociados con la presencia de *Spirocerca lupi* cuando induce a la formación de nódulos neoplásicos en comparación con perros con lesiones no neoplásicas.

Detección de marcadores en neoplasias producidas por <i>Spirocerca lupi</i>	
Proteína o Marcador químico	Autor
Perros con nódulos neoplásicos tienen factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)	Dvir <i>et al.</i> , 2010
Tienen recuentos de neutrófilos en sangre más altos	Dvir <i>et al.</i> , 2010
Factores asociados con otros procesos de proliferación se ha demostrado que se expresa en nódulos esofágicos de <i>S. lupi</i> , como son factor de crecimiento de fibroblastos y factor de crecimiento derivado de plaquetas	Dvir <i>et al.</i> , 2010 Mukorera <i>et al.</i> , 2013
Perros con nódulos neoplásicos producidos por <i>S. lupi</i> tienen niveles más altos de proteína C reactiva en suero	Nivy <i>et al.</i> , 2014
Perros con nódulos neoplásicos tienen niveles más altos de proteína C reactiva en suero	Mukorera <i>et al.</i> , 2011
Perros con nódulos neoplásicos tienen factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)	Mukorera <i>et al.</i> , 2013
Perros con nódulos neoplásicos tienen interleucina (IL) -8, una quimiocina proinflamatoria producida por macrófagos y otros tipos de células	Traversa <i>et al.</i> , 2008

Capítulo 5.- Resultados

A lo largo de este capítulo se presentarán los resultados obtenidos durante la realización de esta tesis doctoral. Este capítulo está estructurado en dos apartados, un primer apartado, en el que se describen los resultados publicados a través de tres artículos científicos y una comunicación a Congreso. La relación de estas publicaciones es:

- Occurrence, prevalence, and explanatory environmental variables of *Spirocerca vulpis* infestation in the foxes of western Spain.
- Characterization of lesions induced by *Spirocerca vulpis* (Spiruridae: spirocercidae) in red foxes (*Vulpes vulpes*).
- First detection of *Gongylonema species* in *Geotrupes mutator* in Europe.
- Survey of *Trichinella* spp. in wild mesocarnivores from Castilla y León, Spain.

A continuación de estos resultados ya publicados, hemos creído conveniente añadir un nuevo apartado en este capítulo sobre los resultados del estudio dedicado a *Trichinella* spp en el zorro, que aún no han sido publicados, pero que estimamos son de una importancia suficiente como para ser mostrado dentro de este mismo capítulo. Estos resultados se han plasmado en el siguiente artículo:

- Presencia y distribución de *Trichinella* spp. en zorros y otros mesocarnívoros en Castilla y León (España).

Capítulo 5.1.- Resultados publicados

5.1.1.- Occurrence, prevalence, and explanatory environmental variables of *Spirocerca vulpis* infestation in the foxes of western Spain

M. Martín-Pérez¹ & J.M. Lobo² & J.E. Pérez-Martín¹ & D. Bravo-Barriga¹ & J. Galapero³ & E. Frontera¹

¹ Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Cáceres, España.

² Departamento de Biogeografía y Cambio Global, Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC), Madrid, España.

³ Departamento de Medicina Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Cáceres, España

Parasitology Research 2019. 119(3), 973-983.

DOI: <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06590-6>

Factor de impacto (2019-2020) 1.641

Artículo publicado on-line en acceso abierto

Resumen.

Spirocerca lupi (Rudolphi 1809) es un parásito helminto asociado principalmente al perro doméstico (*Canis lupus familiaris*). Una de las principales consecuencias de la infección es la aparición de nódulos esofágicos que pueden transformarse en osteosarcomas y fibrosarcomas u otro tipo de neoplasias.

El objetivo principal de este estudio fue, no solo establecer la prevalencia del parásito *Spirocerca vulpis* recientemente descrito en el ciclo de vida silvestre de los carnívoros en el oeste de España, sino también elaborar un modelo para explicar el riesgo de infestación basado en 16 variables topoclimáticas y de hábitat. Durante el período comprendido entre junio de 2016 y noviembre de 2017, se analizaron 1644 cadáveres de zorros rojos (*Vulpes vulpes*) y otros 105 mamíferos silvestres, legalmente cazados o muertos en accidentes automovilísticos. Se encontraron nódulos con parásitos que se correspondían con *Spirocerca* en el 6% de los zorros, y los análisis moleculares establecieron una homología que osciló entre 98 y 100%

con la especie *S. vulpis*. No hubo diferencias en la ocurrencia de la infestación entre sexos, pero hubo diferencias en términos de edad, de modo que la infestación fue proporcionalmente más frecuente entre los individuos jóvenes. En términos de temporalidad, se observó un mayor porcentaje de casos positivos durante los meses de finales de otoño e invierno, especialmente entre diciembre y febrero. Este estudio proporciona nuevos datos sobre los factores que predisponen a la infección por *S. vulpis* en el zorro rojo. Los resultados del modelo indican que existe un patrón espacial en la ocurrencia y prevalencia de esta especie en el área estudiada, siendo mayores hacia el oeste, y que este patrón parece estar asociado principalmente con variables topoclimáticas. Las zonas adhesadas de arbolado y con cargas ganaderas que predisponen la presencia de abundante materia orgánica, la altitud, o las temperaturas mínimas mensuales más altas serían los principales factores ambientales que causarían mayores porcentajes de prevalencia y ocurrencia.



Occurrence, prevalence, and explanatory environmental variables of *Spirocerca vulpis* infestation in the foxes of western Spain

M. Martín-Pérez¹ · J.M. Lobo² · J.E. Pérez-Martín¹ · D. Bravo-Barriga¹ · J. Galapero³ · E. Frontera¹

Received: 2 May 2019 / Accepted: 22 December 2019
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

Abstract

The main aim of this study was to not only establish the prevalence of the recently described *Spirocerca vulpis* parasite in the wild-life cycle of carnivores in western Spain but to also elaborate a model to explain the risk of infestation based on 16 topoclimatic and habitat variables. During the period from June 2016 to November 2017, 1644 carcasses of red foxes (*Vulpes vulpes*) and another 105 wild mammals, legally hunted or killed in car accidents, were analyzed. Parasitic nodules of *Spirocerca* were found in 6% of the foxes, and the molecular analyses established a homology of our samples with the species *S. vulpis*. There were no differences in the occurrence of the infestation between sexes, but there were differences in terms of age, such that infestation was proportionally more frequent among young individuals. In terms of temporality, a higher percentage of positive cases was observed during the late-autumn and winter months, especially between December and February. This study provides new data on the factors that predispose *S. vulpis* infection in the red fox. Model results indicate that a spatial pattern exists in the occurrence and prevalence of this species in the studied area (higher probabilities to the west), and that this pattern seems to mainly be associated with topo-climatic variables.

Keywords *Spirocerca vulpis* · Red fox · Explanatory factors · Dung beetles · Topo-climatic factors · Habitat factors

Introduction

Spirocerca lupi (Rudolphi 1809) is a nematode that affects animals of the Canidae family (Bailey et al. 1963; Lobetti 2000). Most research on this parasitosis has focused on the dog as the definitive host. However, there is a great lack of information on the epidemiology and pathogenicity of *S. lupi* in wild hosts, specifically in foxes. Recently, a new species,

Spirocerca vulpis (Rojas et al. 2018a), was described from red foxes in Europe, which is morphologically and genetically different from *S. lupi* and produces stomach nodules in these hosts (Rojas et al. 2018a). Adults of *Spirocerca* are usually located in nodules in the thoracic wall of the esophagus. The females expel embryonated eggs that leave with the feces into the environment. These eggs are then ingested by dung beetles (Coleoptera Scarabaeidae and Geotrupidae), where they develop into infectious third-stage larvae (L3) until they are ingested by the definitive host (Bailey et al. 1963; Mukaratirwa et al. 2010). Other transport or paratenic hosts sometimes participate in the cycle (Chhabra and Singh, 1972).

Cases of infestation by *Spirocerca* have been reported worldwide (Bailey 1972; Van der Merwe et al. 2008; Dantas-Torres and Otranto 2014; Ferrantelli et al. 2010; Szafrńska et al. 2007; Popiołek et al. 2011). In Spain, previous studies have shown that *Spirocerca* is present in foxes and dogs with prevalence of up to 22.5% depending on the province (Criado-Fornelio et al. 2000; Martínez-Carrasco et al. 2007; Sanchis-Monsonís et al. 2019). In general, a greater incidence has been described in warm climates, leading us to suspect that certain topo-climatic and habitat factors may predispose hosts to these parasites. We examined a large number

Section Editor: Domenico Otranto

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00436-019-06590-6>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ E. Frontera
frontera@unex.es

- ¹ Department of Animal Health, Veterinary Faculty, University of Extremadura, Cáceres, Spain
- ² Department of Biogeography and Global Change, Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC), Madrid, Spain
- ³ Department of Animal Medicine, Veterinary Faculty, University of Extremadura, Cáceres, Spain

Published online: 13 January 2020

Springer

of fox carcasses from western-central Spain. The objective was to describe the occurrence and prevalence of spirocercosis in this area, to discriminate the species responsible, as well as to estimate climatic and habitat-associated variables to determine the most likely factors conditioning the progress of this parasitism in Iberian wild foxes.

Materials and methods

Study area

The study was conducted in 202 municipalities in five provinces of western Spain (Cáceres, Salamanca, Zamora, Ávila, and Valladolid). The total area covered by these municipalities is about 19,851 km², ranging geographically from 49.336 and 39.945 in latitude to -8.842 and -4.891 in longitude (Fig. 1).

Animal collection

From June 2016 to November 2017, a total of 1644 carcasses of red foxes (*Vulpes vulpes*) were subjected to necropsies where they were collected or, alternatively, at the parasitology laboratories of the Faculty of Veterinary Medicine at the University of Extremadura. The sampled foxes came from government-authorized hunting within legal guidelines and for recreational or commercial purposes or from deaths in traffic accidents. Of the 1644 analyzed foxes, 52.2% were males ($n = 859$), 47.4% were females ($n = 779$) and 6 could not be sexed. The approximate age of each of the foxes was determined according to the analysis of the dental formula (Sáenz de Buruaga et al. 2001), differences in the collection

date of the corpse from the most probable date of birth taking into account that foxes in Spain have a unique breeding season during the spring (Voigt and MacDonald 1984; Zapata et al. 1997), and the external appearance of the fox based on researcher experience.

The corpses ($n = 105$) of nine additional mammal species killed in traffic accidents were also examined (see Table 1).

Determining *Spirocerca* infestation

The presence of parasitic nodules in the gastric wall or other locations during necropsy was considered the parameter of positivity of infection. No other parameter was considered to establish positivity, considering that coprological methods have not been highly effective (Al-Sabi et al. 2014).

The molecular study was carried out from a group of representative samples from the different geographical areas. DNA was extracted from individual specimens of worms corresponding to 31 *Spirocerca* spp.-positive red foxes using the kit Exgene Tissue SV (GeneAll, Seoul, Korea) following the manufacturer's instructions. PCR amplification was carried out as described previously for Spirurida (Casiraghi et al. 2001), where a 689 bp-long region of the *cox1* gene was amplified using the primer set NTF (5'-TGAT TGGTGGTTTTGGTAA-3') and NTR (5'-ATAA GTACGAGTATCAATATC-3'). All the amplicons were sequenced by MacroGen Sequencing Service (<https://dna.macrogen.com>), where for automated directing sequencing, the PCR products were amplified using the internal forward and reverse primer. Direct PCR sequencing reaction was performed using a PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. The DNA samples containing the extension products were added to Hi-Di formamide (Applied Biosystems, Foster City, CA). The mixture was incubated at 95 °C for 5 min, followed by 5 min on ice and then analyzed

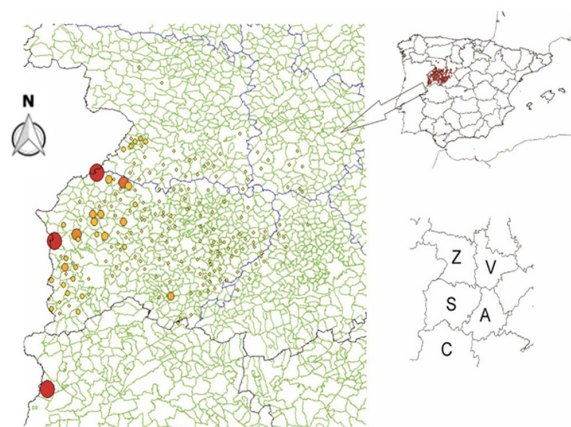


Fig. 1 Variation in the prevalence of *Spirocerca vulpis* derived from the foxes examined in 202 municipalities (green polygons) of peninsular Spain. Prevalence values varied from 0 (small yellow circles) to 1 (big red circles). The lower right map indicates the location of the Spanish provinces of Zamora (Z), Valladolid (V), Salamanca (S), Ávila (A), and Cáceres (C)

Table 1 Number and taxonomic identity of the studied animals

	No. of animals of sampling
Negative red foxes sampled (<i>Vulpes vulpes</i>)	1544
Positive <i>Spirocerca vulpis</i> red foxes (<i>Vulpes vulpes</i>)	100
Genet (<i>Genetta genetta</i>)	9
European badger (<i>Meles meles</i>)	22
Marten (<i>Martes foina</i>)	29
Wild cat (<i>Felis silvestris silvestris</i>)	11
European polecat (<i>Mustela putorius</i>)	9
Hedgehog (<i>Erinaceus europaeus</i>)	4
Egyptian mongoose (<i>Herpestes ichneumon</i>)	7
Eurasian otter (<i>Lutra lutra</i>)	3
Wild boar (<i>Sus scrofa</i>)	11
Total	1749

by ABI Prism 3730XL DNA analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Sequences were edited in Chromas Lite 2.1.1 (Technelysium Pty Ltd) and consensus sequences for each forward/reverse pair were created in BioEdit (Hall 1999). The identity at the species level was assessed based on the analysis of the generated sequences, taking into consideration the higher results of homology searches using the sequences deposited at GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Origin of environmental data

Two types of environmental data, topo-climatic and habitat variables, were used, and their predictive capacity accounting for the occurrence and prevalence of *S. vulpis* infestations in the studied municipalities was assessed. In total, 11 topo-climatic variables were considered to measure the probable environmental degree of association of *S. vulpis* with climatic and topographic characteristics. Data on current climate came from the University of Extremadura (see methodology in Felicísimo et al. 2011), which include average figures about temperature and precipitation during the period from 1950 to 2007 for the complete Iberian Peninsula (see, <http://ide.unex.es/conocimiento/>). Using this primary source of climatic information at a resolution of 1 km² UTM grid cells and the formulas of Valencia-Barrera et al. (2002) and López-Fernández and López (2008), nine bioclimatic variables were built: mean monthly precipitation, minimum monthly precipitation, maximum monthly precipitation, total annual precipitation, minimum monthly temperature, maximum monthly temperature, mean monthly temperature, continentality, and aridity. Topographic data came from a digital elevation model of the Iberian Peninsula at a resolution of 90 m downloaded from the same Web page of the University of Extremadura. This topographic information was used to derive two variables: mean elevation and elevation range (difference between the minimum and maximum elevation in each municipality).

Habitat variables come from the CORINE Land Cover project for the year 2011 (www.eea.europa.eu) at a resolution of 100 m², using three of the five recognized land uses of level 1: natural (forest and semi-natural areas), cultivated (agricultural areas), and urban areas (artificial surfaces). Human population density of each municipality was also included as a habitat variable according to the data provided by the Instituto Nacional de Estadística (<http://www.ine.es/>). All of these four habitat variables were included in order to account for the possible effect of anthropic alterations in promoting or suppressing this disease.

The obtained digital cartography was overlapped with the polygons of the 202 considered municipalities downloaded from the Instituto Geográfico Nacional (<http://centrodedescargas.cnig.es>). Average values of each of the 15 formerly mentioned variables were obtained for each

municipality using GIS software (TerrSet 18.21; Clark Labs, Clark University).

Statistical analyses

The 1644 cases of foxes were first analyzed to examine if sex and age factors are associated with the occurrence of *S. vulpis*. A Chi-square test was used to estimate the association between the two binary variables (male/female sex and positive/negative infestation). In the case of age, 1-year classes were established, and the Wald-Wolfowitz non-parametric test (WW test) was calculated to compare the distribution of the number of observations in these age classes among fox specimens with and without *S. vulpis* infestation. The WW-test was used because it is not only based on the comparison of mean values, but also on the shape of the complete distribution of these values (Sprent and Smeeton 2007).

Subsequently, all the available data were used to determine the presence-absence of *S. vulpis* in each of the 202 municipalities as well as the prevalence of the infestation in each municipality (the number of positive cases on the total number of carcasses). These two dependent variables were regressed against the selected topo-climatic and habitat variables. Generalized Linear Models (GLMs) were used to quantify the relevance of each variable individually on either (i) the presence-absence of *S. vulpis* or (ii) the continuous variation in prevalence values. Thus, separate models were run to compare the effect of the predictors in delimiting the occurrence of the infestation (presence-absence data) as well as the frequency of the infestation in those municipalities with positive cases. For the first case, we used a binomial error distribution linked to the set of predictor variables via a logit link function. In the second case, a Poisson distribution was assumed and a logarithmic link function was used. The Wald statistic was used as a test of the significance of the regression coefficient, based on maximum likelihood estimates. In these analyses, land use frequencies were submitted to a logit transformation to fulfill linear modeling assumptions (Warton and Hui 2011), while the remaining predictors were standardized to eliminate the effect of measurement scale differences (to a mean of zero and standard deviation of one). Our aim with these models was simply to estimate the individual explanatory capacity of each variable, and this variability is measured as their change in deviance from a null model (Dobson and Barnett 2018).

The complete variability explained by each of the two types of predictors (topo-climatic (TC) and habitat variables (H)) was estimated submitting the data to a saturated model in which all the variables of each type were included together. The number of collected foxes in each municipality may influence the obtained prevalence values because the smaller the number of foxes, the greater the probability of obtaining negative cases, and thus low prevalence values. Consequently, the number of collected foxes in each municipality is also

considered a third type of variable reflecting possible “sampling bias” (SB, hereafter). The comparative influence of TC, H, and SB variables in the occurrence or prevalence of *S. vulpis* infestations was estimated by a variation partitioning method or partial regression analysis (Legendre and Legendre 2012), where the complete explained variability is divided into eight different pure and combined components: three pure effects for each type of predictor, three combined variations between pairs of predictor types, one variation due to the combined effect of the three types of predictors and, finally, the variation not explained by the predictor variables included in the analysis. This analysis aims to discriminate the genuine relevance of each of the three types of variables, as well as their combined explanatory capacity as a consequence of the correlation between them (variability that can be indifferently attributed to one or the other set of predictors).

The variation of *S. vulpis* prevalence values between municipalities seems to show a clear spatially structured pattern (Fig. 1). The weight of this spatial pattern was measured regressing prevalence values against the nine terms of a third degree polynomial equation of the central latitude and longitude of each municipality (trend surface analysis or TSA; Legendre and Legendre 2012). Similarly, after making a complete saturated model including all the TC, H and SB variables, the residuals (the variability unexplained by these predictors) were also submitted to a TSA to assess whether one or several important spatially structured explanatory variables could be left out (Legendre and Legendre 2012) or, on the contrary, whether the variables used represent this spatially structured pattern.

All statistics were performed using StatSoft’s STATISTICA v10.0 (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA).

Results

The molecular analysis with BLASTn of 31 individual specimens of *Spirocerca* worms, always revealed homologies that oscillated between 99 and 100% with the *cox1* sequences of *Spirocerca* sp. (examples of accession numbers: KJ605489.1 and KJ605487.1) and between 98 and 100% with *S. vulpis* (examples: MH634016.1 and MH633993.1), being the homologies always below 93% with respect to the sequences of *S. lupi*. Therefore, BLAST could allow a preliminary identification of our sequences with *S. vulpis*, recently described by Rojas et al. (2018a) for red fox, even though different phylogenetic and morphometric studies are necessary for greater robustness (work in progress).

The number of analyzed foxes throughout the year varied due to differences in the periods in which hunting is allowed in the study area (Table 2). The number of positive animals, as well as the percentage of positive cases, was higher during the winter months, especially between December and February

(Table 2). The infestation of *S. vulpis* was observed in 100 red foxes with a general prevalence of 6.09%, which seems to vary spatially (Fig. 1). In terms of the provinces, Salamanca showed a prevalence value in foxes of 6.95%, while Ávila and Valladolid did not have any positive animals (Fig. 1). Only one fox was analyzed in the province of Cáceres and was positive, while a prevalence of 4.11% was obtained for the province of Zamora. The remaining mammal species were negative for the presence of *Spirocerca* spp. infestation.

The prevalence by sex reached 5.3% in males and 6.9% in females, but no significant association was observed (Chi-square = 1.77; $df = 1$; $p = 0.18$), such that the degree of infestation would be similar between males and females.

The number of analyzed foxes in which the age could be determined was 1637. Animals older than 1 year ($n = 1247$) had a prevalence of 5.8%, while young animals under 1 year ($n = 390$) reached a prevalence of 7.2%. In terms of age ranges, the highest number of positive cases was found in animals between 1 and 2 years old (Fig. 2). The frequency distribution of positive and negative cases of *S. vulpis* infestation differed significantly among the different age classes (WW-test = 17.99; $p < 0.001$; $n_1 = 1537$; $n_2 = 100$), mainly as a consequence of the proportionally lower number of positive cases in the older age classes (Fig. 2). Thus, infection was proportionally more frequent in young individuals.

Eight predictors were able to explain more than 10% of total variability in the occurrence of *S. vulpis* in municipalities (Table 3), highlighting among them topo-climatic variables such as mean elevation, minimum monthly temperature, and mean monthly temperature. In general, *S. vulpis* is more likely to be found in foxes when elevation is lower and minimum monthly temperatures are higher (Fig. 3). Considering habitat variables, the probability of finding *S. vulpis* is also higher in areas of natural land use (Fig. 3; Table 3). All topo-climatic predictors are able to account for 48.5% of total variability when considered together, while habitat variables taken together explain 15.6%. However, the occurrence of *S. vulpis* is also importantly accounted for by the number of collected foxes (SB variable; Table 3). Thus, *S. vulpis* is more likely to be found when the number of studied foxes is higher. A complete saturated model including all TC, H, and SB variables accounted for 59.8% of total variability. Partial regression analysis (Fig. 4) indicated that TC variables have the highest explanatory capacity independently of the other predictors (pure variability; 28.9%), and also that the pure effect of SB is not negligible (8.1%). A good part of the explained variability cannot be ascribed to any of the three types of predictors (11.3; i.e., combined effect of the three types of predictors). Finally, TSA analysis showed that the occurrence of *S. vulpis* is structured spatially; spatial variables explained 44.6% of total variability ($F = 17.14$; $df = 9, 192$; $p < 0.0001$). However, this spatial structure seems to be completely explained by the selected TC, H and SB predictors because the

Table 2 Number of collected foxes (N), number of foxes with positive infestation (N_{POS}) of *Spirocerca vulpis*, and percentage of infested foxes in the different seasons and months (winter (Win); spring (Spr); summer (Sum); autumn (Aut)) and months of the year from January (J) to December (D)

Seasons	Win	Win	Win/Spr	Spr	Spr	Spr/Sum	Sum	Sum	Sum/Aut	Aut	Aut	Aut/Win
Months	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
N	170	65	21	–	1	4	13	198	240	309	397	223
N_{POS}	16	13	0	–	0	0	0	6	9	8	26	22
%	9.4	20.0	0	–	0	0	0	3.0	3.8	2.6	6.5	9.9

residuals of the complete saturated model cannot be explained by a TSA ($F = 0.71$; $df = 9192$; $p = 0.70$).

Six predictors accounted for more than 10% of total variability of prevalence values between municipalities (Table 3). In this case, maximum monthly temperature, mean elevation and, especially, the number of collected foxes ($\approx 46\%$) were the most relevant variables. Thus, as in the case of presence-absence data (occurrences), the prevalence of *S. vulpis* is higher at lower elevations and higher temperatures (Fig. 5). However, in the municipalities with positive cases, the prevalence of infection was higher when the number of collected foxes was lower (Fig. 5). In total, topo-climatic variables account for almost 64% of total variability in *S. vulpis* prevalence. However, habitat predictors only explain 6.8% when they are considered together. The number of collected foxes is in this case a very relevant predictor capable of accounting for almost 46% of total variability (Table 3). Thus, the higher prevalence of *S. vulpis* appears when the number of foxes is low (Fig. 5). A complete saturated model including all TC, H, and SB variables accounted for 86.2% of total variability. Partial regression analysis (Fig. 4) indicated that TC variables have the highest pure explanatory capacity (35.8%), and that the combined and inseparable effect of TC and SB variables is also high (32.7%); i.e., topo-climatic variables and the number of collected foxes covary in a way that makes it impossible to

ascertain the explanatory capacity of each type of predictor. Interestingly, some of the combined effects are negative (Fig. 4), probably because the two types of variables together are able to explain the prevalence of *S. vulpis* better than the sum of their individual effects (Legendre and Legendre, 2012; a synergic effect). TSA analysis showed that the prevalence of *S. vulpis* is also structured spatially since spatial variables accounted for a large portion of total variability (62.4%; $F = 5.91$ $df = 9, 32$; $p < 0.0001$). Again, this spatial structure seems to be completely explained by the selected predictors; the residuals of the complete saturated model cannot be explained by a TSA ($F = 0.20$; $df = 9, 32$; $p = 0.99$).

Discussion

Our study, which included 1644 foxes from different areas of western Spain, showed that *S. vulpis* has a prevalence of 6.09% in this region. The molecular analyses revealed a high homology of our sequences with the new species *Spirocerca vulpis*, described by Rojas et al. 2018a for red fox, confirming an apparent host preference to red foxes.

Therefore, this is the first study of variables and risk factors for the occurrence of *S. vulpis* in the west of Spain, thus getting better our understanding of their epidemiology and distribution in the Iberian Peninsula, although further phylogenetic and morphometric studies must be carried out to expand the knowledge about the evolution and phylogenetic variability within the genre, in the line with those presented by Rojas et al., 2018b and Sanchis-Monsonís et al. 2019.

Previous studies carried out in Spain indicate that the prevalence of up to 2.5% in the northeastern Iberian Peninsula (Gortázar 1997 and Segovia et al. 2004). In the Valencia Autonomous Community (eastern Spain), a study involving 286 foxes showed, however, a prevalence of 22% (Sanchis-Monsonís 2015; Sanchis-Monsonís et al. 2019). However, in the central part of the Iberian Peninsula the prevalence found reached 18.03% (for 67 foxes studied in the province of Guadalajara; see Criado-Fornelio et al. 2000) while any positive fox appears in other cases (for 61 foxes studied in the province of Ciudad Real; Valcárcel et al. 2018). In wolf populations of the Iberian northern plateau, *S. lupi* may have a prevalence of around 16% (Domínguez and de la Torre 2002).

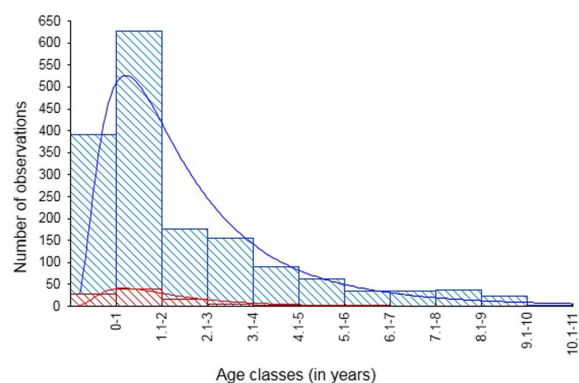


Fig. 2 Frequency distribution of the number of positive (in red) and negative (in blue) observations of *Spirocerca vulpis* infestation in foxes among different age classes. Lines represent the lognormal adjustment of the data

Table 3 Deviance (Dev), percentage of explained deviance (% ExpDev), values of the Wald statistic measuring the statistical significance of the regression coefficient and associated probability of each of the considered predictors in accounting for the presence-absence of *Spirocerca vulpis* infestation (occurrence), and on the prevalence of *Spirocerca vulpis* infestation in foxes of the 202 studied municipalities

	Occurrence				Prevalence			
	Dev	% ExpDev	Wald stat	<i>p</i>	Dev	% ExpDev	Wald stat	<i>p</i>
Mean monthly precipitation	194.19	6.0	12.38	0.0004			0.38	ns
Minimum monthly precipitation	191.12	7.5	13.73	0.0002			0.28	ns
Maximum monthly precipitation	196.35	4.9	10.36	0.001			0.00	ns
Total annual precipitation	194.19	6.0	12.38	0.0004			0.38	ns
Minimum monthly temperature	139.05	32.7	51.65	≤0.0001			3.45	ns
Maximum monthly temperature	180.55	12.6	22.36	≤0.0001	5.89	27.6	13.49	0.0002
Mean monthly temperature	152.33	26.2	40.33	≤0.0001	7.05	13.4	5.22	0.02
Continentality	183.53	11.1	14.87	≤0.0001	7.08	13.0	4.91	0.03
Aridity	199.92	3.2	6.90	0.009			0.00	ns
Mean elevation	135.37	34.5	34.63	≤0.0001	6.14	24.6	14.29	0.0002
Elevation range			1.36	ns	7.15	12.2	5.06	0.02
Urban land use	201.85	2.3	4.57	0.03			0.04	ns
Cultivated land use	179.65	13.0	23.80	≤0.0001			0.24	ns
Natural land use	176.19	14.7	25.12	≤0.0001			0.01	ns
Population density			1.44	ns			0.48	ns
Number of collected foxes	165.10	20.1	27.79	≤0.0001	4.41	45.8	17.55	≤0.0001

In other southern European areas with similar climates, the prevalence found in foxes ranged from 9.16% to 23.5% in Italy (Ferrantelli et al. 2010; Magi et al. 2014) and 12.9% in Portugal (Eira et al. 2006). Taking into account all of these data, it is evident that the prevalence of *Spirocerca* spp. differs widely between Euromediterranean localities despite similar climates between zones and regions. This suggests that the influence of undetermined risk factors at the local level (local vegetation, water concentration, animal presence, kind of soil, human density population, etc.) may play a decisive role in the prevalence of this parasitosis.

In general, according to other authors, it seems clear that the factors that most affect the prevalence of *Spirocerca* spp. may be the presence of intermediate and paratenic hosts in the environment, as well as the density of definitive hosts infected in specific areas (Urquhart et al. 1996; Du Toit et al. 2008). In fact, in our study, despite having sampled areas with relatively similar global climatic characteristics, we found municipalities with prevalence values above 20% and others with no positive infestations. The density of intermediate hosts, such as dung beetles, in a given area may influence the variation in infestation prevalence, also considering that this density is related to other factors like soil substrate, climatic conditions, livestock density, and/or farming methods (Bailey 1972; Lumaret et al. 1992; Gottlieb et al. 2014). In fact, the higher prevalence values of *S. vulpis* were found in the dehesa areas with a high cattle density and also with high density of Iberian

pig which eat acorns during autumn and winter (provinces of Salamanca and Zamora; see Fig. 1). In these areas, there is a greater availability of food sources for dung beetles, which would mean a greater density of these intermediate hosts, and in turn a greater probability of fox infections. This is in accordance with results provided by Frediani (1996), who found a greater percentage of dung beetles in the feces of foxes inhabiting pastures when compared with those inhabiting forest, which may be explained by the presence of a higher density of cattle in these pasturelands. The role of the dung beetle species colonizing livestock feces as intermediate hosts of *S. lupi* can be understood by considering that most part of Western Palearctic dung beetles are attracted to many different dung types (Martín-Piera and Lobo 1996; Frank et al. 2018). Thus, those natural areas with a high livestock density have a higher species richness, abundance and biomass of dung beetles (Lumaret et al. 1992; Galante et al. 1995; Lobo et al. 2006), and therefore, a greater probability of infection by *Spirocerca* spp. The results suggest that both the occurrence of *S. vulpis* infestations and the prevalence in the municipalities with positive cases seem to be spatially structured. Higher prevalence values and a high likelihood of obtaining positive fox infections occurred in the western zone of the studied territory on the border with Portugal. However, this spatial pattern disappears when climatic and habitat variables are considered, suggesting that an environmental component is at play in the infestation of *S. vulpis*. Some authors consider

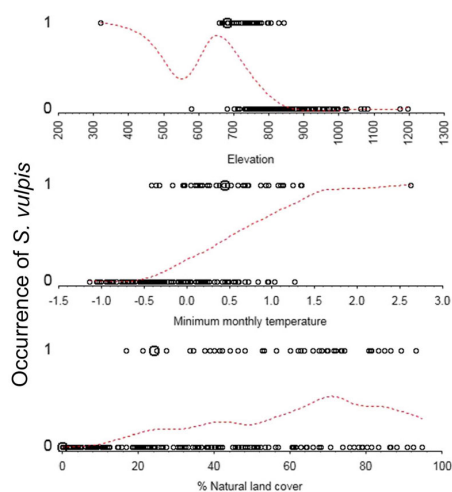


Fig. 3 Relationship between the negative (0) or positive (1) occurrence of *Spirocerca vulpis* in foxes and elevation, minimum monthly temperature, or percentage of natural land cover in the studied municipalities. The size of the dots indicates the number of observations. Broken line represents the adjustment of the data according to a distance-weighted least squares procedure

that climatic variables, such as ambient temperature and humidity, may explain the rate of infection in the intermediate host. In previous studies with filarioid nematodes (Genchi et al. 2009; Laaksonen et al. 2010), high temperatures aggravated the infection of intermediate hosts. However, under more arid conditions, the risk of infection of *S. lupi* seems to be higher in irrigated and shady environments during summer (Gottlieb et al. 2011) and a decrease in humidity and an increase in maximum temperature seem to diminish the risk of *S. lupi* infections (Gottlieb et al. 2014). Our results indicate that climate variables have a greater explanatory power than habitat variables such that the occurrence, but mainly the prevalence of *S. vulpis*, is higher in lowlands and warmer regions. In our case, these lowlands are interspersed with trees and have the highest mean minimum and maximum temperatures. As with temperature, the decrease in humidity seems to cause a decrease in the infection rates of dung beetles (Gottlieb et al. 2014), coinciding with the conclusions drawn by Rojas et al. (2017). Interestingly, our results suggest that the role of the environment is greater in explaining the relative proportion of positive cases in the infested municipalities ($\approx 64\%$), than in accounting for the presence-absence of *S. vulpis* ($\approx 48\%$). This would suggest that the infestation of a region may depend on idiosyncratic local factors, but when a territory has been infested, the prevalence would be conditioned by environmental factors.

Our study also shows that the highest percentage of infection in foxes is found during winter months. These data are coincident with recent studies in the Iberian Peninsula, in a mediterranean climate area, where the highest probability of finding *S. vulpis* was at

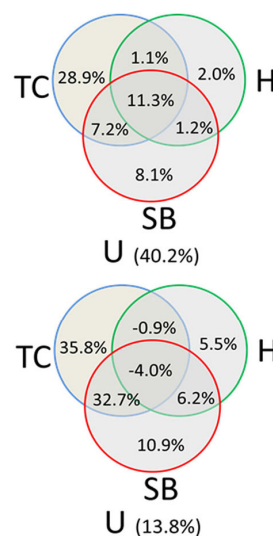


Fig. 4 Results of a partial regression analysis showing the pure and combined percentages of variability accounted for by topoclimatic (TC), habitat (H), and sampling bias (SB) variables on *Spirocerca vulpis* occurrence (upper diagram) and prevalence (lower diagram). U, unexplained variability. SB is the number of collected foxes in each municipality

temperatures of 4 °C, decreasing well above 21 °C or below -2 °C (Sanchis-Monsonís et al. 2019). In agreement with the results of previous studies carried out on dogs (Mazaki-Tovi et al. 2002; JyothiSree and Hafeez 2013), the seasonality of the occurrence of spirocercosis in the definitive host can be explained by the seasonality of the dung beetles themselves. According to the life cycle of the parasite, the highest incidence in foxes would occur between 3 and 6 months after the period of maximum activity of dung beetles (Van der Merwe et al. 2008). In our study area, it has been shown that the activity of dung beetles has two clear annual maximums as typical in Mediterranean regions: late spring and early autumn (Cabrero-Sañudo et al. 2008). This would imply that foxes become infected more frequently due to the ingestion of infected beetles occurring in the autumn season. This may occur for a variety of reasons, including an increased consumption of fruits and coleoptera by opportunistic foxes during early autumn (Carvalho and Gomes 2004; Santos et al. 2007; Diaz-Ruiz et al. 2011). This could also be due to the increased consumption of certain species of dung beetles depending on the season of the year. Assuming that some dung beetle species are more likely to act as intermediate hosts, additional decisive factors may also be the size of the beetle and the size of the particles they may consume (Serafini and Lovari 1993; Du Toit et al. 2012). More studies would be necessary to determine whether this is the case.

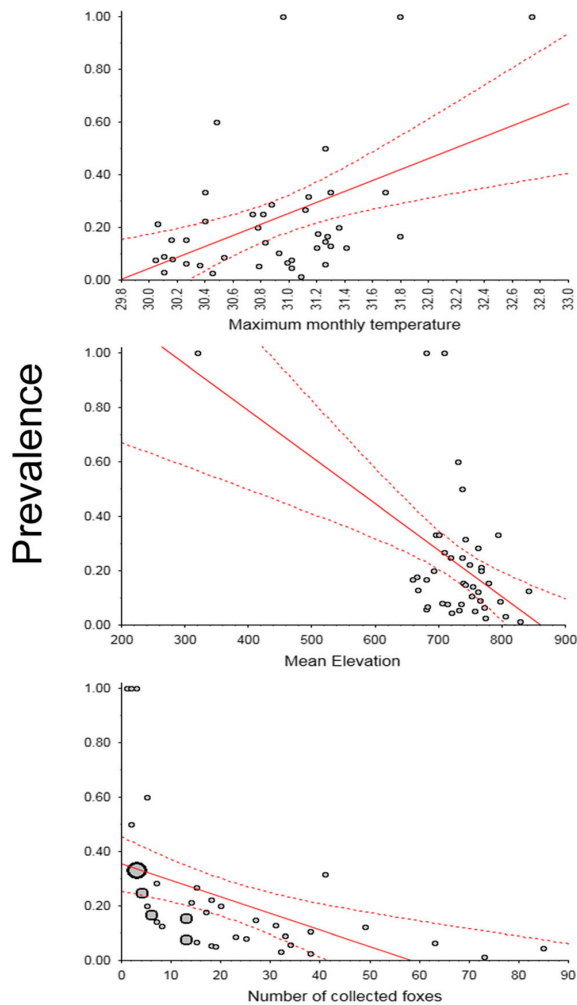


Fig. 5 Relationship between the prevalence of *Spirocerca vulpis* in the municipalities with positive cases and elevation, maximum monthly temperature, and number of collected foxes. The size of the dots depends of the number of observations. Solid lines represent the linear adjustment of the data and broken lines the 95% confidence interval

According to our results, there were no statistically significant differences in the occurrence of spirocercosis between males and females, as previously noted by other authors for foxes (Sanchis-Monsonís et al. 2019) and dogs (Wandera 1976; Mylonakis et al. 2006; Chikweto et al. 2012; Lobetti, 2014). Our results also show that fox age is relevant in explaining the presence of spirocercosis. The highest proportion of positive cases occurred in young foxes between 1 and 2 years old. At these ages, animals need a high protein intake and are more likely to actively look for insects such as dung beetles and other intermediate hosts of *Spirocerca* spp. (NRC 1982). Additionally, it is also likely that older animals have developed some degree of immunity due

to repeated exposure to the parasite, as is the case in the infection of foxes by *Angyostrongylus vasorum* (Webster et al. 2017). Due to the absence of studies about the immune response of foxes to infection by *Spirocerca* spp., future work would be necessary to confirm this latter hypothesis. Sanchis-Monsonís et al. (2019) observed that the prevalence of spirocercosis in foxes was greater in animals older than 6 months than in offspring, a fact explained by the long life cycle of the worm. It is difficult to establish a clear comparison of this work with our results, since they considered animal adults from 6 months and we have established adulthood after the year of life, finding the highest rates of infection in animals between 1 and 2 years old.

In dogs, Lobetti (2000, 2014) did not identify a specific age group at risk for *S. lupi* infection; however, it has been reported that dogs between 1 and 4 years old are the most commonly affected (Chhabra and Singh 1972; Dixon and McCue 1967). Other studies carried out in dogs (Mazaki-Tovi et al. 2002; Aroch et al. 2015) found that animals 1-year old or younger had the lowest risk of spirocercosis infection. In this same species, the highest probability of infection occurs in animals of 5 or more years (Mazaki-Tovi et al. 2002; Sasani et al. 2012). When compared with our results, all of these studies seem to confirm that the age with the greatest likelihood of infection varies between regions and species.

In addition to the fox, our study about the prevalence of spirocercosis in western Spain included nine other wild mammals (see Table 1) in which the infection has not been detected in the performed necropsies. *S. lupi* is a nematode parasite of carnivores mainly found in Canidae, especially domestic dogs (*Canis familiaris*), although it has also been described in many domestic animals such as goats, ponies, donkeys, domestic cats, etc. (Ndiritu and Al-Sadi 1976; Mense et al. 1992). Similarly, in addition to the red fox, (Martínez et al. 1978; Diakou et al. 2012), spirocercosis has been reported in a wide variety of wild carnivores, including the coyote (*Canis latrans*), the gray fox (*Urocyon cinereoargenteus*), the bobcat (*Felis rufus*), the wolf (*Canis lupus*), the Neotropical bush dog (*Speothos venaticus*), the black-backed jackal (*Canis mesomelas*), the cheetah (*Acinonyx jubatus*), and lemurs (*Lemur fulvus*, *Lemur macaco*, *Lemur cattaurs*) (Murray et al. 1964; Blancou et al. 1976; Pence and Stone 1978; Domínguez and de la Torre 2002; Szczęśna and Popiołek 2007; Rinas et al. 2009; Bumby et al. 2017). We do not rule out the possibility that a larger sample of these other wild mammals would yield positive cases of spirocercosis in the studied area.

Our results also provide some methodological implications associated with the role of the number of studied foxes in each municipality in explaining the occurrence and prevalence of spirocercosis. Because there was a greater likelihood of identifying positive cases

of infestation when more foxes were tested, detecting infestation should require extensive sampling. Consequently, concluding that a municipality is clear of infection is risky due to the low infection prevalence (6%). Furthermore, when only the data from those municipalities with positive cases are considered, the prevalence is higher if the number of foxes collected is low. This result may also be a consequence of sampling biases. However, if the number of foxes captured in each municipality is positively related to their population size, this result may suggest that spirocercosis could be the one of the culprits behind the decrease in the number of foxes in the infected municipalities, but it cannot be ruled out the influence of other possible pathogens (viruses, other parasites, etc.).

We have not included domestic dogs in our study although the risk of transmission of *S. vulpis* from foxes to domestic dogs should be viewed as high. However, Spanish legislation obligates to carry out deworming programs in dogs every 3–6 months thus hindering the spread of a disease requiring such a long time to complete its epidemiological cycle. Despite this, possible changes in this legislation, the gradual rapprochement of foxes to anthropized areas, together with the increasing of dog populations should be considered risk factors specific requiring monitoring programmes in order to prevent the transmission of *S. vulpis* to dogs.

In conclusion, Spirocercosis is an important parasitosis in the red foxes of Western Spain, being the subspecies *S. vulpis* the main cause of this infection. The occurrence and prevalence of the infection seem to be determined by multifactorial causes, including the season of year, the age of the foxes, and especially, topo-climatic and habitat factors.

Acknowledgments This work would not be possible without the collaboration of the hunting preserves' leadership who agreed to participate in the study. We want to thank Professors Donato Traversa (University of Teramo, Italy) and Antonio Frangipane di Regalbano (University of Padua, Italy) for their help in the molecular analysis. The authors would like to acknowledge the students of the Department of Animal Health, University of Extremadura, for their helpful assistance in processing these samples. This research did not receive any specific grant from funding agencies of the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

Al-Sabi MNS, Hansen MS, Chriél M, Holm E, Larsen G, Enemark HL (2014) Genetically distinct isolates of *Spirocerca* sp. from a naturally infected red fox (*Vulpes vulpes*) from Denmark. *Vet Parasitol* 205: 389–396. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.07.002>

- Aroch I, Markovics A, Mazaki-Tovi M, Kuzi S, Harrus S, Yas E, Baneth G, Bar-El M, Bdolah-Abram T, Segev G, Lavy E (2015) Spirocercosis in dogs in Israel: a retrospective case-control study (2004–2009). *Vet Parasitol* 211:234–240. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.05.011>
- Bailey WS (1972) *Spirocerca lupi*: a continuing Inquiry. *J Parasitol* 58:3–22
- Bailey WS, Cabrera DJ, Diamond DL (1963) Beetles of the family Scarabaeidae as intermediate hosts for *Spirocerca lupi*. *J Parasitol* 49:485–488
- Blancou J, Albignac R, Albignac R (1976) Note sur l'infestation des Lémuriens malgaches par *Spirocerca lupi* (Rudolphi, 1809). *Rev Elev Méd Vét Pays Trop* 29(2):127–130
- Bumby MM, Williams MC, Steyl JCA, Harrison-White R, Lutermann H, Fosgate GT, de Waal PJ, Mitha J, Clift SJ (2017) Genotyping and comparative pathology of *Spirocerca* in black-backed jackals (*Canis mesomelas*) in South Africa. *BMC Vet Res* 13:1–9. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1175-4>
- Cabrero-Sañudo F, Trotta-Moureu N, Corra M, Bravo O (2008) Composición de especies y estacionalidad de una comunidad de escarabajos del estiércol (Coleoptera: Scarabaeoidea) de la meseta central de la Península Ibérica. *Boletín de la S E A* 42:305–315
- Carvalho JC, Gomes P (2004) Feeding resource partitioning among four sympatric carnivores in the Peneda-Geres National Park (Portugal). *J Zool (Lond)* 263:275–283. <https://doi.org/10.1017/S0952836904005266>
- Casiraghi M, Anderson TJ, Bandi C, Bazzocchi C, Genchi C (2001) A phylogenetic analysis of filarial nematodes: comparison with the phylogeny of *Wolbachia endosymbionts*. *Parasitology* 122:93–103. <https://doi.org/10.1017/s0031182000007149>
- Chhabra RC, Singh KS (1972) On the life cycle of *Spirocerca lupi*: preinfective stages in the intermediate host. *J Helminthol* 46(2): 125–137. <https://doi.org/10.1017/S0022149X00022203>
- Chikweto A, Bhaiyat MI, Tiwari KP, CDe A, Sharma RN (2012) Spirocercosis in owned and stray dogs in Grenada. *Vet Parasitol* 190(3–4):613–616. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.07.006>
- Criado-Fornelio A, Gutierrez-Garcia L, Rodriguez-Caabeiroa F, Reus-Garcia E, Roldan-Sorianob MA, Diaz-Sanchez MA (2000) A parasitological survey of wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from the province of Guadalajara, Spain. *Vet Parasitol* 92:245–251. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(00\)00329-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(00)00329-0)
- Dantas-Torres F, Otranto D (2014) Dogs, cats, parasites, and humans in Brazil: opening the black box. *Parasit Vectors* 7:22. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-22>
- Diakou A, Karamanavi E, Eberhard M, Diakou A, Karamanavi E, Eberhard M, Kaldrimidou E (2012) First report of *Spirocerca lupi* infection in red fox *Vulpes vulpes* in Greece. *Wildl Biol* 18(3):333–336. <https://doi.org/10.2981/11-094>
- Diaz-Ruiz F, Delibes-Mateos M, Garcia-Moreno JL, Lopez-Martin J, Ferreira C, Ferreras P (2011) Biogeographical patterns in the diet of an opportunistic predator: the red fox *Vulpes vulpes* in the Iberian Peninsula. *Mammal Rev* 43(1):59–70
- Dixon KG, McCue JF (1967) Further observations on the epidemiology of *Spirocerca lupi* in the southeastern United States. *J Parasitol* 53: 1074–1075. <https://doi.org/10.2307/3276842>
- Dobson AJ, Barnett AG (2018) An introduction to generalized linear models, 4th edn. CRC Press, Boca Raton
- Dominguez G, de la Torre JA (2002) Aportaciones al conocimiento de los endoparásitos del lobo ibérico (*Canis lupus signatus* Cabrera, 1907). *Galemys* 14:49–58
- Du Toit CA, Holter P, Lutermann H, Scholtz CH (2012) Role of dung beetle feeding mechanisms in limiting the suitability of species as hosts for the nematode *Spirocerca lupi*. *Med Vet Entomol* 26(4): 455–457. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2011.01008.x>
- Du Toit CA, Scholtz CH, Hyman WB (2008) Prevalence of the dog nematode *Spirocerca lupi* in populations of its intermediate dung

- beetle host in the Tshwane (Pretoria) Metropole, South Africa. *Onderstepoort J Vet Res* 75(4):315–321
- Eira C, Miquel J, Vingada J, Torres J, Eira C, Miquel J, Torres J (2006) Spermiogenesis and spermatozoon ultrastructure of the cestode *Mosgovoyia ctenoides* (Cyclophyllidae: Anoplocephalidae), an intestinal parasite of *Oryctolagus cuniculus* (Lagomorpha: Leporidae) parasite of *Oryctolagus cuniculus* (Lagomorpha: Leporidae). *J Parasit Dis* 92(4):708–718. <https://doi.org/10.1645/GE-818R.1>
- Felicísimo ÁM, Muñoz J, Villalba J, Mateo RG (2011) Impactos, vulnerabilidad y adaptación al cambio climático de la biodiversidad española. 2. Flora y vegetación. Ed. Oficina española de cambio climático, Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. Madrid, España
- Ferrantelli V, Riili S, Vicari D, Percipalle M, Chetta M, Monteverde V, Gaglio G, Giardina G, Usai F, Poglayen G (2010) *Spirocerca lupi* isolated from gastric lesions in foxes (*Vulpes vulpes*) in Sicily (Italy). *Pol J Vet Sci* 13(3):465–471
- Frank K, Krell F, Slade EM, Raine EH, Chiew LY, Schmitt T, Vairappan CS, Walter P, Blüthgen N (2018) Global dung webs: high trophic generalism of dung beetles along the latitudinal diversity gradient. *Ecol Lett* 21:1229–1236. <https://doi.org/10.1111/ele.13095>
- Frediani J (1996) Dieta anual del zorro, *Vulpes vulpes*, en dos hábitats del parque Nacional de Doñana. *Doñana Acta Vertebrata* 23(2):143–152
- Galante E, Mena J, Lumbreiras C (1995) Dung beetles (Coleoptera: Scarabaeidae, Geotrupidae) attracted to fresh cattle dung in wooded and open pasture. *Environ Entomol* 24(5):1063–1068. <https://doi.org/10.1093/ee/24.5.1063>
- Genchi C, Rinaldi L, Mortarino M, Genchi M, Cringoli G (2009) Climate and *Dirofilaria* infection in Europe. *Vet Parasitol* 163(4):286–292. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.03.026>
- Gortázar C (1997) Ecología y patología del zorro (*Vulpes vulpes*, L.) en el valle medio del Ebro. Tesis Doctoral, Universidad de Zaragoza
- Gottlieb Y, Klement E, Aroch I, Lavy E, Kaufman M, Samish M, Markovics A (2014) Temporal association of ambient temperature and relative humidity with *Spirocerca lupi* infection of *Onthophagus sellatus*: a 14-year longitudinal study. *Vet Parasitol* 204:238–242. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.05.031>
- Gottlieb Y, Markovics A, Klement E, Naor S, Samish M, Gottlieb Y, Markovics A, Klement E, Naor S, Samish M, Aroch I, Lavy E (2011) Characterization of *Onthophagus sellatus* as the major intermediate host of the dog esophageal worm *Spirocerca lupi* in Israel. *Vet Parasitol* 180:378–382. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.03.008>
- Hall T (1999) Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp* 4:95–98
- JyothiSree C, Hafeez M (2013) A study on prevalence of spirocerosis in dogs in certain parts of Andhra Pradesh India. *Int J Agric Sci Vet Med* 1(3):59–66
- Laaksonen S, Puseenius J, Kumpula J, Venäläinen A, Kortet R, Oksanen A, Hoberg E (2010) Climate change promotes the emergence of serious disease outbreaks of Filarioid nematodes. *Ecohealth* 7(1):7–13. <https://doi.org/10.1007/s10393-010-0308-z>
- Legendre P, Legendre L (2012) Numerical Ecology. Elsevier, Amsterdam
- Lobetti R (2000) Survey of the incidence, diagnosis, clinical manifestations and treatment of *Spirocerca lupi* in South Africa: research communication. *J S Afr Vet Assoc* 71(1):43–46. <https://doi.org/10.4102/jsava.v71i1.676>
- Lobetti R (2014) Follow-up survey of the prevalence, diagnosis, clinical manifestations and treatment of *Spirocerca lupi* in South Africa. *J S Afr Vet Assoc* 85(1):1–7. <https://doi.org/10.4102/jsava.v85i1.1169>
- Lobo JM, Hortal J, Cabrero-Sañudo FJ (2006) Regional and local influence of grazing activity on the diversity of a semi-arid dung beetle community. *Divers Distrib* 12:111–123. <https://doi.org/10.1111/j.1366-9516.2006.00194.x>
- López-Fernández ML, López FMS (2008) Clasificación bioclimática mundial y cartografía bioclimática de la España peninsular y balear. Serie botánica 17. Servicio de publicaciones de la Universidad de Navarra. Pamplona, pp 279
- Lumaret JP, Kadiri N, Bertrand M (1992) Changes in resources: consequences for the dynamics of dung beetle communities. *J Appl Ecol* 29(2):349–356. <https://doi.org/10.2307/2404504>
- Magi M, Guardone L, Prati MC, Mignone W, Macchioni F, Sperimentale Z (2014) Extraintestinal nematodes of the red fox *Vulpes vulpes* in north-West Italy. *J Helminthol* 89(4):506–511. <https://doi.org/10.1017/S0022149X1400025X>
- Martínez F, Hernández S, Calero R, Moreno T (1978) Contribución al conocimiento de los parásitos del zorro (*Vulpes vulpes*). *Rev Ibér Parasitol* 38(1–2):207–211
- Martínez-Carrasco C, Ruiz de Ybáñez M, Sagaminaga JL, Garijo M, Moreno F, Acosta I, Hernandez S, Alonso F (2007) Parasites of the red fox (*Vulpes vulpes* Linnaeus, 1758) in Murcia, Southeast Spain. *Rev Med Vet* 158(7):331–335
- Martin-Piera F, Lobo JM (1996) A comparative discussion of trophic preferences in dung beetle communities. *Misc Zool* 19:13–31
- Mazaki-Tovi M, Baneth G, Aroch I, Harrus S, Kass PH, Ben-Ari T, Zur G, Aizenberg I, Bark H, Lavy E (2002) Canine spirocerosis: clinical, diagnostic, pathologic and epidemiologic characteristics. *Vet Parasitol* 107(3):235–250. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(02\)00118-8](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00118-8)
- Mense MG, Gardiner CH, Moeller RB, Partridge HL, Wilson S (1992) Chronic emesis caused by a nematode induced gastric nodule in a cat. *J Am Anim Hosp Assoc* 201:597–598
- Mukaratirwa S, Pillay E, Munsammy K (2010) Experimental infection of selected arthropods with spirurid nematodes *Spirocerca lupi* Railliet & Henry, 1911 and *Gongylonema ingluvicola* Molin, 1857. *J Helminthol* 84:369–374. <https://doi.org/10.1017/S0022149X10000039>
- Murray J, Campbell H, Jarrett WHF (1964) *Spirocerca lupi* in a cheetah. *Afr J Ecol* 2:164. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2028.1964.tb00209.x>
- Mylonakis ME, Leontides LS, Rallis T, Patsikas M, Papadopoulos EI, Koutinas AF, Florou M, Fytianou A, Mylonakis ME (2006) Clinical signs and clinicopathologic abnormalities in dogs with clinical spirocerosis: 39 cases (1996–2004). *J Am Vet Med Assoc* 228:1063–1067. <https://doi.org/10.2460/javma.228.7.1063>
- National Research Council (NRC) (1982) Nutrient Requirements of Mink and Foxes. In: Nutrient requirements of animals, 2nd edn. The National Academies Press, Washington, DC. <https://doi.org/10.17226/1114>
- Ndiritu CG, Al-Sadi HI (1976) Pathogenesis and lesions of canine spirocerosis. *Mod Vet Pract* 57:924–931
- Pence DB, Stone JE (1978) Visceral lesions in wild carnivores naturally infected with *Spirocerca lupi*. *Vet Pathol* 15:322–331. <https://doi.org/10.1177/030098587801500306>
- Popiołek M, Szczęśna-Staśkiewicz J, Bartoszewicz M, Okarma H, Smalec B, Zalewski A (2011) Helminth parasites of an introduced invasive carnivore species, the raccoon (*Procyon lotor* L.), from the Warta Mouth National Park (Poland). *J Parasitol* 97(2):357–360. <https://doi.org/10.1645/ge-2525.1>
- Rinas MA, Nesnek R, Kinsella JM, Dematteo KE (2009) Fatal aortic aneurysm and rupture in a neotropical bush dog (*Speothos veneticus*) caused by *Spirocerca lupi*. *Vet Parasitol* 164(2–4):347–349. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.05.006>
- Rojas A, Dvir E, Farkas R, Sarma K, Borthakur S, Jabbar A, Markovics A, Otranto D, Baneth G (2018b) Phylogenetic analysis of *Spirocerca lupi* and *Spirocerca vulpis* reveal high genetic diversity and intra-individual variation. *Parasit Vectors* 11(1):639. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3202-0>
- Rojas A, Freedberg N, Markovics A, Gottlieb Y, Baneth G (2017) Influence of physical and chemical factors on the embryonation,

- hatching and infectivity of *Spirocerca lupi*. *Vet Parasitol* 242:71–78. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.05.026>
- Rojas A, Sanchis-Monsonís G, Alic A, Hodzic A, Otranto D, Yasur-Landau D, Martínez-Carrasco C, Baneth G (2018a) *Spirocerca vulpis* sp. nov. (Spiruridae: Spirocercaidae): description of a new nematode species of the red fox, *Vulpes vulpes* (Carnivora: Canidae). *Parasitology* 145(14):1917–1928. <https://doi.org/10.1017/S0031182018000707>
- Sáenz de Buruaga M, Lucio AJ, Purroy FJ (2001) Reconocimiento de sexo y edad en especies cinegéticas. Edilesa Ed, León, Spain
- Sanchis-Monsonís G (2015) Parasitofauna del zorro (*Vulpes vulpes*) en la Comunidad Valenciana. Tesis Doctoral, Universidad de Murcia, Spain
- Sanchis-Monsonís G, Fanelli A, Tizzani P, Martínez-Carrasco C (2019) First epidemiological data on *Spirocerca vulpis* in the red fox: a parasite of clustered geographical distribution. *Vet Parasitol Reg Stud Reports* 18:100338. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2019.100338>
- Santos MJ, Pinto BM, Santos-Reis M (2007) Trophic niche partitioning between two native and two exotic carnivores in SW Portugal. *Web Ecol* 7(1):53–62. <https://doi.org/10.5194/we-7-53-2007>
- Sasani F, Javanbakht J, Javaheri A, Mohammad Hassan MA, Bashiri S (2012) The evaluation of retrospective pathological lesions on spirocercosis (*Spirocerca lupi*) in dogs. *J Parasit Dis* 38:170–173. <https://doi.org/10.1007/s12639-012-0216-y>
- Segovia JM, Torres J, Miquel J (2004) Helminth parasites of the red fox (*Vulpes vulpes* L., 175) in the Iberian Peninsula: an ecological study. *Acta Parasitol* 49(1):67–79
- Serafini P, Lovari S (1993) Food habits and trophic niche overlap of the red fox and the stone marten in a Mediterranean rural area. *Acta Theriol* 38(3):233–244
- Sprent P, Smeeton NC (2007) Applied nonparametric statistical methods, 4th edn. CRC Press, Boca Raton
- Szafrańska E, Wasielewski O, Bereszynski A (2007) A faecal analysis of helminth infections in wild and captive wolves, *Canis lupus* L., in Poland. *J Helminthol* 84:415–419. <https://doi.org/10.1017/S0022149X10000106>
- Szczęsna J, Popiołek M (2007) The first record of *Spirocerca lupi* (Rudolphi, 1809) (Spirocercaidae, Nematoda) from Poland based on faecal analysis of wolf (*Canis lupus* L.). *Helminthol* 44(4):230–232. <https://doi.org/10.2478/s11687-007-0038-0>
- Urquhart GM, Armour J, Duncan JL, Dunn AM, Jennings FW (1996) *Veterinary parasitology*, 2nd edn. Blackwell Science Ltd., Oxford, p 307 <https://trove.nla.gov.au/version/46512203>
- Valcárcel F, González J, Aguilar A, Sánchez M, González MG, Suárez R, Tercero AM, Tercero JM, Nieto JM, González-guirado AM, Olmeda AS (2018) Spirocercosis in red fox (*Vulpes vulpes*) in a natural reserve located in a meso-Mediterranean area. *Vet Parasitol Reg Stud Reports* 13:115–119. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2018.05.002>
- Valencia-Barrera RM, Comtois P, Fernández-González D (2002) Bioclimatic indices as a tool in pollen forecasting. *Int J Biometeorol* 46:171–175. <https://doi.org/10.1007/s00484-002-0138-y>
- Van der Merwe LL, Kirberger RM, Clift S, Williams M, Keller N, Naidoo V (2008) *Spirocerca lupi* infection in the dog: a review. *Vet J* 176: 294–309. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.02.032>
- Voigt DR, Macdonald DW (1984) Variation in the spatial and social behaviour of the red fox, *Vulpes vulpes*. *Acta Zool Fenn* 171:261–265
- Wandera JG (1976) Further observations on canine spirocercosis in Kenya. *Vet Rec* 99:348–351. <https://doi.org/10.1136/vr.99.18.348>
- Warton DI, Hui FKC (2011) The arcsine is asinine: the analysis of proportions in ecology. *Ecology* 92(1):3–10. <https://doi.org/10.1890/10-0340.1>
- Webster P, Monrad J, Kapel CMO, Kristensen AT, Jensen AL, Thamsborg SM (2017) The effect of host age and inoculation dose on infection dynamics of *Angiostrongylus vasorum* in red foxes (*Vulpes vulpes*). *Parasit Vectors* 10:4. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1940-4>
- Zapata SC, Travaini A, Delibes M (1997) Reproduction of the red fox *Vulpes vulpes* in Doñana, southern Spain. *Mammalia* 61:628–631

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

5.1.2.- Characterization of lesions induced by *Spirocerca vulpis* (Spiruridae: spiroceri- dae) in red foxes (*Vulpes vulpes*).

Manuel Martín-Pérez^{1*}, Luis Gómez-Gordo^{2*}, Javier Galapero^{2*}, Juan Enrique Pérez-Martín¹, Daniel Bravo-Barriga¹, Rafael Calero-Bernal³, Eva Frontera².

¹ Parasitología, Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Cáceres, España

²Anatomía Patológica, Departamento de Medicina Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Extremadura, Cáceres, España

³ SALUVET, Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.

+ Los dos primeros autores, Martín-Pérez, M. y Gómez-Gordo, L. deben ser considerados como primeros coautores.

* Corresponding author

Journal of Wildlife Diseases 2022. 58(1), 137-147.

DOI: 10.7589/JWD-D-20-00162

Factor de impacto (2021) 1.187

Artículo publicado on-line en acceso abierto

Resumen.

La infección por *Spirocerca lupi* en perros (*Canis domesticus*) se asocia con lesiones esofágicas que pueden evolucionar a un estadio neoplásico en forma de sarcoma esofágico. En el presente estudio, se analizaron un total de 163 zorros positivos a *Spirocerca*, observando que el 100% de los vermes analizados pertenecieron a la subespecie *Spirocerca vulpis*. La mayoría de los zorros positivos (96,9 %) presentaban nódulos de *S. vulpis* localizados en la zona gástrica (pared y/o epiplón), y solamente el 3,1% tenían nódulos en el intestino delgado, no encontrándose en otras localizaciones. A diferencia de lo que ocurre en el perro, en el zorro no se han informado formas neoplásicas. Las lesiones inducidas por *S. vulpis* se caracterizaron en un total de 71 animales que presentaron un óptimo estado de conservación de los nódulos gástricos para su estudio histopatológico e inmunohistoquímico (IHC). Se estableció una clasificación de las lesiones en tres grupos: parcheado, difuso y mixto, en función de la

distribución de las células en dichas lesiones. La mayor parte de los nódulos tenían distribución difusa (76,1%), mientras que el 21,1% presentó distribución parcheada. El grupo de las lesiones mixtas solo apareció en un 2,8% de los nódulos. El análisis inmunohistoquímico se realizó en diez muestras de lesiones parcheadas y en 10 difusas utilizando el marcador CD68 para macrófagos, el CD3 para linfocitos T y el CD79 para linfocitos B. Además, las muestras también se tiñeron mediante la tinción Hematoxilina-Eosina con el fin de evaluar neutrófilos y eosinófilos. La intensidad de la necrosis, las hemorragias y la presencia de colágeno fueron otros parámetros que también se analizaron en el presente estudio.

Un punto en común de todas las muestras fue la presencia de un infiltrado linfoplasmocitario de moderado a severo. Tanto las lesiones parcheadas como las difusas presentaron escasa cantidad de linfocitos B y también una leve infiltración de eosinófilos.

En cuanto a los neutrófilos, las lesiones parcheadas presentaron una cantidad significativamente mayor que las difusas. Además, en las parcheadas también se apreció un predominio mayor de fibras colágenas maduras que en las difusas. Tanto la presencia de linfocitos B como de linfocitos T fue mayor en las parcheadas que en las difusas, siendo estadísticamente significativa esta diferencia en el caso del marcador CD79 (linfocitos B). La presencia de macrófagos fue levemente mayor (aunque no significativo) en lesiones de tipo parcheado que en las de tipo difuso.

Estos hallazgos sugieren que la forma difusa es una etapa temprana de la lesión en la espirocercosis del zorro, y que eventualmente evolucionaría a lesiones más irregulares (tipo parcheado). Una de las conclusiones más importantes de este estudio es que ninguna de las 71 muestras analizadas evidenció lesiones de tipo neoplásico, a diferencia de los procesos descritos en perros doméstico por *Spirocerca lupi*.

CHARACTERIZATION OF LESIONS INDUCED BY *SPIROCERCA VULPIS* (SPIRURIDAE: SPIROCERCIDAE) IN RED FOXES (*VULPES VULPES*)

Manuel Martín-Pérez,^{1,4} Luis Gómez-Gordo,^{2,4} Javier Galapero,^{2,5} Juan Enrique Pérez-Martín,¹ Daniel Bravo-Barriga,¹ Rafael Calero-Bernal,³ and Eva Frontera¹

¹ Universidad de Extremadura, Facultad de Veterinaria, Departamento de Sanidad Animal, Parasitología, Avda. Universidad s/n, 10003, Cáceres, Spain

² Universidad de Extremadura, Facultad de Veterinaria, Departamento de Medicina Animal, Anatomía Patológica, Avda. Universidad s/n, 10003, Cáceres, Spain

³ SALUVET, Department of Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, Complutense University of Madrid, Av. Puerta de Hierro s/n, 28040, Madrid, Spain

⁴ The authors wish it to be known that, in their opinion, the first two authors, M. Martín-Pérez and L. Gomez-Gordo, should be regarded as joint first authors.

⁵ Corresponding author: (email: jagaar@unex.es)

ABSTRACT: *Spirocerca lupi* infection in dogs (*Canis domesticus*) is associated with esophageal lesions that may evolve to a neoplastic stage in the form of esophageal sarcoma. In the red fox (*Vulpes vulpes*) infected with the closely related *Spirocerca vulpis*, similar lesions may occur in the stomach, but neoplastic forms have not been reported. We characterize *Spirocerca vulpis*-induced lesions in the fox, using pathology and immunohistochemical (IHC) techniques. Seventy-one out of 163 *Spirocerca vulpis*-positive red foxes were selected and subjected to histopathological study. Lesions were classified as patchy or diffuse. Ten patchy and 10 diffuse lesion samples were studied using three IHC markers (CD68, CD3, and CD79 α for macrophages, T lymphocytes, and B lymphocytes, respectively) and H&E stain for neutrophils and eosinophils. Intensity of necrosis, hemorrhages, and the presence of collagen was also analyzed. Of the *S. vulpis*-positive red foxes, 96.9% had *S. vulpis* nodules localized in the gastric area (wall and/or omentum), and 3.1% had nodules in the small intestine. All the samples had a moderate to severe lymphoplasmacytic infiltrate. Mild eosinophil infiltration was observed in both types of lesions, while neutrophil infiltration was significantly higher in the patchy than in the diffuse lesions. Fibrosis with mature collagen fibers was also predominant in the patchy lesions along with the presence of T lymphocytes and macrophages. Both the patchy and diffuse patterns had very few B lymphocytes. These findings suggest that the diffuse form is an earlier stage of the lesion, which eventually evolves into patchy forms. Neoplastic forms were not seen. Although more studies are necessary, this study describes the lesions, characterizes the inflammatory infiltrates, and establishes a possible evolution of the different pathological forms of *S. vulpis* infection in the red fox.

Key words: *Spirocerca vulpis*, lesion, nodules, red fox, immunohistochemistry

INTRODUCTION

Spirocerca lupi (Rudolphi 1809) is a parasitic helminth mainly associated with the domestic dog (*Canis lupus familiaris*). It induces the formation of esophageal nodules that can transform into osteosarcoma and fibrosarcoma in chronic infections (Lobetti 2000; Ranen et al. 2004, 2008; van der Merwe et al. 2008). Up to 25% of these nodules may undergo neoplastic transformation (Dvir et al. 2001). The parasite has an indirect life cycle involving several hosts, including coprophagous beetles as the intermediate host, with birds, reptiles, amphibians,

and small mammals as paratenic hosts, and the definitive hosts (DHs) are carnivores such as domestic dogs (*Canis lupus familiaris*; Bailey 1972) and possibly the red fox (*Vulpes vulpes* L.), the Iberian lynx (*Lynx pardinus* L.), and the Iberian wolf (*Canis lupus signatus*; Rojas et al. 2018a; Valcárcel et al. 2018). A DH is typically infected by ingesting an intermediate host or a paratenic host containing infective larvae (L3). Once in the DH's stomach, the L3 hatch and penetrate the gastric wall, reaching the aorta approximately 3 wk after ingestion, then requiring a further 10–12 wk for maturation.

Mature nematodes then leave the aorta and migrate to the esophagus (Lora-Michiels et al. 2003; van der Merwe et al. 2008).

In dogs, *Spirocerca*-induced lesions in natural infestations have been analyzed (Dvir et al. 2001, 2010). According to the degree of pathogenesis, two stages were established in nonneoplastic lesions (Dvir et al. 2010): early inflammation characterized by fibrocytes and abundant collagen, and a preneoplastic stage characterized by activated fibroblasts and reduced collagen. The nodule ultimately evolves into a malignant sarcoma (Dvir et al. 2011).

The red fox is one of the most widespread European wild canids and is considered a key species under the One Health framework, acting as a major reservoir for extraintestinal nematodes transmissible to other animals and to humans. Recent studies (e.g., Rojas et al. 2018b; Martín-Pérez et al., 2020) indicate that infection in the red fox is due to a newly described species of *Spirocerca* (*S. vulpis*). Reanalysis of *S. lupi*-like organisms obtained from red foxes in previous reports may reveal they are *S. vulpis*, as Rojas et al. (2020) confirmed in nematodes from Switzerland identified after being stored for more than 20 years. In western Spain, our group observed that 6% of the red foxes analyzed had *S. vulpis*, using molecular and morphological analysis, and no *S. lupi* was found (Martín-Pérez et al. 2020).

In red foxes, *Spirocerca*-associated lesions typically occur as gastric wall nodules (Segovia et al. 2001; Ferrantelli et al. 2010; Diakou et al. 2012; Al-Sabi et al. 2014). The histopathological lesion is characterized by granulomatous cellular infiltrates surrounding nematodes. The parasites are found in a central cavity space surrounded by an eosinophilic and granular exudate (Rojas et al. 2018b). Neoplastic forms have not yet been described in foxes, and there is a lack of studies regarding the evolution of *Spirocerca*-associated lesions. Our study aimed to determine the nature of the lesions induced by *S. vulpis* in red foxes from Spain.

MATERIAL AND METHODS

Study area and sample collection

The study was carried out in five provinces (Salamanca, Ávila, Zamora, Valladolid, and Cáceres) in western Spain (41°13'46"N, 5°29'48"W). Red foxes are hunted for predator population control under licenses authorized by the regional governments of the autonomous communities of Castile and León and of Extremadura (Law 9/2019, of 28 March, amending Law 4/1996, of 12 July, on Hunting in the Autonomous Community of Castile and León; Law 14/2010, of 9 December, on Hunting in Extremadura). A total of 1936 legally hunted or road-killed red foxes were harvested from 2016 to 2018. Thus, the animals were not euthanized specifically for this study, and no ethics committee approval was necessary. The approximate age of the individuals was determined by analysis of the dental formula (Saenz de Buruaga et al. 1991), differences in harvest date from the most probable date of birth (foxes in the Mediterranean area produce cubs during the spring; Voigt and Macdonald 1984; Zapata et al. 1997), and the external appearance of the fox based on researcher experience. Animals were classified as young (under 1 yr old), subadults (between 1 and 2 yr old), and adults (more than 2 yr old).

Foxes were necropsied in the field and systematically examined to assess visible lesions of *Spirocerca* spp. in gastric walls and abdominal and thoracic organs. A total of 163 had *Spirocerca* spp.-like compatible lesions. Of these, 71 animals without autolysis were selected, with one nodule being examined per fox.

Nodules ($n=71$) were measured with a caliper to determine their macroscopic size. For a good understanding and statistical evaluation, three ranges were established for nodule sizes: <1.2 cm, >1.2 and <3 cm, and >3 cm.

Spirocerca species identity

Genomic DNA from individual specimens was isolated using an NZY tissue gDNA kit (NZYTech, Lisbon, Portugal). Amplification

of DNA was performed as described for *Spirurida* spp. (Casiraghi et al. 2001). From each sample, PCR products amplified were purified and sequenced by STABvida (Monte da Caparica, Portugal) in forward and reverse senses, using the same primers as for the PCR. Sequences were edited in Chromas Lite 2.1.1 (Technelysium, Queensland, Australia), and consensus sequences for each forward-reverse pair were created in BioEdit, using CLUSTAL-W version 2.0 (University College Dublin, Dublin, Ireland). Obtained sequences with more than 600 bp ($n=20$) were subjected to Basic Local Alignment Search Tool nucleotide (BLASTn) analyses (National Center for Biotechnology Information 2020). The identity at the species level was based on sequence homology both taking into consideration the higher similarity in the BOLD Systems identification tool (BOLD Systems 2020) and with the BLASTn tool of the sequences deposited in GenBank (Benson et al. 2005).

Histopathology

Nodules ($n=71$) were fixed in neutral buffered formalin (3.5%, 0.1 M, and pH 7.2), routinely processed, and embedded in paraffin wax. Five-micron sections were stained with H&E to assess the microscopic changes (necrosis, hemorrhages, and collagen) and to count eosinophils and neutrophils. Microphotographs were taken using a microscope (Eclipse 80i, Nikon, Tokyo, Japan) with a digital camera (DXMI200F, Nikon).

Samples were analyzed by two different pathologists using a light microscope (20× magnification). Lesion classification was performed according to cell distribution. Lesions were classified as diffuse when a widespread pattern was observed. Lesions were classified as patchy if the cell distribution was focal or multifocal. When both patterns (patchy and diffuse) were observed in the same sample, it was classified as a mixed lesion.

Immunohistochemistry

Ten samples of each type of lesion (patchy and diffuse) were selected for immunohistochemical analysis as well as 10 control samples

taken from the gastric walls of noninfected foxes. Only two samples had mixed lesions; these were not analyzed by IHC, due to extensive autolysis.

Avidin-biotin complex (ABC Vector Elite, Vector Laboratories, Burlingame, USA) was used for immunolabeling. All samples were dewaxed in an oven, rehydrated, and then treated in 3% hydrogen peroxide in methanol for 15 min to quench the peroxidase activity. Samples were washed with tris-buffered saline (TBS) 0.01 M and pH 7.2. Antigen retrieval methods included enzymatic digestion with trypsin/alpha-chymotrypsin (0.5% trypsin and 0.5% alpha-chymotrypsin, Sigma-Aldrich, Gillingham, Dorset, UK) at 37 C for 10 min or heat-treated by microwave using tris-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) pH 9.0; 20 min, and 700 W. Samples were then mounted on a Sequenza immunostaining center (Shandon Scientific, Runcorn, UK). Primary antibody cross-reactivity with tissue constituents was prevented by using 1.5% normal serum block, which matched the host species of the link antibody that was applied to the sections for 20 min. Details of the primary antibodies used, their specificity, concentration, and incubation time are summarized in Table 1. Sections were washed in TBS and then incubated for 30 min with the appropriate biotinylated secondary link antibody (Vector Laboratories), previously washed twice in TBS. After 30 min of incubation at room temperature with avidin-biotin complex (Vector Elite Kit, Vector Laboratories), the signal was detected using 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma-Aldrich) and lightly counterstained with Mayer's hematoxylin (Surgipath, Peterborough, UK) for 5 min.

Scoring and data analysis

To establish a semiquantitative score, microphotographs were taken in 20 nonoverlapping, randomly selected fields. Necrosis, hemorrhages, and collagen in the fields were scored from 0 to 3 (0=absent; 1=<33% presence; 2=33–66% presence; 3=>66% presence). The number of neutrophils and eosin-

TABLE 1. Primary antibodies, antigen retrieval, concentration, and incubation time used for the immunohistochemistry technique in *Spirocerca*-positive nodules of red foxes (*Vulpes vulpes*) naturally infected with *Spirocerca* sp.

Target	Specificity	Antigen retrieval	Dilution	Incubation
Human CD3	T-cell marker (polyclonal rabbit antihuman) ^a	Trypsin/ α -chymotrypsin	1/500	Overnight
Human CD79 α	B-cell marker (clone HM57; monoclonal mouse antihuman) ^a	Microwave buffer tris-EDTA ^b	1/100	1 h at room temperature
Human CD68	Macrophages and monocytes (clone 514H12; monoclonal mouse antihuman) ^c	Microwave buffer tris-EDTA	1/100	1 h at room temperature

^a Source: DAKO (Glostrup, Denmark).

^b EDTA = tris-ethylenediaminetetraacetic acid.

^c Source: Bio-Rad AbD Serotec (Puchheim, Germany).

ophils (by H&E) was scored from 0 to 3 (0=absent; 1=minimal number of cells [$<33\%$]; 2=moderate number of cells [between 33% and 66%]; 3=high number of cells [$>66\%$]). Finally, the infiltrate intensity of immunolabeled cells (T and B lymphocytes and macrophages or monocytes) was scored according to Dvir et al. (2011): 0=scant or absent; 1=positive cells evident but not in all fields; 2=positive cells present in all fields but markedly fewer in number than other cells; 3=positive cells in all fields and more predominant than other cells.

Differences in prevalence and distribution of the cell types was tested using the chi-square test. The differences between the scores of the different types of infiltrate were analyzed using a Kruskal-Wallis test. P values <0.05 were considered significant.

RESULTS

In the 163 *Spirocerca*-positive red foxes, the main location for grossly visible nodules was the stomach (96.9%; Fig. 1A). Gastric wall nodules were present in 118 foxes (72.4%). Nodules in both the gastric wall and gastric omentum were found in 40 animals (24.5%), while five foxes had nodules only in the small intestine wall (3.1%). No other location was noted. Nematode larvae were present in 96.3% of the nodules. *Spirocerca*-positive nodules were significantly more abundant in

young animals (50.3%) than in subadults (34.4%) or adults (15.3%; $P<0.05$).

Following PCR, using BLAST analysis, identity with *S. vulpis* oscillated between 99.5% and 100% with the *cox1* sequences of *Spirocerca* sp. from a naturally infected red fox in 2014 (e.g., GenBank accession numbers KJ605489.1 and KJ605487.1) and between 99.3% and 100% with the newly described species of *S. vulpis* in 2018 (e.g., GenBank nos. MH634016.1 and MH633993.1). The identities with the reference sequence for *S. lupi* (GenBank no. MF403001.1) were always below 93%. When submitted to the BOLD System identification tool, all sequences presented more than 99% similarity with *S. vulpis* sequences. Thus, all our samples are considered *S. vulpis*.

The mean size of the nodules was 2.21 cm. The percentiles of the data collected were as follows: 25% 1.19 cm, 50% 2.56 cm, and 75% 3.24 cm; 29.7% of nodules had a diameter less than 1.2 cm, 26.1% were between 1.2 and 3 cm, and 44.2% were larger than 3 cm. A t -test for paired samples was conducted to compare nodule size and the observed number of adult worms. More nematodes were seen in the largest nodules compared to the smaller ones ($P<0.05$).

Mitosis was insignificant in all observed fields; similarly, giant cells were very rare. Overall, 21.1% of the nodules had patchy distribution (Fig. 1B), 76.1% had diffuse

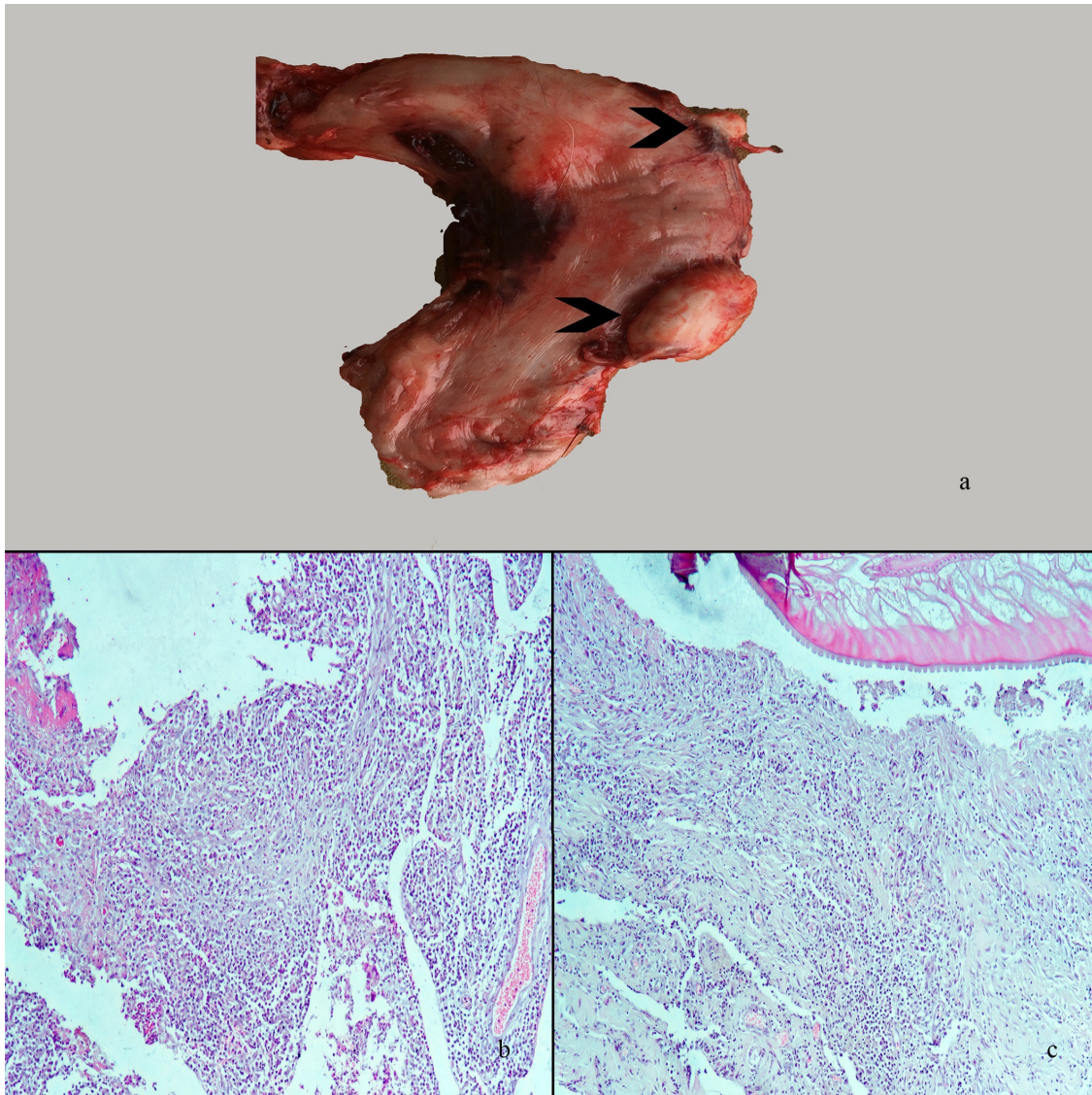


FIGURE 1. Spirocercosis-induced lesions in naturally infected red foxes (*Vulpes vulpes*) from western Spain. (A) Macroscopic findings of two nodules in gastric wall (arrowheads). (B) Microscopic diffuse lesions (10 \times). (C) Microscopic patchy lesions (10 \times).

distribution (Fig. 1C), and 2.8% had mixed forms. Significant differences were not found between the size of the nodule and the type of lesion ($P=0.57$).

A lymphoplasmacytic cell infiltrate occurred in diffuse lesions. Hemorrhages were scarce (score of 0 in 54% of fields), and no significant differences were found in diffuse lesions versus patchy lesions (Table 2). In diffuse lesions, the presence of collagen was low (score of 0–1 in 71% of fields), and necrosis was observed in a low-moderate

proportion (score of 1–2 in >61% of fields; Table 2). Neutrophils were evident (score of 1 in 80% of fields) in diffuse lesions but significantly fewer than in the patchy lesions ($P=0.017$). Eosinophils were present in low-moderate numbers and few macrophages were present (Table 3).

Patches lesions were characterized by a focal or multifocal presentation of lymphoplasmacytic cell infiltrate. An infiltrate of neutrophils (score of 2–3 in 80% of fields) and macrophages was observed, mostly

TABLE 2. Number and frequency scores for histologic variables in diffuse ($n=54$) and patchy ($n=15$) *Spirocerca*-associated gastric lesions in red foxes (*Vulpes vulpes*). Score ranged from 0 to 3 (0: Absent; 1: present in <33% of fields; 2: present in 33–66% of fields; 3: present in >66% of fields); 20 microscope fields examined per lesion.

Variable ^a	Score, n (%)				P value ^b
	0	1	2	3	
Necrosis					>0.05
D	20 (37)	26 (48)	7 (13)	1 (2)	
P	9 (60)	5 (33)	1 (7)	0 (0)	
Hemorrhages					>0.05
D	29 (54)	21 (39)	4 (7)	0 (0)	
P	12 (80)	3 (20)	0 (0)	0 (0)	
Collagen					<0.05
D	10 (19)	28 (52)	15 (28)	1 (2)	
P	1 (7)	4 (26)	1 (7)	9 (60)	

^a D = diffuse lesion ; P = patchy lesion.

^b Differences were considered significant when $P < 0.05$.

around the nematodes. Eosinophils were present in moderate number (score 2 in 70% of fields) in the patchy lesions; this was not significantly different from diffuse lesions (Table 3). Collagen and fibrocytes occurred in many samples (score of 3 in 60% of fields) with significant differences in collagen versus diffuse lesions ($P < 0.05$). No active or binucleated fibroblasts were noted. Binucleate cells were seen, most of which were lymphocytes (Fig. 2A) but also macrophages (Fig. 2B). In addition, the presence of necrosis was found in a low proportion of lesions (score of 0–1 in 93% of fields), located around the parasite. Hemorrhages were very rare (score of 0 in 80% of fields; Table 2).

With respect to the CD3+ marker, significant differences could be appreciated between the types of lesions ($P < 0.05$). In the patchy group, this marker was reported as the predominant positive cell type (score of 3 in 50% of fields). However, its presence was minimal and not predominant in the diffuse lesions (Table 3 and Fig. 3A).

Positive CD79 α cells (B lymphocytes) were present but not in all fields. A significant difference ($P = 0.028$) was observed in the number of CD79 alpha cells between groups,

TABLE 3. Frequency scores for the CD3 marker (T cells), CD79 α marker (B cells), and CD68 marker (macrophages and monocytes) and for eosinophils and neutrophils in patchy ($n=10$) and diffuse ($n=10$) lesions in gastric nodules with *Spirocerca vulpis* infection in red foxes (*Vulpes vulpes*).

Marker and cells ^a	Score (%)				P value ^b
	0	1	2	3	
CD3 ^c					<0.05
D	0	60	40	0	
P	0	10	40	50	
CD79 α ^c					<0.05
D	70	30	0	0	
P	20	80	0	0	
CD68 ^c					>0.05
D	10	60	30	0	
P	20	30	50	0	
Eosinophils ^d					>0.05
D	20	30	30	20	
P	0	20	70	10	
Neutrophils ^d					<0.05
D	0	80	10	10	
P	0	20	50	30	

^a D = diffuse lesion ; P = patchy lesion.

^b The significance value was set at $P < 0.05$.

^c Immunohistochemical score: 0=scant or absent; 1=positive cells evident but not in all fields; 2=positive cells present in all fields but markedly fewer in number than other cells; 3=positive cells in all fields and more predominant than other cells.

^d Histologic score: 0=absent; 1=minimal number of cells; 2=moderate number of cells; 3=high number of cells.

being more numerous in the patchy lesions (score of 1 in 80% of fields) than in the diffuse lesions (70%, score of 0; Table 3 and Fig. 3B).

The CD68 macrophage marker represented the lowest percentage of stained cells in all samples. No significant differences were recorded for the CD68 macrophage marker between the two types of lesions, but it was more evident in the patchy group (score of 2 in 50% of fields; Table 3 and Fig. 3C).

DISCUSSION

Nodules of *S. vulpis* were primarily found in the gastric area in the red fox, differing from the main tropism of *S. lupi* in dogs, with adults found in nodules in the esophageal wall (Mazaki-Tovi et al. 2002). Our results are

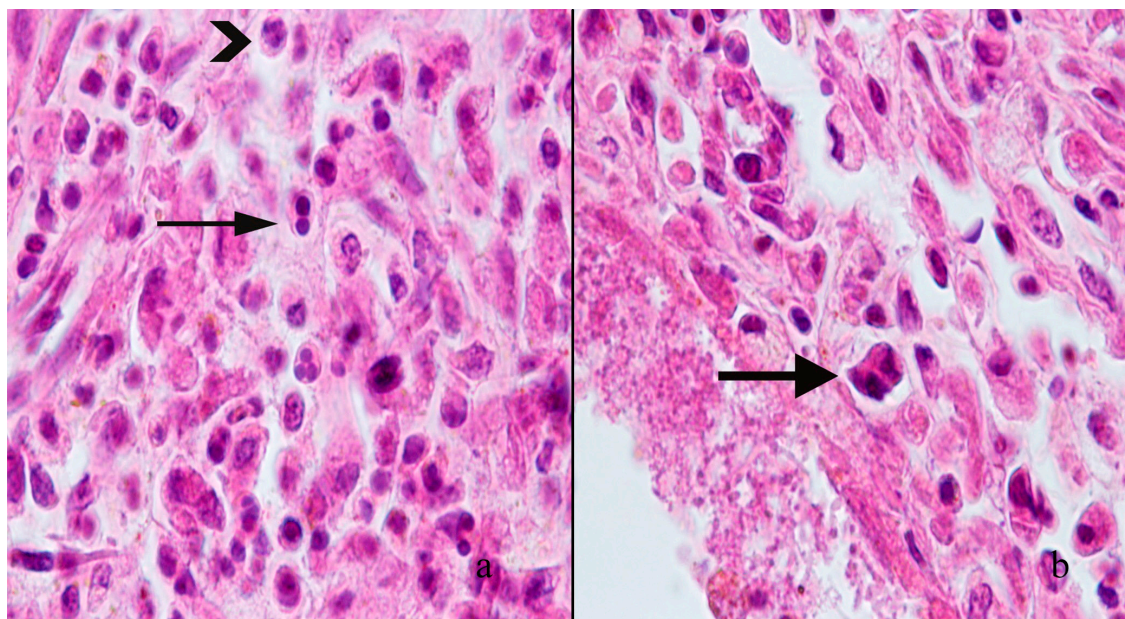


FIGURE 2. Spirocercosis-induced lesions in naturally infected red foxes (*Vulpes vulpes*) from western Spain. (A) A cell in mitosis (arrowhead) and binucleated lymphocyte (arrow) are visible; (b) a binucleated macrophage (arrow) is visible. H&E stain.

partially consistent with other studies (e.g., Ferrantelli et al. 2010; Al-Sabi et al. 2014; Rojas et al. 2018b; Valcárcel et al. 2018). Previous studies did not find nodules in the gastric omentum or in the intestinal wall; however, we did not find lesions in the pericardium, aorta (Morandi et al. 2014; Rojas et al. 2018b), or lymph nodes (Reina et al. 1994). In jackals (*Canis mesomelas*), nodules were also found in the thoracic aorta, while gastric wall lesions were uncommon (Bumby et al. 2017). In dogs, aberrant migrations of *S. lupi* L3 occur through the mesenteric arteries, leading to small or large intestinal infarction (Brenner et al. 2020), and aberrant larval migration towards the central nervous system may cause serious neurological manifestation (Rojas et al. 2019). *Spirocercas vulpis* L3 also follow the route of the mesenteric arteries, modifying the typical life cycle, until reaching locations in the omentum, intestine, or gastric wall. In our study, we did not observe mesenteric multifocal necrotizing eosinophilic arteritis in these places. We found the greatest number of *S. vulpis* worms in the gastric wall, forming a nodule communicating with the gastric lumen through an operculum, unlike

aberrant migration to the intestine (Brenner et al. 2020).

Al-Sabi et al. (2014) hypothesized that the atypical locations could relate to genetic differences between several haplotypes of *S. lupi*. The species *S. vulpis* seems better adapted to the red fox, resulting in development of nodules located in the gastric wall (Rojas et al. 2018b). However, additional studies are needed to understand the relationship between different *Spirocercas* spp. subspecies and the lesions found in foxes.

The size of the nodules found in our studies is similar to those described previously (Sanchís-Monsonis et al. 2019; Rojas et al. 2018b; Valcárcel et al. 2018) and is associated with the number of confined adults.

Recent studies described the presence of *S. lupi* (Brenner et al. 2020) in dogs from the age of 6 mo. We observed *S. vulpis* infestation in different ages of foxes, but the highest incidence occurred in young animals, despite the 140–161 day cycle after infection.

In the absence of mitosis and giant cells, all the lesions were classified as nonneoplastic, unlike those in spirocercosis in dogs (van der Merwe et al. 2008; Dvir et al. 2011).

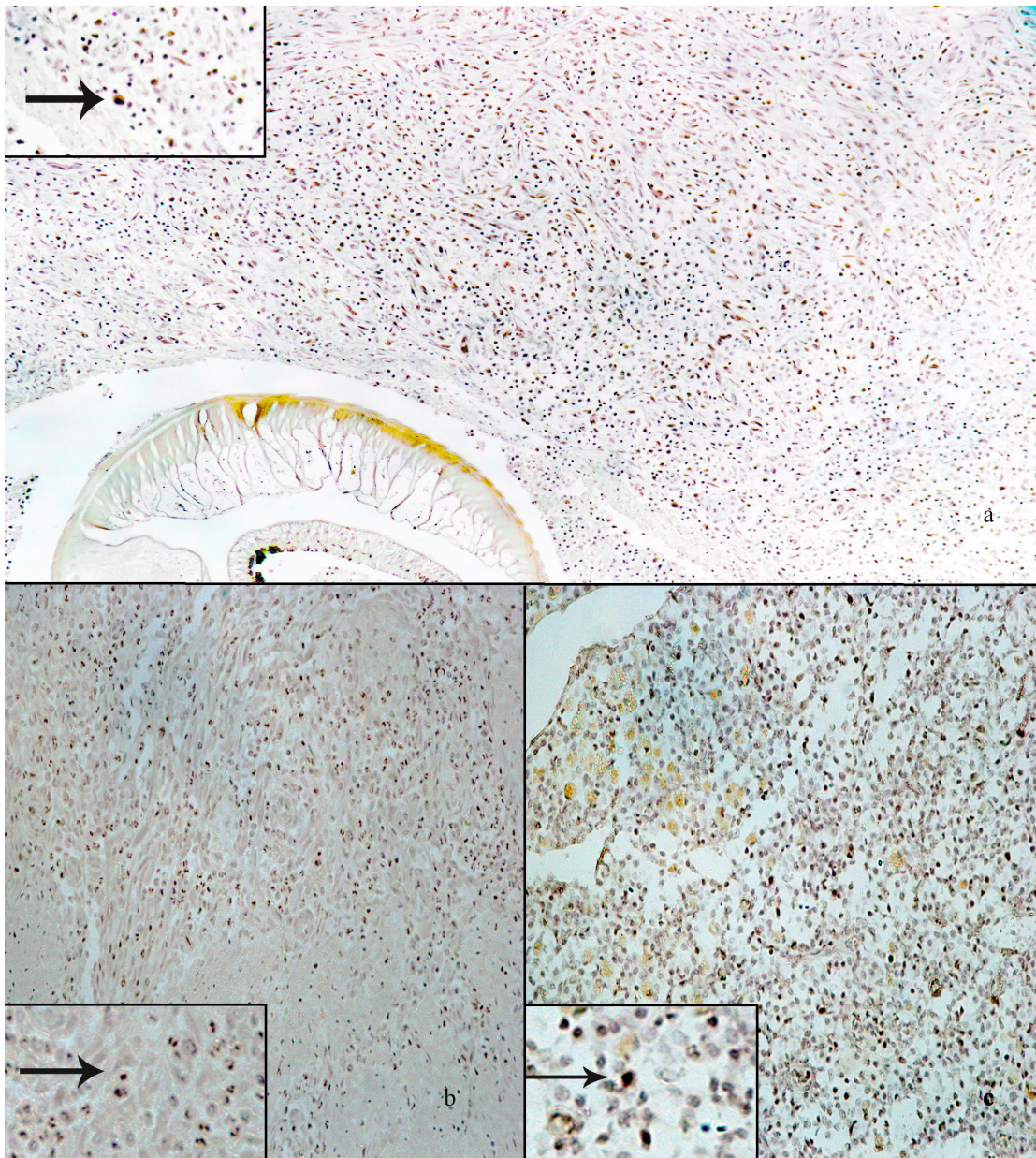


FIGURE 3. Immunohistochemistry findings of the different cell populations within spirocercosis-induced lesions in red foxes (*Vulpes vulpes*) from western Spain. (A) CD3 marker (T cells) in a diffuse lesion (10×); T cell labeled (arrow) at higher resolution (100×) around a *Spirocerca vulpis* parasite (asterisk). (B) CD79 α marker (B cells) in a diffuse group (10×); B cell labeled (arrow) at higher magnification (100×) located in foci in diffuse lesions. (C) CD68 marker (macrophages and monocytes) in a patchy lesion (10×); monocyte (arrow) at higher resolution (100×); although not predominant in this field, they prevail over other types of cells.

Preneoplastic lesions in dogs had moderate to severe lymphoplasmacytic infiltrate and collagen (Dvir et al. 2010); Rojas et al. (2019) suggest that the nodule progresses from an inflammatory fibrocytic lesion to a preneoplastic nodule characterized by the presence

of active fibroblasts that may eventually undergo neoplastic transformation to sarcoma.

In our study, the predominant cells were lymphocytes, neutrophils, and, to a lesser extent, plasma cells and macrophages. Studies in dogs have highlighted the presence of

leukocytosis as a significant finding (Mylonakis et al. 2001), and a severe infiltrate of eosinophils has been reported (Brenner et al. 2020). In diffuse lesions, other cell types prevailed over eosinophils. The presence of eosinophils is associated with parasitic reactions, along with the capacity or capability for vasopermeability, facilitating the arrival of other cells to the inflammation foci.

We found a high presence of neutrophils in the nodules. Dvir et al. (2010) found that in 40% of nonneoplastic cases the inflammatory infiltrate was predominantly lymphoplasmacytic, in 24% of cases lymphocytes and neutrophils were mixed, and in 21% of cases neutrophils predominated, compared to 25%, 5%, and 70%, respectively, in the neoplastic cases. Myeloid cells and especially neutrophils play a major role in the innate local inflammatory response in the spirocercosis-induced nodule in dogs (Dvir et al. 2010). Neutrophils mediate tissue damage through the release of cytokines, proteases, and other factors contained in their cytoplasmic granules and by regulating the activity of the adaptive immune response, including both T- and B-cell activation (Appelberg 2007; Kobayashi 2008; de Oliveira et al. 2016).

Necrosis was present in a low to moderate proportion in the diffuse lesions and a smaller presence in the patchy forms. The destruction of tissue that occurs in the invasive phase of large parasites, as described by Jubb et al. (2015), could be associated with necrosis in the initial lesions during invasion of *S. vulpis* in the red fox. In the diffuse lesions, the hemorrhages occur in the esophagus of dogs due to the rupture of blood vessels (Head et al. 2002). Both necrosis and hemorrhages are slightly more evident in diffuse lesions than in patchy lesions in foxes, but no significant differences were found in the statistical analysis.

*Spirocerc*a lesions had not previously been characterized using immunolabeling in foxes. We observed an increase in the number of T cells over B cells. However, it was not possible to differentiate between CD4 and CD8 T cells, as this requires frozen samples, which we could not obtain. Immunolabeled T cells

in the patchy group demonstrated their important role in the development of more homogeneous lesions associated with a coordinated immune response between different cell populations (Ulrichs et al. 2004; García-Jiménez et al. 2013). More studies are necessary to determine the implications of the regulatory T lymphocytes in the development of the lesion in foxes, as in dogs (Dvir et al. 2010). Such cells, along with their mediators, could play an important role in the development of the *Spirocerc*a-associated lesions (Dvir et al. 2010).

The low presence of B lymphocytes in both patchy and diffuse lesions indicate early stages of lesion development. These cells are required for the development of chronic stages, including the possible induction of carcinogenesis (Cain et al. 2009).

The importance of inflammation of macrophages in the development of *S. lupi* lesions was described by Dvir et al. (2011). We observed these cells in patchy lesions but not in all fields. Macrophages may take part in the remodeling of the lesion. Lower numbers of these cells is associated with a greater presence of collagen. The CD68 marker was used as a macrophage marker, although a specific marker such as MAC387 could have been contrasted. For economic reasons, only the CD68 was used since, in our group's experience, we have found a high similarity with MAC387 and with other macrophage markers.

Neoplastic lesions have been seen in dogs (Dvir et al. 2010, 2011) and in mice (xenograft model; Stettner et al. 2005). However, we did not observe these. These foxes are subjected to high hunting pressure, thus it is possible that these animals are harvested before tumor development.

Similar studies (Dvir et al. 2011) indicated the need for molecular research (e.g., interleukins and chemokines) to analyze the development and evolution of the lesion caused by this parasite in foxes. Experimental studies are needed to categorize the possible evolution (or nonevolution) toward the typical tumoral forms induced in various anatomical regions. The lesional pattern based on implied

cells points to an initial stage with a diffuse disposition and a later patchy evolution, which may help the animal control the inflammatory process.

In summary, the pathology of *S. vulpis* differs from that observed in *S. lupi*-infected dogs. It appears, based on changes in inflammatory cells and the presence of collagen, that *S. vulpis* lesions in the red fox progress from a diffuse to a patchy distribution, possibly through the control of the parasite infestation by the host.

This research was partially supported by grant GR18148 funded by the Regional Ministry of Economy and Infrastructure, Extremadura Government, and the European Regional Development Fund “A way to make Europe” and by the grant “Ayudas a grupos de la Universidad de Extremadura.”

LITERATURE CITED

- Al-Sabi MNS, Hansen MS, Chriél M, Holm E, Larsen G, Enemark HL. 2014. Genetically distinct isolates of *Spirocerca* sp. from a naturally infected red fox (*Vulpes vulpes*) from Denmark. *Vet Parasitol* 205: 389–396.
- Appelberg R. 2007. Neutrophils and intracellular pathogens: Beyond phagocytosis and killing. *Trends Microbiol* 15:87–92.
- Bailey WS. 1972. *Spirocerca lupi*: A continuing inquiry. *J Parasitol* 58:3–22.
- Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Wheeler DL. 2005. GenBank. *Nucleic Acids Res* 33(Suppl 1): D34–D38.
- BOLD Systems. 2020. BOLD Systems identification tool. http://www.boldsystems.org/index.php/IDS_OpenIdEngine. Accessed August 2020.
- Brenner OJ, Botero-Anug AM, Rojas A, Hahn S, Baneth G. 2020. Aberrant mesenteric migration of *Spirocerca lupi* larvae causing necrotizing eosinophilic arteritis, thrombosis, and intestinal infarction in dogs. *Vet Pathol* 57:281–285.
- Bumby MM, Williams MC, Steyl JCA, Harrison-White R, Lutermann H, Fosgate GT, de Waal PJ, Mitha J, Clift SJ. 2017. Genotyping and comparative pathology of *Spirocerca* in black-backed jackals (*Canis mesomelas*) in South Africa. *BMC Vet Res* 13:Article 245.
- Cain D, Kondo M, Chen H, Kelsoe G. 2009. Effects of acute and chronic inflammation on B-cell development and differentiation. *J Invest Dermatol* 129:266–277.
- Casiraghi M, Anderson TJC, Bandi C, Bazzocchi C, Genchi C. 2001. A phylogenetic analysis of filarial nematodes: Comparison with the phylogeny of *Wolbachia* endosymbionts. *Parasitology* 122:93–103.
- de Oliveira S, Rosowski EE, Huttenlocher A. 2016. Neutrophil migration in infection and wound repair: Going forward in reverse. *Nat Rev Immunol* 16:378–391.
- Diakou A, Karamanavi E, Eberhard M, Kaldrimidou E. 2012. First report of *Spirocerca lupi* infection in red fox *Vulpes vulpes* in Greece. *Wildl Biol* 18:333–336.
- Dvir E, Clift SJ, Williams MC. 2010. Proposed histological progression of the *Spirocerca lupi*-induced oesophageal lesion in dogs. *Vet Parasitol* 168:71–77.
- Dvir E, Kirberger RM, Malleczek D. 2001. Radiographic and computed tomographic changes and clinical presentation of spirocercosis in the dog. *Vet Radiol Ultrasound* 42:119–129.
- Dvir E, Schoeman JP, Clift SJ, McNeilly TN, Mellanby RJ. 2011. Immunohistochemical characterization of lymphocyte and myeloid cell infiltrates in spirocercosis-induced oesophageal nodules. *Parasite Immunol* 33:545–553.
- Ferrantelli V, Riili S, Vicari D, Percipalle M, Chetta M, Monteverde V, Gaglio G, Giardina G, Usai F, Poglajen G. 2010. *Spirocerca lupi* isolated from gastric lesions in foxes (*Vulpes vulpes*) in Sicily (Italy). *Pol J Vet Sci* 13:465–471.
- García-Jiménez WL, Salguero FJ, Fernández-Llario P, Martínez R, Risco D, Gough J, Ortiz-Peláez A, Hermoso-de-Mendoza J, Gómez L. 2013. Immunopathology of granulomas produced by *Mycobacterium bovis* in naturally infected wild boar. *Vet Immunol Immunopathol* 156:54–63.
- Head KW, Else RW, Dubielzig RR. 2002. Tumors of the alimentary tract. In: *Tumors in domestic animals*, 4th Ed., Meuten DJ, editor. Iowa State Press, Ames, Iowa, pp. 401–481.
- Jubb KV, Kennedy PC, Palmer N. 2015. *Pathology of domestic animals*. Vol. II, 2nd Ed. Academic Press, San Diego, California, 782 pp.
- Kobayashi Y. 2008. The role of chemokines in neutrophil biology. *Front Biosci* 13:2400–2407.
- Lobetti RG. 2000. Survey of the incidence, diagnosis, clinical manifestations and treatment of *Spirocerca lupi* in South Africa. *J S Afr Vet Assoc* 71:43–46.
- Lora-Michiels M, Biller DS, Olsen D, Hoskinson JJ, Kraft SL, Jones JC. 2003. The accessory lung lobe in thoracic disease: A case series and anatomical review. *J Am Anim Hosp Assoc* 39:452–458.
- Martín-Pérez M, Lobo JM, Pérez-Martín JE, Bravo-Barriga D, Galapero J, Frontera E. 2020. Occurrence, prevalence, and explanatory environmental variables of *Spirocerca vulpis* infestation in the foxes of western Spain. *Parasitol Res* 119:973–983.
- Mazaki-Tovi M, Baneth G, Aroch I, Harrus S, Kass PH, Ben-Ari T, Zur G, Aizenberg I, Bark H, Lavy E. 2002. Canine spirocercosis: Clinical, diagnostic, pathologic, and epidemiologic characteristics. *Vet Parasitol* 107: 235–250.
- Morandi F, Angelico G, Verin R, Gavaudan S. 2014. Fatal spirocercosis in a free-ranging red fox. *Vet Rec* 174: 228.

- Mylonakis ME, Koutinas AF, Liapi MV, Saridomichelakis MN, Rallis TS. 2001. A comparison of the prevalence of *Spirocerca lupi* in three groups of dogs with different life and hunting styles. *J Helminthol* 75:359–361.
- National Center for Biotechnology Information. 2020. Basic local alignment search tool. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Accessed August 2020
- Ranen E, Dank G, Lavy E, Perl S, Lahav D, Orgad U. 2008. Oesophageal sarcomas in dogs: Histological and clinical evaluation. *Vet J* 178:78–84.
- Ranen E, Lavy E, Aizenberg I, Perl S, Harrus S. 2004. Spirocercosis-associated esophageal sarcomas in dogs: A retrospective study of 17 cases (1997–2003). *Vet Parasitol* 119:209–221.
- Reina C, Carrascoso JM, Perez-Martin E, Navarrete I, Perez-Martin E, Gijón Botella H, López-Román R. 1994. Spirocercosis ganglionar. Ectopic localization in canis in the province of Caceres (Spain). *Acta Veterinaria* 8–9:13–19.
- Rojas A, Deplazes P, Baneth G. 2020. Unravelling *Spirocerca vulpis* from red foxes from Switzerland: A 20-year-old record. *Parasitol Res* 119:3105–3108.
- Rojas A, Dvir E, Baneth G. 2019. Insights on *Spirocerca lupi*, the carcinogenic dog nematode. *Trends Parasitol* 36:52–63.
- Rojas A, Dvir E, Farkas R, Sarma K, Borthakur S, Jabbar S, Markovics A, Otranto D, Baneth G. 2018a. Phylogenetic analysis of *Spirocerca lupi* and *Spirocerca vulpis* reveal high genetic diversity and intra-individual variation. *Parasites Vectors* 11:Article 639.
- Rojas A, Sanchis-Monsonís G, Alić A, Hodžić A, Otranto D, Yasur-Landau D, Martínez-Carrasco C, Baneth G. 2018b. *Spirocerca vulpis* sp. nov. (Spiruridae: Spirocercidae): Description of a new nematode species of the red fox, *Vulpes vulpes* (Carnivora: Canidae). *Parasitology* 145:1917–1928.
- Saenz de Buruaga M, Lucio AJ, Purroy F. 1991. *Reconocimiento de sexo y edad en especies cinegéticas*. Dtacn., Foral de Alava, Spain. 127 pp.
- Sanchís-Monsonís G, Fanelli A, Tizzani P, Martínez-Carrasco C. 2019. First epidemiological data on *Spirocerca vulpis* in the red fox: A parasite of clustered geographical distribution. *Vet Parasitol Reg Stud Reports* 18:Article 100338.
- Segovia JM, Miquel J, Feliu C, Torres J. 2001. Morphological and morphometric study of *Spirocerca lupi*. *Helminthologia* 38:115–121.
- Stettner N, Ranen E, Dank G, Lavy E, Aroch I, Harrus S, Brenner O, Harmelin A. 2005. Murine xenograft model of *Spirocerca lupi*-associated sarcoma. *Comp Med* 55:510–514.
- Ulrichs T, Kosmiadi GA, Trusov V, Jörg S, Pradl L, Titukhina M, Mishenko V, Gushina N, Kaufmann SHE. 2004. Human tuberculous granulomas induce peripheral lymphoid follicle-like structures to orchestrate local host defence in the lung. *J Pathol* 204: 217–228.
- Valcárcel F, González J, Aguilar A, Sánchez M, González MG, Suárez R, Tercero AM, Tercero JM, Nieto JM, González-Guirado AM, et al. 2018. Spirocercosis in red fox (*Vulpes vulpes*) in a natural reserve located in a meso-Mediterranean area. *Vet Parasitol Reg Stud Reports* 13:115–119.
- van der Merwe LL, Kirberger RM, Clift S, Williams M, Keller N, Naidoo V. 2008. *Spirocerca lupi* infection in the dog: A review. *Vet J* 176:294–309.
- Voigt DR, Macdonald DW. 1984. Variation in the spatial and social behaviour of the red fox (*Vulpes vulpes*). *Acta Zool Fenn* 171:261–265.
- Zapata SC, Travaini A, Delibes M. 1997. Reproduction of the red fox *Vulpes vulpes* in Doñana, Southern Spain. *Mammalia* 61:628–631.

Submitted for publication 4 September 2020.

Accepted 11 June 2021.

5.1.3.- First detection of *Gongylonema* species in *Geotrupes mutator* in Europe

Daniel Bravo-Barriga^{1*}, Manuel Martín-Pérez^{1*}, Jorge M. Lobo², Ricardo Parreira³, Juan Enrique Pérez-Martín¹ and Eva Frontera¹

¹ Parasitology Area, Department of Animal Health, Veterinary Faculty, University of Extremadura, Cáceres, Spain.

² Department of Biogeography and Global Change, Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC, Madrid, Spain.

³ Global Health and Tropical Medicine (GHTM), Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), Universidade Nova de Lisboa (UNL), Grupo de Virología/Unidade de Microbiología Médica, Lisbon, Portugal.

*Daniel Bravo-Barriga y Manuel Martín-Pérez contribuyeron por igual en la elaboración de este trabajo.

Journal of Nematology 2021. Vol. 53

DOI: 10.21307/jofnem-2021-050

Factor de impacto (2019-2020) 1.47

Artículo publicado on-line en acceso abierto

Resumen.

La detección de tres larvas infectantes de *Gongylonema* sp., en dos especímenes del escarabajo *Geotrupes mutator* (Marsham, 1802), capturados en una zona del oeste español, se describe aquí por primera vez en Europa. La técnica de microscopía electrónica de barrido confirmó que los especímenes analizados pertenecieron al género *Gongylonema*, pero no fue posible determinar la identidad de la especie concreta, debido a la falta de información morfológica en la literatura respecto a este género y porque muchos de las características fenotípicas aún no se habían desarrollado completamente al ser larvas juveniles. Sin embargo, un análisis filogenético usando secuencias de nucleótidos amplificadas de la región cox 1, reveló que las larvas estudiadas podrían ser claramente discriminadas (< 89% de identidad) de todas las demás secuencias de cox1 de *Gongylonema* disponibles en bases de datos genéticas públicas. Mientras que nuestros resultados están limitados por la escasez de información genética disponible para este género, la posibilidad de que los especímenes analizados se pudieran corresponder a una nueva especie no debe descartarse, por lo que serían necesarios más estudios para confirmar esta hipótesis. Los resultados proporcionados en esta investigación indican que *G. mutator* está involucrado en el ciclo de transmisión de *Gongylonema* spp. en Europa.

First detection of *Gongylonema* species in *Geotrupes mutator* in Europe

Daniel Bravo-Barriga¹,
Manuel Martín-Pérez^{1,*},
Jorge M. Lobo², Ricardo Parreira³,
Juan Enrique Pérez-Martín¹
and Eva Frontera¹

¹Parasitology Area, Department of Animal Health, Veterinary Faculty, University of Extremadura, Cáceres, Spain.

²Department of Biogeography and Global Change, Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC, Madrid, Spain.

³Global Health and Tropical Medicine (GHTM), Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), Universidade Nova de Lisboa (UNL), Grupo de Virologia/Unidade de Microbiologia Médica, Lisbon, Portugal.

*E-mail: mmartinly@alumnos.unex.es

Daniel Bravo-Barriga and Manuel Martín-Pérez contributed equally to this work.

This paper was edited by Zafar Ahmad Handoo.

Received for publication October 07, 2020.

Abstract

The detection of three *Gongylonema* sp. infective larvae in two specimens of the dung beetle *Geotrupes mutator* (Marsham, 1802) from western Spain is reported here for the first time in Europe. Scanning electron microscopy confirmed that the analyzed specimens belong to the genus *Gongylonema*, but it was not possible to determine the species identity by the lack of morphological information in the literature and because many of the phenotypic characteristics had not yet fully developed at this juvenile stage. Nevertheless, a phylogenetic analysis using amplified *cox1* nucleotide sequences has revealed that the studied larvae could be clearly discriminated (<89% identity) from all the other *Gongylonema cox1* sequences available in public genetic databases. While our results are limited by the scarcity of genetic information available for this genus, the possibility that the analyzed specimens might correspond to a new species should not be ruled out, and more studies are needed. The results provided in this report indicate that *G. mutator* is involved in the transmission cycle of *Gongylonema* sp. to vertebrates in Europe.

Keywords

Beetles, *Geotrupes*, *Gongylonema*, Host-parasitic relationship, Molecular biology, Nematodes, Spain.

Under the functional name of “dung beetles”, approximately 9,500 worldwide species have been grouped into the Aphodiinae, Scarabaeinae, and Geotrupinae subfamilies of the superfamily Scarabaeoidea (Löbl and Smetana, 2016). Dung beetles are considered the most important agents promoting the recycling of mammal faeces in terrestrial ecosystems. They contribute to the nitrification and aeration of the soil, seed dispersal, and the control of fly and cattle parasites (Nichols et al., 2008). However, as dung beetle species are in close contact with animal and human faeces, they may also act as hosts for a

wide variety of pathogenic bacteria and/or viruses, as well as eukaryotic parasites favouring their dispersion and transmission (Nichols et al., 2017). This is particularly true for different platyhelminthes (flatworms) and nematode (roundworms) belonging to the genera *Gongylonema*, *Spirocerca*, *Ascarops*, *Acanthocephalus*, *Macracanthorhynchus*, or *Physocephalus* (Poinar, 1975). These parasites use dung beetles as intermediate, incidental, or paratenic hosts (Mowlavi et al., 2009; Mukaratirwa et al., 2010; Nichols and Gómez, 2014) affecting numerous species of birds, other domestic or wild mammals, as

well as humans (Kinsella et al., 2016; Mukaratirwa et al., 2010; Nichols and Gómez, 2014).

Gongylo-
matidae is a genus that includes approximately 50 species, which are known parasites of birds and mammals, including humans (Cordeiro et al., 2018; Kinsella et al., 2016). However, due to variations of critical phenotypic characters, morphological identification of these species is difficult and their number may have been underestimated (Setsuda et al., 2018). *Gongylo-*
matidae infection is a neglected zoonotic parasitic disease, reported in several countries, that is mainly caused by consumption of contaminated water, raw food, or accidental ingestion of host insects (Xiaodan et al., 2018). *Gongylo-*
matidae species follow a terrestrial indirect life cycle involving approximately 50 species of insects as intermediate hosts, such as dung beetles and cockroaches (Mowlavi et al., 2009; Mukaratirwa et al., 2010). However, the paucity of available observations prevents estimating the network of relationships between these parasites and dung beetles (Nichols et al., 2017). In the present study, we aim to improve the knowledge about these relationships by describing, for the first time, a *Gongylo-*
matidae species hosted by a European Geotrupinae species, and also comparing the genetic relationships of the specimens found with other nematode taxa by analyzing the mitochondrial *cox1* genetic sequences.

Materials and methods

In October 2017, a sampling of beetles captured by 27 pitfall traps was carried out according to a standardized sampling procedure (Lobo et al., 1988). The collections were carried out in three localities of western Spain, in the provinces of Salamanca and Zamora. Three types of excrements (pig, bovine, canine) were used as bait or attractant at each location. The captures of each trap were collected 65–80 h after trap placements and immediately deposited in 10 × 10 × 10 cm plastic containers containing soil and stored at 15°C during transport to the laboratory. The collected adult specimens with infective larvae were identified using morphological identification keys provided by Martín-Piera and López-Colón (2000). The beetles were dissected under a stereoscope for the detection of nematode larvae. In case of infection, larvae were placed in 70% ethanol until molecular analyses could be performed, with the exception of one worm selected for optical (× 100–200; Nikon eclipse 80i) and digital photomicrography system, DXM1200F) and scanning electron (SEM) microscopy. For SEM, specimens

were dehydrated through a graded series of ethanol from 70 to 100%, freeze-dried with liquid CO₂ according to the critical point method, and mounted onto stubs. Mounting of the sample on the sample holder was done using double-sided carbon adhesive tape. Mounted specimens were then sputter-coated with a gold layer (20 nm ± 5%) and observed with an FE-SEM Hitachi S-4800 (FE by Field Emission, with Field Emission Electron Gun).

Genomic DNA (gDNA) was extracted from individual worms found in beetles using an NZY tissue gDNA kit (NZYTech) following the manufacturer's instructions. The *cox1* genes were partially amplified using the primer set NTF and NTR following a PCR protocol previously described for the analysis of Spirurida (Casiraghi et al., 2001), and the product was sent for sequencing to STABvida (<https://www.stabvida.com/es>). Sequences were edited in Chromas Lite 2.1.1 (Technelysium Pty Ltd) and consensus sequences for each forward/reverse pair were created in BioEdit Sequence Alignment Editor (version 7.2.5, Carlsbad, CA, USA). Finally, the nucleotide sequences obtained (>652 pb in length) were deposited at the DNA Data Bank of Japan (DDBJ: accession numbers LC577505 and LC612845). In addition to the specimens collected in the course of this study, a DNA extract prepared using a formerly unidentified *Gongylo-*
matidae specimen, obtained from *Otus scops*, Spain, and analyzed in a previous study (Esperón et al., 2013), was provided by its authors in order to obtain its corresponding sequence for the *cox1* barcode section (DDBJ: accession numbers LC620542).

Phylogenetic analyses were carried out based on the construction of multiple alignments of nucleotide (nt) sequences either comprising a wide range of nematodes (including *Cylicospirura*, *Dirofilaria*, *Gongylo-*
matidae, *Mastophorus*, *Onchocerca*, *Physaloptera*, *Setaria*, *Spirocerca*, and *Thelazia*; $n=31$) or restricted to the *Gongylo-*
matidae genus ($n=18$). These were constructed using the iterative G-INS-I method as implemented in MAFFT vs. 7 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) followed by their edition using GBlocks (http://molevol.cmima.csic.es/castresana/Gblocks_server.html). Phylogenetic trees were built using the Maximum Likelihood (ML) optimization criterion and the Mega X software (Kumar et al., 2018), and their topological stability was assessed by bootstrapping with 1,000 re-samplings of the aligned sequence data. Alternatively, a Bayesian approach was also used for phylogenetic reconstruction, taking advantage of the BEASTv1.10.4 software (Suchard et al., 2018). For both situations, the best-fitting evolutionary model used was GTR+ Γ +I. Bayesian analyses included two independent Markov chain Monte-Carlo

(MCMC) runs carried out assuming a lognormal-relaxed molecular clock (as suggested by Mega X Molecular Clock test), and a constant population coalescent prior. These runs were executed until 1×10^8 states were sampled (10% of which were discarded as burn-in), and the final tree sample was summarized as a maximum clade credibility (MCC) tree.

Intra- and inter-group genetic distances were calculated using the Tamura/Nei model with gamma-distributed rates ($\alpha=0.65$), as suggested by Mega X. Sequence similarity searches were carried out using BLASTn (MegaBlast option; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and Barcode of Life Data Systems-v4 (<http://www.boldsystems.org/>). Finally, a principal coordinate analysis was carried out using PCOORD (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/PCOORD/PCOORD.html>) to visualize the genetic relationships between the *cox1* sequences of the different *Gongylonema* species.

Results and discussion

A total of 551 dung beetle specimens were analyzed and three nematode infective larvae were detected in two specimens of *Geotrupes mutator* (Marshall, 1802), indicating a prevalence of 0.36% over the total of beetle specimens sampled. One of the beetles hosted a single larva, the other dung beetle specimen hosted two *Gongylonema* larvae. They were captured in Campillo de Azaba (Salamanca province; Lat: 40.510, Long: -6.689), in a valley area and a contiguous holm oak forest area, respectively. Both specimens were collected in pitfall traps baited with pig dung.

Members of the genus *Gongylonema* are easily recognized because their cuticle is covered by large verruciform thickenings, especially prominent on the anterior part of the body. By optical microscope, the morphological features of one specimen clearly indicated the presence of a third larval stage of *Gongylonema*. The total length of the specimen was 1.55 mm, width at mid-body of 0.075 mm, and a distance from the anus to the posterior end of the body of 0.085 mm (Fig. 1.1). The cephalic structure showed the typical mouthparts of this genus (Fig. 1.2).

The detailed observation by SEM showed the classic elevation peri buccal collar present in its internal face (Fig. 1.4), as well as an inner circle of labial papillae constituted by six well-developed labial papillae arranged in two groups of three papillae located laterally. In the external face of the peri buccal collar, there was an outer circle of labial papillae formed by four small papillae (Fig. 1.4). More

externally, a circle of cephalic papillae constituted by four large papillae could also be observed (Fig. 1.5). Two large amphids were located lateral to the mouth and two lateral depressions. Two lateral alae extend throughout the body length (Fig. 1.6). Finally, the caudal region of the worm was adorned with a tuft of a dozen cuticular fingerings (Fig. 1.7).

Regarding molecular analyses, two partial nematode *cox1* sequences were obtained (accession numbers LC577505 and LC612845) from specimens collected in the course of this study. The data coming from an additional specimen previously described from Madrid (Esperón et al., 2013) (accession numbers LC620542) was also included in the genetic analyses performed in this study. A search for similar sequences using Blastn unambiguously identified (E values=0) several *cox1* homologues among *Gongylonema* nematodes, indicating high similarity with *G. nepalensis* and *G. pulchrum*. However, while the matches covered >97% of our sequences, the identity percentage for the best-fit ones averaged only 88%. On the other hand, a Blast-2seq analysis revealed that the *cox1* LC620542 sequence (from Madrid) shared <87% identity with both LC577505 and LC612845. Moreover, an attempted automatic molecular identification of the Spanish sequences in question using the BOLDSYSTEMS *cox1*-based molecular identification engine failed to produce any best match.

The Bayesian phylogenetic tree including many genera of nematodes (*Cylicospirura*, *Dirofilaria*, *Gongylonema*, *Mastophorus*, *Onchocerca*, *Physaloptera*, *Setaria*, *Spirocerca*, and *Thelazia*) (Fig. 2a) indicated that the *cox1* sequences of the collected specimens were associated with those corresponding with to the *Gongylonema* genus. Furthermore, the collected specimens unambiguously segregated away from all the monophyletic clusters that defined the different species in the *Gongylonema* radiation (*G. aegypti*, *G. neoplasticum*, *G. nepalensis*, and *G. pulchrum*) (Fig. 2a). Interestingly, the two specimens hosted by *G. mutator* are grouped together, but the third one obtained from *Otus scops* in Madrid was segregated in a sister branch, suggesting that we could be dealing with two different *Gongylonema* species.

The analysis of the genetic distances supported the suggestion that the three considered specimens belong to 2 different *Gongylonema* species since the genetic distances between them are similar to those shared by the other reference species (*G. aegypti*, *G. neoplasticum*, *G. nepalensis*, and *G. pulchrum*) (Fig. 2b). This separation was further confirmed by the Principal Coordinate Analysis (PCOORD) (Fig. S1A). Finally, as expected, when a phylogenetic tree only

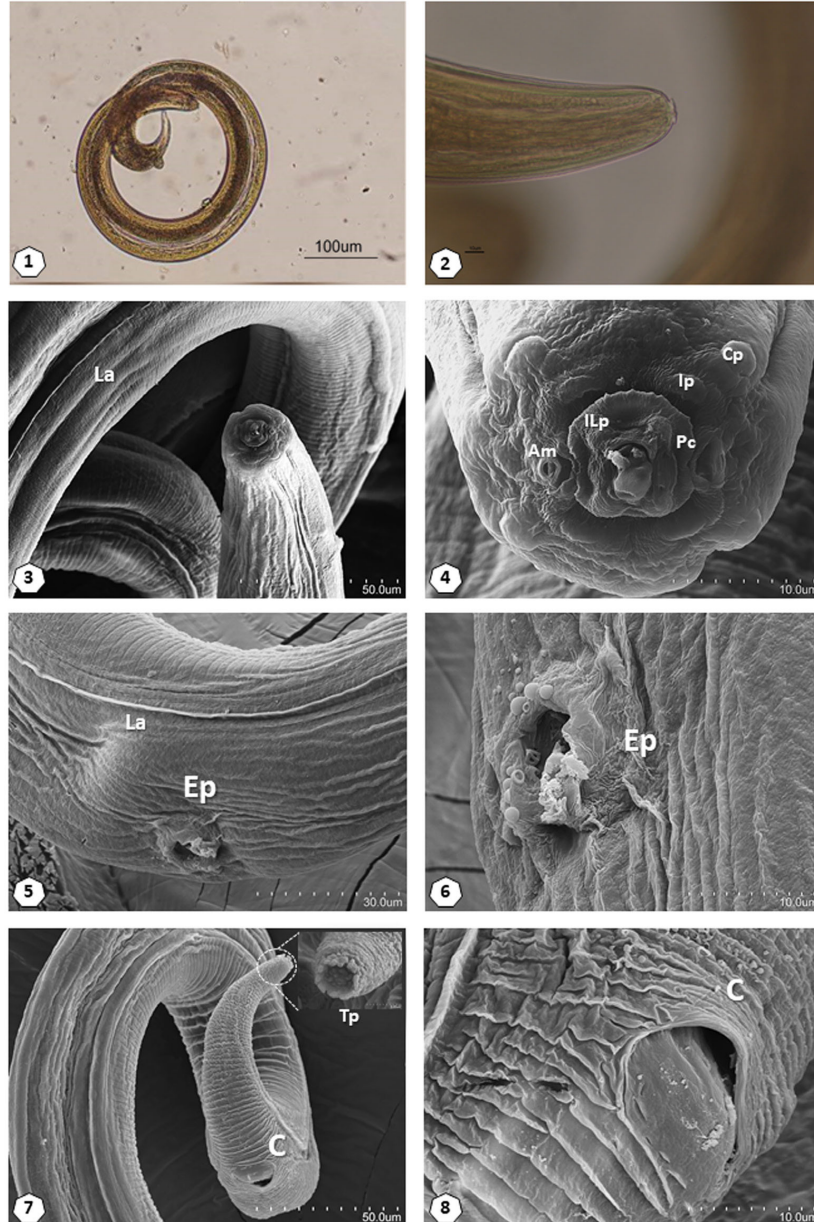


Figure 1: Scanning electron microscopy (SEM) of *Gongylonema* sp. (1) Anterior portion of a specimen L3 without cuticular bosses and highlighting the lateral ala (La). (2) Central view of the cephalic end, highlighting the amphids (Am), 4 cervical papillae (Cp), 4 internal papillae (Ip), 6 inner lateral papilla (ILp), peribuccal collar (Pc) and cuticular plates on the margins of the buccal opening. (3) Detail of lateral alae (La) and excretory pore (Ep). (4) Details of excretory pore (Ep). (5) Posterior portion of a specimen L3 with a view of the cloacal opening (C) and details of caudal end (Tp). (6) Details of Cloaca (C).

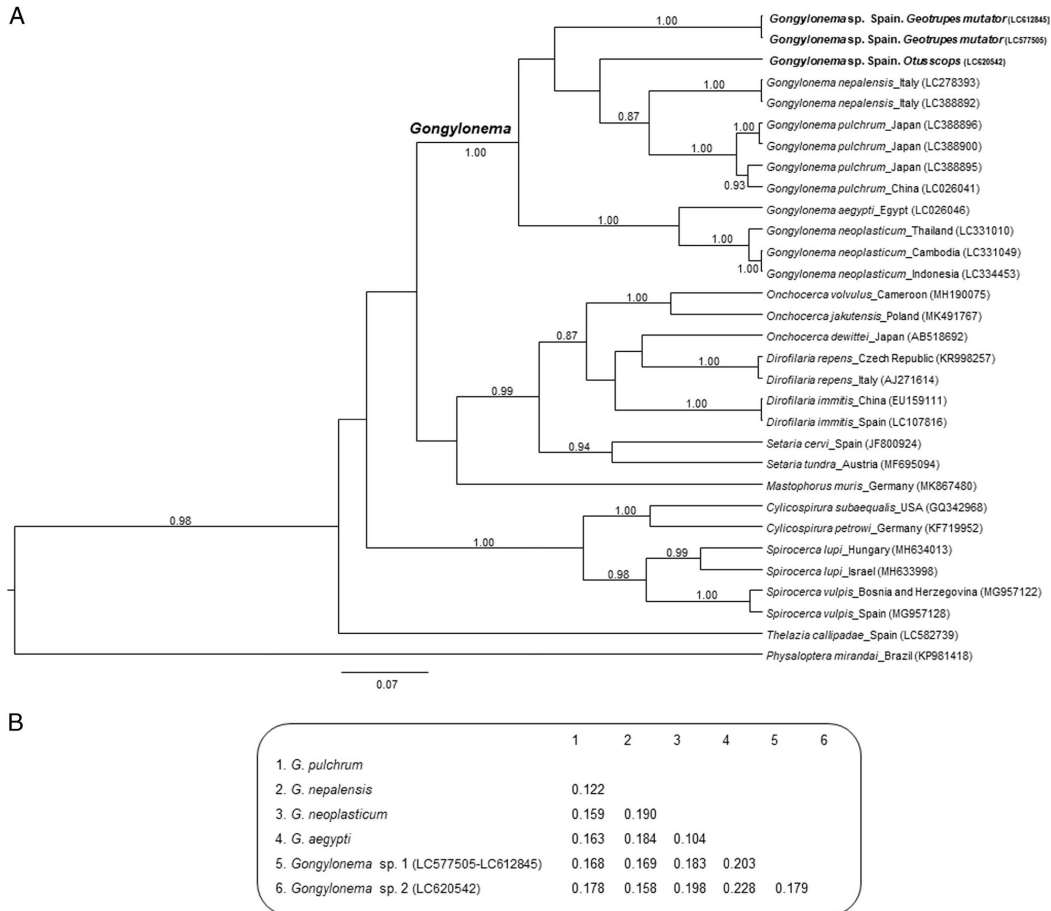


Figure 2: (A) Phylogenetic analysis (MCC tree obtained using a Bayesian approach) of *cox1* sequences ($n = 47$) from 10 different genera of nematodes. At specific branches, the values indicate the topological branch-support, as revealed by posterior probability values > 0.80 . The branch defining the *Gongyilonema* genus is indicated. The size bar indicates the number of nucleotide substitutions per site. The *cox1* sequences obtained in the course of this study are highlighted in bold case. (B) Estimates of evolutionary divergence of *cox1* over sequence pairs between groups. The analysis involved 16 *Gongyilonema* sp. sequences.

including *Gongyilonema cox1* sequences was obtained (Fig. S1B), the sequences here reported branched away from all the other species-defining branches. Although we cannot confirm the specific taxonomic status of the collected *Gongyilonema* specimens, the analysis of the obtained *cox1* sequences improve our understanding of the interspecific genetic divergences of this little-studied genus.

In Spain, seven species of genus *Gongyilonema* have been reported (Cordero et al., 1994; Fernandez-De-Mera et al., 2003; da Costa Cordeiro et al., 2018). Although we have not been able to find out which specie is our specimens, must a priori rule out *G. pulchrum* and *G. neoplasticum* present in Spain based on genetic analysis. Knowing that adults of *Gongyilonema* (*Progongyilonema*) are distinguished

mainly from those of the subgenera *Gongylonema* (*Gongylonema*) and *Gongylonema* (*Gongylonemoides*) by the absence of cuticular bosses, their inclusion in this subgenus would be probable since this morphological character has not been observed in the specimen here analyzed. However, it is possible that our specimen may not yet have all the developed characteristics, as other authors observed for the different stages in other species (Alicata, 1935). The only known member of this subgenus in Spain is *G. (Progongylonema) pacoi* which was described for the first time in 1992 parasitizing the mucosa under the tongue of Corvids from the north of Cordoba province (Southern Spain) (Hernandez-Rodríguez and Gutiérrez-Palomino, 1992). Another *Gongylonema* that was detected in birds in Spain, was found in Madrid in various specimens of *Otus scops* (Esperón et al., 2013). Although the taxonomic identity of this species could not be established initially, our results have suggested the do not correspond to any of the *Gongylonema* species with available public genetic data. This would support the existence of a higher diversity of this genus in Spain. On the other hand, the infesting larva of *G. soricis* is similar to our nematode due to its close size (1545 µm-1580 µm) and its caudal ornamentation adorned with a tuft of cuticular fingerings (Quentin and Gunn, 1981). *G. soricis* has been rarely collected in Spain, except for records in Valencia in 1996 (Portoles et al., 1996). Taking into account these data and that its definitive host is grey shrew (*Crocidura russula*) which are highly distributed in Spain, *G. soricis* could be a good candidate for the identity of our specimen analysed in this study. Other potential candidate species include *G. (Gongylonematidae) pithyusensis* n. sp. and *G. mucronatum*. The first was described for the first time in 1977 parasitizing the oesophagus mucosa of the dormouse *Eliomys quercinus* (Mas Coma, 1977) in the Balearic Islands, Spain. Since then, it has only been detected once in Murcia (southeast) (Esteban et al., 2004), while the second was reported from *Atelerix algirus* (North African hedgehog) in North Africa and Spain (on the Balearic islands and Valencia: see Ferrer Màrius Vicent et al. (2000). However, as the distribution of *A. algirus* is limited to the east of the Iberian Peninsula, it is unlikely that our specimens belong to this species. The last species of *Gongylonema* inhabiting the Iberian peninsula is *G. musculi*, which had been recorded occasionally on several Mediterranean islands (Milazzo et al., 2003). The limited information about the morphology of the infecting larvae of this species prevent us from making any comparison. Therefore, the lack of morphological and genetic information on Iberian *Gongylonema*

species momentarily makes a more specific definitive determination impossible.

While knowledge on the presence of nematodes in beetles from Spain could be regarded as helpful, it is either still scarce, or in the case of *Gongylonema*, non-existent. Although species of the genera *Ascarops*, *Diplocapter*, *Diplogaster*, *Eudiplogaster*, *Holodiplogaster*, *Physocephalus*, *Pelodera*, *Paroigolaimella*, *Rhabditis*, and *Spirocerca* have been detected in *G. mutator*, only *G. pulchrum* had been reported (Poinar, 1975). Therefore, this is the first report of other *Gongylonema* sp. in *G. mutator* naturally infected, at least in Europe. *G. mutator* is a widely distributed species in Europe from the south of Sweden to the Caucasus and the Iberian Peninsula, that also inhabit some Asian regions of Iran Kazakhstan, and Turkey (Löbl and Smetana, 2016). In the Iberian Peninsula this dung beetle species is frequent in the northern half part (Martín-Piera and López-Colón, 2000).

The only infected beetles with the analysed larvae were collected in traps baited with pig excrements. In general, Geotrupinae species are frequently associated with dung of mammalian herbivores (Martín-Piera and López-Colón, 2000). *G. mutator* digs several tunnels immediately below, or to the side, of the cow and horse dung pats (Teichert, 1955), using them for feeding or nesting. Cows and horses are thus the most probable candidates to host this parasite, although the general low trophic specificity of dung beetles (Martín-Piera and Lobo, 1996) has not yet made this point any clearer.

According to the morphologic and genetic analysis on the taxonomic identity of the *Gongylonema* species from *G. mutator*, there are the following possible interpretations:

- The lack of genetic data of other *Gongylonema* species makes it impossible to relate this *Gongylonema* species with another already described only using morphological characters of adult specimens. However, based on the data of a comparative morphological and morphometric study, it makes us think that it could be preliminarily identified as *G. soricis*.
- The genetic analysis of the larvae indicates that they could not be assigned to any of the different species for which data are available in the genetic database. The possibility that they could be a new species must be considered, so future exhaustive studies are necessary to analyses the morphological variability of adults, the morphology of the evolutionary stages, and the complete life cycles (hosts).

Much remains to be learned about the systematics of *Gongylonema*. Different studies (Makouloutou et al., 2013a, 2013b; Setsuda et al., 2016, 2018; Varcasia et al., 2017) have provided molecular data about *Gongylonema* genus, in line with our work. However, our data together with those of Esperón et al. (2013) indicate a possible greater diversity of *Gongylonema* species in Spain, and an evident scarcity of genetic information to support their genetic analyses. Future molecular analyses are needed for better understanding the ecobiology of *Gongylonema* in other regions and careful searching for more specimens in a European framework.

Acknowledgments

The Authors thank the authors Fernando Esperón, Francisca Lopes, Patricia Orejas, and Raúl Alonso for providing us a DNA sample of the nematode found in *Otus scops* in Madrid in their study (Esperón et al., 2013) for complimentary analysis in this work.

The Authors also appreciate the technical and human support provided by the facility of analysis and characterization of solids and surfaces of SAIUEX (financed by UEX, Junta de Extremadura, MICINN, FEDER, and FSE). The authors thank the Veterinary student Marta Jiménez Navarro for her collaboration throughout the laboratory process.

References

- Alicata, J. 1935. "Early developmental stages of nematodes occurring in Swine", Technical Bulletin 489 D. of Agriculture, Ed, Washington, DC.
- Casiraghi, M., Anderson, T. J. C., Bandi, C., Bazzocchi, C. and Genchi, C. 2001. A phylogenetic analysis of filarial nematodes: Comparison with the phylogeny of *Wolbachia* endosymbionts. *Parasitology* 122:93–103.
- Cordeiro, H. D. C., Melo, F. T. D. V., Giese, E. G. and Santos, J. N. Dos 2018. *Gongylonema* parasites of rodents: a key to species and new data on *Gongylonema neoplasticum*. *Journal of Parasitology* 104:51–9.
- Cordero del Campillo, M., CastaZón OrdóZez, L. and Reguera, Feo, A. 1994. Índice catálogo de zooparásitos ibéricos. Universidad de León, Secretariado de Publicaciones.
- Esperón, F., Martín, M. P., Lopes, F., Orejas, P., Carrero, L., Muñoz, M. J. and Alonso, R. 2013. *Gongylonema* sp. infection in the scops owl (*Otus scops*). *Parasitology International* 62:502–4.
- Esteban, J., Fuentes, M., Muñoz-Antolí, C., Saez, S. and Trellis, M. 2004. First report of *Gongylonema pithyusensis* (Nematoda: Gongylonematidae) in continental Europe. *Helminthology* 41:173.
- Fernandez-De-Mera, I. G., Gortazar, C., Vicente, J., Höfle, U. and Fierro, Y. 2003. Wild boar helminths: Risks in animal translocations. *Veterinary Parasitology* 115:335–41.
- Ferrer Màrius Vicent, F., Teresa Galan-Puchades, M., Fuentes, M., Cerezuola, A. and Galan, M. 2000. A helminthological survey of small mammals (Insectivores and Rodents) in the Serra Calderona mountains (Valencian Community, Spain). *Research and Reviews in Parasitology* 60:25–35.
- Hernandez-Rodriguez, S. and Gutiérrez-Palomino, P. N. 1992. *Gongylonema (Progongylonema) pacoi* n. subgen. n. sp. (Spiruroidea: Gongylonematidae) parasite D'oiseaux Corvidae. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee* 67:188–93.
- Kinsella, J. M., Del Rosario Robles, M. and Preisser, W. C. 2016. A review of *Gongylonema* spp. (Nematoda: Gongylonematidae) in North American rodents with description of a new species from the cotton rat, *Sigmodon hispidus* (Mammalia: Cricetidae). *Zootaxa* 4107:277–84.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. and Tamura, K. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547–9.
- Lobo, J. M., Martín-Piera, F. and Veiga, C. M. 1988. Las trampas pitfall con cebo, sus posibilidades en el estudio de las comunidades coprofagas de Scarabaeoidea (Col.). *I. Revue d'Ecologie et de Biologie du Sol* 25:77–100.
- Löbl, I. and Smetana, A. 2016. Catalogue of Palaearctic Coleoptera Series. Vol. 3: Scarabaeoidea, Scirtoidea, Dascilloidea, Buprestoidea and Byrrhoidea (Brill Academic Publishers, Leiden).
- Makouloutou, P., Rana, H. B., Adhikari, B., Devkota, B., Dhakal, I. P. and Sato, H. 2013b. A distinct genetic population of *Gongylonema pulchrum* from water buffaloes in Nepal. *Journal of Parasitology* 99:669–76.
- Makouloutou, P., Setsuda, A., Yokoyama, M., Tsuji, T., Saita, E., Torii, H. and Sato, H. 2013a. Genetic variation of *Gongylonema pulchrum* from wild animals and cattle in Japan based on ribosomal RNA and mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I genes. *Journal of Helminthology* 87:326–35.
- Martin-Piera, F. and Lobo, J. M. 1996. A comparative discussion of trophic preferences in dung beetle communities. *Miscellanea Zoologica* 19:13–31.
- Martin-Piera, F. and López-Colón, J. I. 2000. "Coleoptera, Scarabaeoidea I. En: Fauna Ibérica", In Ramos, M. A. et al. (Eds), vol. 14, Museo Nacional de Ciencias Naturales. CSIC, Madrid, 526 pp.
- Mas Coma, S. 1977. *Gongylonema pithyusensis* N. Sp. (Nematoda: Spiruridae), Parasite Oesophagien du Lerot *Eliomys Quercinus* Ophiusae Thomas, 1925 (Rodentia: Gliridae) a Formentera (Balears). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee* 52:13–8.
- Milazzo, C., De Bellocq, J. G., Cagnin, M., Casanova, J. C., Di Bella, C., Feliu, C. and Santalla,

Gongylonema detected in *G. mutator*: Bravo-Barriga et al.

- F. 2003. Helminths and ectoparasites of *Rattus rattus* and *Mus musculus* from Sicily, Italy. *Comparative Parasitology* 70:199–204.
- Mowlavi, G., Mikaeili, E., Mobedi, I., Kia, E., Masoomi, L. and Vatandoost, H. 2009. A Survey of dung beetles infected with larval nematodes with particular note on *Copris lunaris* beetles as a vector for *Gongylonema* sp. in Iran. *The Korean Journal of Parasitology* 47:13.
- Mukaratirwa, S., Pillay, E. and Munsammy, K. 2010. Experimental infection of selected arthropods with spirurid nematodes *Spirocera lupi* Railliet & Henry, 1911 and *Gongylonema ingluvicola* Molin, 1857. *Journal of Helminthology* 84:369–74.
- Nichols, E., Alarcón, V., Forgie, S., Gomez-Puerta, L. A. and Jones, M. S. 2017. Coprophagous insects and the ecology of infectious diseases of wildlife. *ILAR Journal* 58:336–42.
- Nichols, E. and Gómez, A. 2014. Dung beetles and fecal helminth transmission: Patterns, mechanisms and questions. *Parasitology* 141:614–23.
- Nichols, E., Spector, S., Louzada, J., Larsen, T., Amezquita, S. and Favila, M. E. 2008. Ecological functions and ecosystem services provided by Scarabaeinae dung beetles. *Biological Conservation* 141:1461–74.
- Poinar, G. O. 1975. *Entomogenous nematodes: A manual and host list of insect-nematode associations*. Leiden: Brill Archive.
- Portoles, E., Granel, P. and Esteban, J. G. 1996. "Helminthofaunistic analysis of *Crocidura russula* (Hermann, 1780) (Insectivora: Soricidae) From the Albufera Natural Park (Valencia, Spain)", *Research and Reviews in Parasitology* 56:203–11.
- Quentin, J. C. and Gunn, T. 1981. Morphologie et biologie larvaires de *Gongylonema soricis* Fain, 1955. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* 56:167–72.
- Setsuda, A., Da, N., Hasegawa, H., Behnke, J. M., Rana, H. B., Dhakal, I. P. and Sato, H. 2016. Intraspecific and interspecific genetic variation of *Gongylonema pulchrum* and two rodent *Gongylonema* spp. (*G. aegypti* and *G. neoplasticum*), with the proposal of *G. nepalensis* n. sp. for the isolate in water buffaloes from Nepal. *Parasitology Research* 115:787–95.
- Setsuda, A., Ribas, A., Chaisiri, K., Morand, S., Chou, M., Malbas, F., Muchammad, Y. and Sato, H. 2018. Molecular genetic diversity of *Gongylonema neoplasticum* from rodents in Southeast Asia. *Systematic Parasitology* 95:235–47.
- Suchard, M. A., Lemey, P., Baele, G., Ayres, D. L., Drummond, A. J. and Rambaut, A. 2018. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evolution* 4:1–5.
- Teichert, M. 1955. Biologie und Brutfürsorgemassnahmen von *Geotrupes mutator* Marsh. und *Geotrupes stercorearius* L. (Col. Scarab.). *Wissenschaftliche Zeitschrift Martin Luther-University. Halle-Wittenburg* 5:187–218.
- Varcasia, A., Scala, A., Zidda, A., Cabras, P. A., Gaglio, G., Tamponi, C. and Sato, H. 2017. First record of *Gongylonema nepalensis* in domestic and wild ruminants in Europe. *Veterinary Parasitology* 246:11–8.
- Xiaodan, L., Zhensheng, W., Ying, H., Hongwei, L., Jianqiu, J., Peiru, Z., Sha, S. and Zhimin, Y. 2018. *Gongylonema pulchrum* infection in the human oral cavity: A case report and literature review. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology* 125:e49–e53.

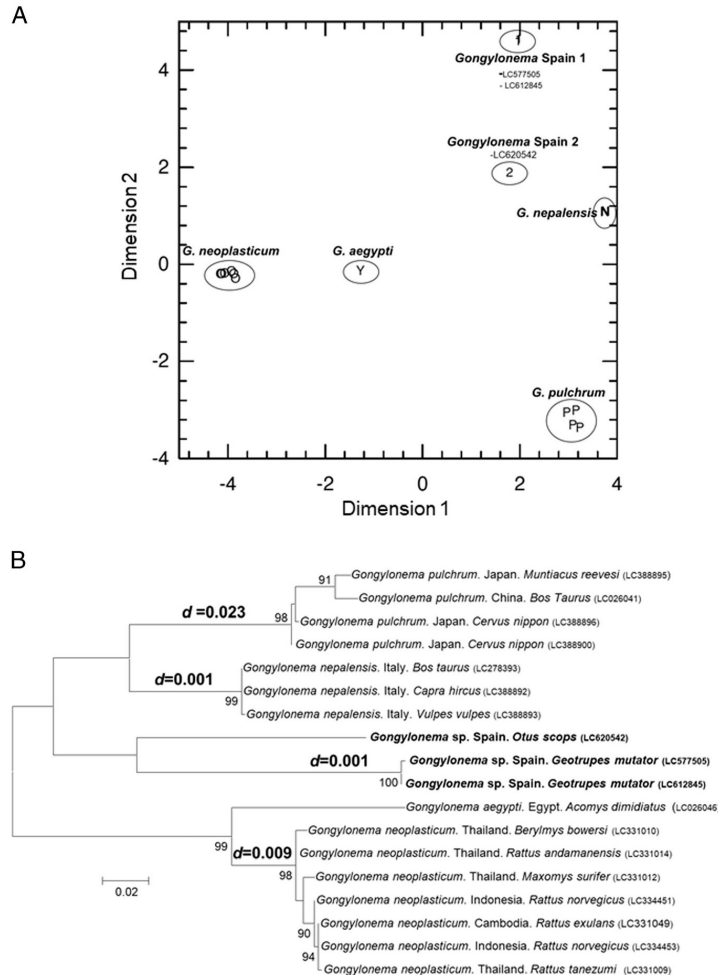


Figure S1: Supplementary document: (A) Multivariate principal coordinate analysis (PCOORD) for the dataset of sequences analysed in Maximum Likelihood tree, and that include *G. aegypti*, *G. neoplasticum*, *G. nepalensis*, and *G. pulchrum*, indicated by Y, O, N and P, respectively (used as references). The sequences obtained in the course of this study are indicated as Spain 1 and 2. The axes of this graph correspond to the two dimensions that were first extracted; together they cover over 66% of the total differences between the groups identified. (B) Phylogenetic analysis (Maximum Likelihood tree) of *cox1* sequences ($n = 18$) amplified from *Gongylonema* nematodes. At specific branches, the values indicate the branch-support as revealed by bootstrap analysis, with values ≥ 75 defining high topological support. The size bar indicates the number of nucleotide substitutions per site. The d values above the *G. neoplasticum*, *G. nepalensis* and *G. pulchrum* indicate intra-species genetic distances.

5.1.4.- Survey of *Trichinella* spp. in wild mesocarnivores from Castilla y León, Spain.

Rafael Calero-Bernal*, **Manuel Martín-Pérez***, Daniel Bravo-Barriga, Juan Blanco-Ciudad, Eva Frontera, Francisco Javier Serrano-Aguilera, Juan Enrique Pérez-Martín, David Reina.

Sección de Parasitología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Cáceres, España.

* Ambos autores contribuyeron por igual.

XX Congreso SOCEPA

Celebrado entre los días 19 y 21 de julio de 2017

San Cristóbal de la Laguna (Tenerife)

Resumen.

El presente estudio tiene como objetivo estimar la prevalencia de *Trichinella* spp., en carnívoros silvestres de Castilla y León (España), donde hay escasos estudios en este sentido. Este estudio epidemiológico también contribuye a determinar el riesgo de circulación de parásitos desde el ciclo de vida silvestre al doméstico. La *trichinellosis* es una parasitosis que puede causar una enfermedad de consecuencias muy graves para la salud humana. Es considerada una de las zoonosis más importantes transmitidas al hombre por el consumo de carnes infectadas, por tanto, su presencia debe ser vigilada, tanto en animales domésticos como silvestres.

En este trabajo se ha utilizado el zorro rojo como especie centinela o marcador de la incidencia y la distribución de la parasitación en el ecosistema silvestre. También se muestrearon, en menor número, otros mesocarnívoros, que fueron analizados gracias a ser recogidos tras muertes accidentales. Las muestras fueron tomadas desde junio de 2016 a mayo de 2017, siendo un total de 736 muestras, 712 de las cuales correspondieron a zorros y 24 a otros mesocarnívoros silvestres.

En el momento de la necropsia del animal, se procedió a identificar cada muestra de forma individual y se analizaron mediante la técnica propuesta en el Reglamento UE 1375/2005, con las particularidades que se plantean para carnes de otras especies silvestres, con una cantidad a digerir de al menos 30 gr para zorros y 50 para los otros mesocarnívoros.

Los resultados mostraron que el parásito *Trichinella* está presente en la vida silvestre en la zona de estudio. Estos resultados también indican que las cargas parasitarias son muy variables, y que, en ocasiones, es necesario realizar un examen minucioso para la detección de las larvas. Estos datos pueden ayudar a que se tomen medidas preventivas más intensas en determinadas zonas, donde la infección parece que está asentada en el entorno silvestre.

Survey of *Trichinella* spp. in wild mesocarnivores from Castilla y León, Spain.

Rafael Calero-Bernal*, Manuel Martín-Pérez*, Daniel Bravo-Barriga, Juan Blanco-Ciudad, Eva Frontera, Francisco Javier Serrano-Aguilera, Juan Enrique Pérez-Martín, David Reina.

Parasitology Section, Faculty of Veterinary Medicine, University of Extremadura, Cáceres, Spain.
Both authors contributed equally.

INTRODUCTION

Trichinellosis constitutes a historically important zoonosis; its inspection in meats from susceptible animals to human consumption (pork, horsemeat, and reptiles) is mandatory following European Regulations (former 2075/2005; currently, 2015/1375). Another aspect of official measures on *Trichinella* spp. control aims to carry out epidemiological surveys on wild reservoirs to determine the risk of circulation of parasites from wild to domestic life cycles. Present study aims to estimate the prevalence of *Trichinella* spp. infecting wild carnivore hosts from Castilla y León region of Spain where studies in this sense are scarce.



Figure 1. Several specimens (a, red foxes; b, stone marten; c, age estimation) collected.

MATERIAL AND METHODS

735 wild carnivore carcasses were sampled in four provinces within Castilla y León region of West-Central Spain (Figure 1, Table 1). An average of 25 g of red foxes muscle tissue from forearm, and 40 g of other species, were subjected to acid-pepsin artificial digestion as described elsewhere (Commission Implementing Regulation 2015/1375). Parasite burden (Larvae per gram of tissue, LPG) was estimated by using McMaster chambers, correcting the values by a constant of 6.66 (conditioned by the chamber volume) and the total volume of larvae final elution. Individual-larvae identification to species/genotype level was carried out using the methodology of Zarlenga et al. (1999, 2001) in collaboration with the European Reference Laboratory for Parasites (Rome, Italy).

Table 1. Results of *Trichinella* infection in wild carnivores sampled in Castilla y León, Spain.

Host	Province					Total
	Salamanca	Zamora	Valladolid	Ávila		
Red fox (<i>Vulpes vulpes</i>)	Sampled: N	478	165	37	32	712
	Positive: N (%)	5 (1.05)	1 (0.61)	-	-	6 (0.84)
European badger (<i>Meles meles</i>)	-	10	1	-	-	11
Stone marten (<i>Martes foina</i>)	-	7	4	-	-	11
Genet (<i>Genetta genetta</i>)	-	-	1	-	-	1
Otter (<i>Lutra lutra</i>)	-	1	-	-	-	1
Total	-	496	171	37	32	736

*11 additional wild boar samples were collected in the same areas where *Trichinella*-positive red foxes from Salamanca and Zamora were sampled; all tested negative.

RESULTS AND DISCUSSION

Six *Trichinella*-infected red foxes (*Vulpes vulpes*) were detected (prevalence: 0.84%; n=712) (Table 1); parasitic burden were: 1.2, 4.3, 7.9, 24.0, 36.6, and 8.3 LPG (average: 13.2). Other carnivore host species investigated, like European badger (n=11), stone marten (n=11), genet (n=1), and Eurasian otter (n=1), resulted negative for *Trichinella* infection (Table 1). After parasite species determination (Table 2), a dominance of *T. britovi* over *T. spiralis* can be observed. *Trichinella*-positive cases in red fox are geographically located in Zamora and Salamanca provinces (Figure 2). Prevalence value in red foxes detected in this study is similar to the situation found in Cataluña by López-Olvera et al. in 2011 (0.30%), but largely disagree with much higher rates found in other Spanish territories like Extremadura (2.64% and 3.59%; Pérez-Martín et al., 2000, 2007), Guadalajara (8.95%; Criado-Fornelio et al., 2000) and Soria (15.5%; Lledó et al., 2015). Absence of infections in other host animals studied might be due to the low number of samples analyzed; further effort should be focused on sampling more mesocarnivore carcasses. In addition, average parasite burden found in the 6 isolates is lower than that previously found in foxes from Extremadura (30.6 LPG; Pérez-Martín et al., 2000). Maybe differences are due to environmental factors like average altitude level or vegetation dominance; higher prevalence values historically were associated to 500 m above sea level and reduced when other resources (crops, fruit-trees and abundance of livestock like poultry and sheep) are available for foxes, providing them supplementary diet distinct from *Trichinella*-associated sources (wild boar and carnivore carcasses) (Pozio, 1998). It is still possible to discern a dominance of *T. britovi* over *T. spiralis* in wild life cycles in Central Spain (Blanco-Ciudad, 2012) (including mixed infections *T. britovi* + *T. spiralis*), this involves the circulation of such species towards wild boars that constitutes the main source of *Trichinella* for human outbreaks. Present results identified 2 previously unknown foci of *Trichinella* in the wild, so we should highlight that surveillance of feral carnivores might constitute an efficient measure for risk estimation in areas with free-ranging livestock industry.

Table 2. Epidemiological information of *Trichinella* spp. isolated in red foxes (*Vulpes vulpes*) from Castilla y León, Spain.

Sample (ID)	Age (Gender)	Location	Municipality (Province)	Parasite burden	<i>Trichinella</i> spp.
Z1 (15081611)	5-yr (female)	41° 19' 41,08" N / 6° 11' 14,79" W	Villar del Buey (Zamora)	4.33 LPG	<i>T. britovi</i>
Z2 (17091604)	5-yr (female)	40° 49' 17" N / 5° 35' 00" W	Valdemierque (Salamanca)	7.86 LPG	<i>T. britovi</i>
Z3 (18091607)	7-mo (male)	40° 49' 17" N / 5° 35' 00" W	Valdemierque (Salamanca)	24.00 LPG	<i>T. britovi</i>
Z4 (15011704)	2-yr (male)	40° 29' 3" N / 5° 59' 50" W	Miranda del Castañar (Salamanca)	36.63 LPG	<i>T. britovi</i>
Z5 (22031702)	2-yr (male)	40° 37' 52" N / 6° 42' 17" W	Gallegos de Argañán (Salamanca)	1.18 LPG	<i>T. britovi</i> + <i>T. spiralis</i>
Z6 (01051701)	1-yr (male)	40° 29' 3" N / 5° 59' 50" W	Miranda del Castañar (Salamanca)	8.33 LPG	<i>T. spiralis</i>

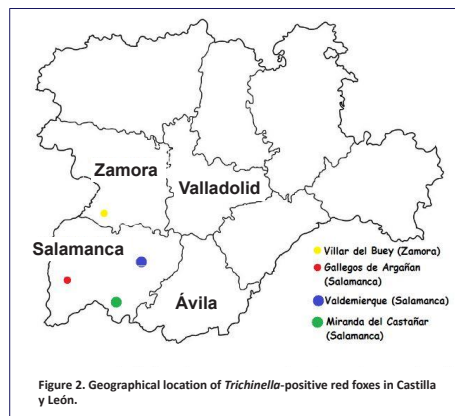


Figure 2. Geographical location of *Trichinella*-positive red foxes in Castilla y León.

BIBLIOGRAPHY

- Blanco-Ciudad, 2012. Trabajo de grado. Universidad de Extremadura.
Criado-Fornelio et al., 2000. Vet Parasitol. 92: 245-251.
Commission Regulation (EC) No 2075/2005.
Commission Implementing Regulation (EU) 2015/1375.
Lledó et al., 2015. Vector Borne Zoonotic Dis. 15: 743-749.
López-Olvera et al., 2011. Parasitol Res. 108: 1589-1591.
Pérez-Martín et al., 2000. J Wildl Dis. 36: 531-534.
Pérez-Martín et al., 2007. Actas del X Congreso Ibérico de Parasitología (CIP 10), Madrid, 101.
Pozio, E. 1998. Parasitol Today. 14: 35-38.
Zarlenga et al., 2001. Parasite 8(2 Suppl): S24-26.
Zarlenga et al., 1999. Int. J. Parasitol. 29: 1859-1867.

ACKNOWLEDGEMENTS



5.2.- Otros resultados:

5.2.1.- Presencia y distribución de *Trichinella* spp. en zorros y otros mesocarnívoros en Castilla y León (España).

Resumen

Este trabajo, aún no publicado, muestra los resultados ampliados sobre la distribución de *Trichinella* spp., en zorros y otros mesocarnívoros en distintas provincias de Castilla y León. Por tanto, se presentan diferentes mapas epidemiológicos de la presencia de *Trichinella* spp por provincias y municipios, así como la estimación de la prevalencia calculada, también según los distintos municipios analizados. En el trabajo ya publicado sobre *Trichinella* spp, mediante una comunicación a un congreso internacional, se incluyeron 736 muestras (712 de zorros y 24 de otros mesocarnívoros silvestres). Sin embargo, los estudios sobre *Trichinella* fueron ampliados y se siguieron tomando entre junio de 2017 y diciembre de 2018. Se analizaron un mayor número de ejemplares de algunas especies, incorporando además un pequeño número de jabalíes, abatidos en las proximidades de las ubicaciones geográficas donde se había detectado anteriormente algún caso positivo frente a esta zoonosis. Se añadieron 174 muestras adicionales, que, sumadas a las anteriores, hicieron un balance global de 910 muestras de fauna silvestre analizadas frente a *Trichinella* spp. (tabla 19). Todas estas muestras fueron sometidas a un proceso de digestión enzimática, por el método de referencia propuesto en el Reglamento UE 1375/2005, y que se adjunta como documento (anexo 1) a esta tesis. Este aumento de recogida de muestras se realizó en la misma área geográfica que el estudio inicial, concretamente en diferentes municipios de 4 provincias de Castilla y León (Ávila, Salamanca, Zamora, Valladolid).

Hemos creído conveniente presentar este trabajo complementario con el fin de mostrar visualmente, a través de mapas, la localización de los principales focos de la enfermedad en la vida silvestre, lo cual ayuda a localizar las áreas de mayor riesgo y donde las medidas de prevención deberían ser mucho más exhaustivas para evitar la transmisión al hombre. Esta zoonosis, lejos de ser residual, cada vez está aumentando más su presencia en los animales de vida silvestre, a tenor de las continuas notificaciones desde las áreas de salud que efectúan las respectivas Comunidades Autónomas.

En los mapas de las figuras 4, 5, 6, 7, se representan los municipios muestreados de cada provincia, con el número de mesocarnívoros (tanto zorros como otros mesocarnívoros) analizados en cada uno de ellos.

Tabla 19.- Total de muestras analizadas en la presente Tesis doctoral procedentes de distintas especies animales en busca de *Trichinella* spp. en 4 provincias de Castilla y León (Ávila, Salamanca, Zamora y Valladolid).

Especie hospedadora	Nº muestras analizadas frente a <i>Trichinella</i> spp.
Zorro (<i>Vulpes vulpes</i>)	805
Erizo (<i>Erinaceus europaeus</i>)	4
Garduña (<i>Martes foina</i>)	27
Gato cimarrón (<i>Felis silvestris catus</i>)	1
Gato montés (<i>Felis silvestris</i>)	1
Jabalí (<i>Sus scrofa</i>)	13
Jineta (<i>Genetta genetta</i>)	10
Meloncillo (<i>Herpestes ichneumon</i>)	8
Nutria (<i>Lutra lutra</i>)	4
Perro (<i>Canis lupus familiaris</i>)	1
Tejón (<i>Meles meles</i>)	27
Turón (<i>Mustela putorius</i>)	8
TOTAL	910

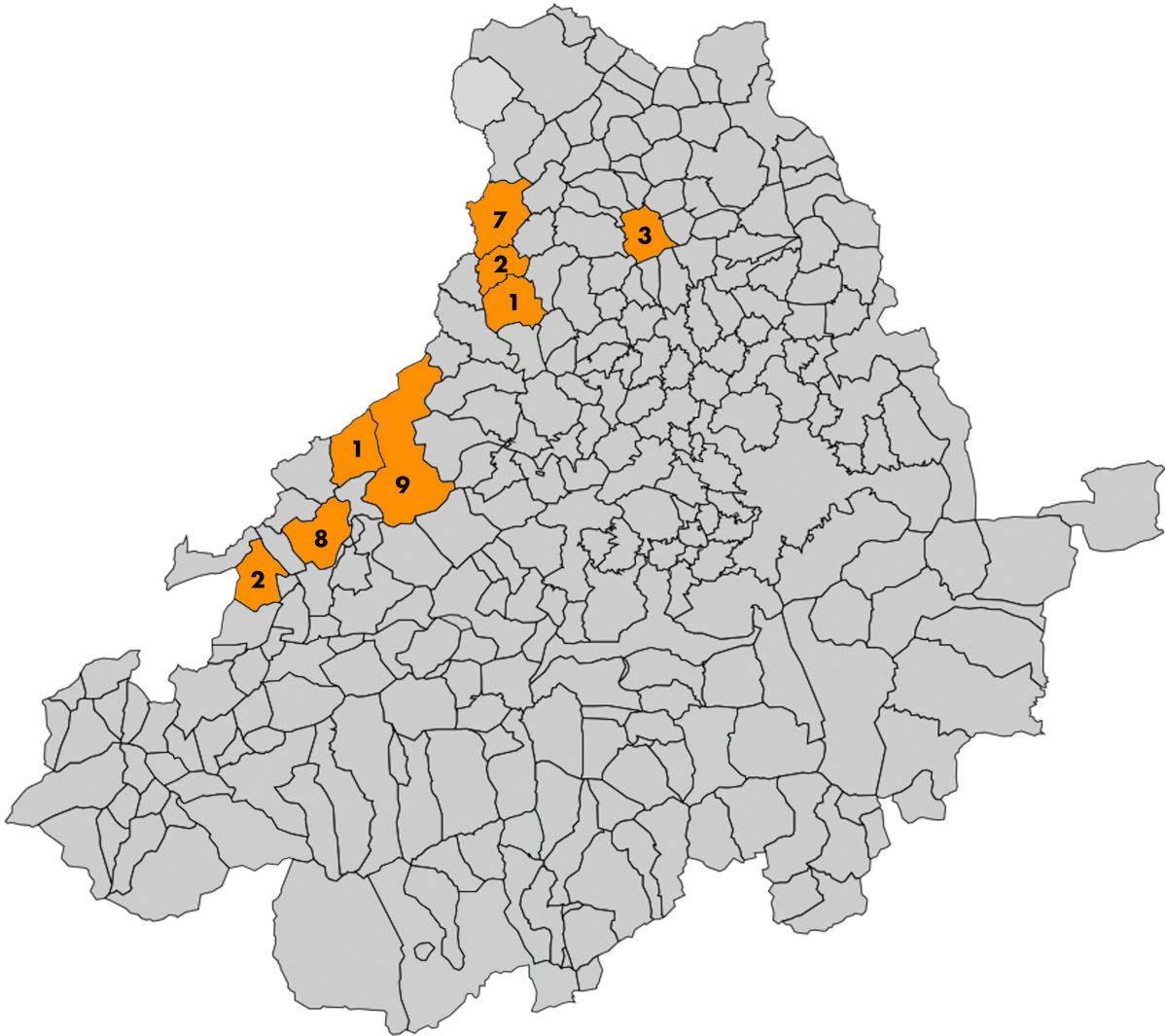


Figura 4.- Número de muestras de zorro y otros mesocarnívoros analizados por cada municipio de la provincia de Ávila en búsqueda de *Trichinella* spp.

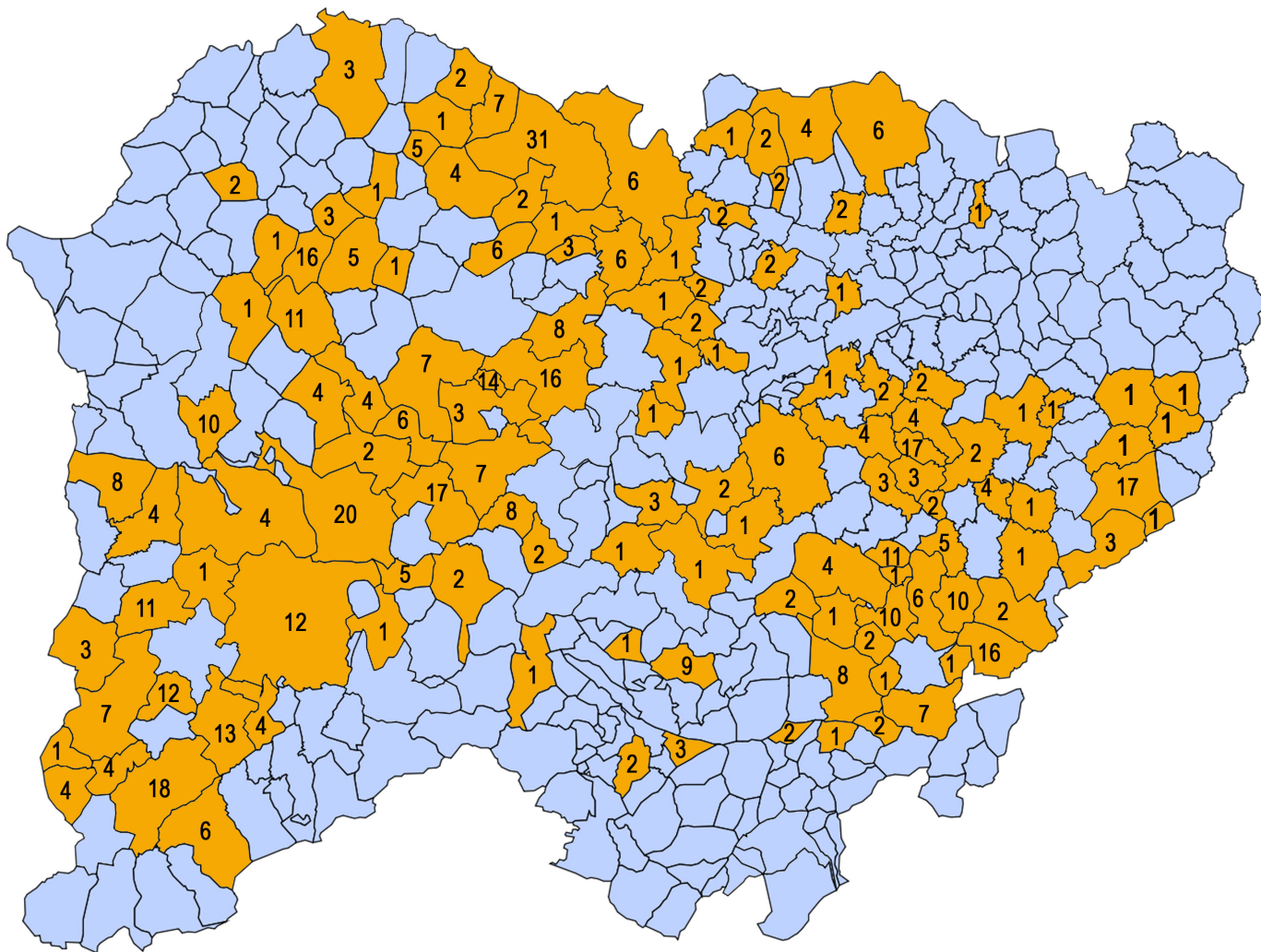


Figura 5.- Número de muestras de zorro y otros mesocarnívoros analizados por cada municipio de la provincia de Salamanca en búsqueda de *Trichinella* spp.

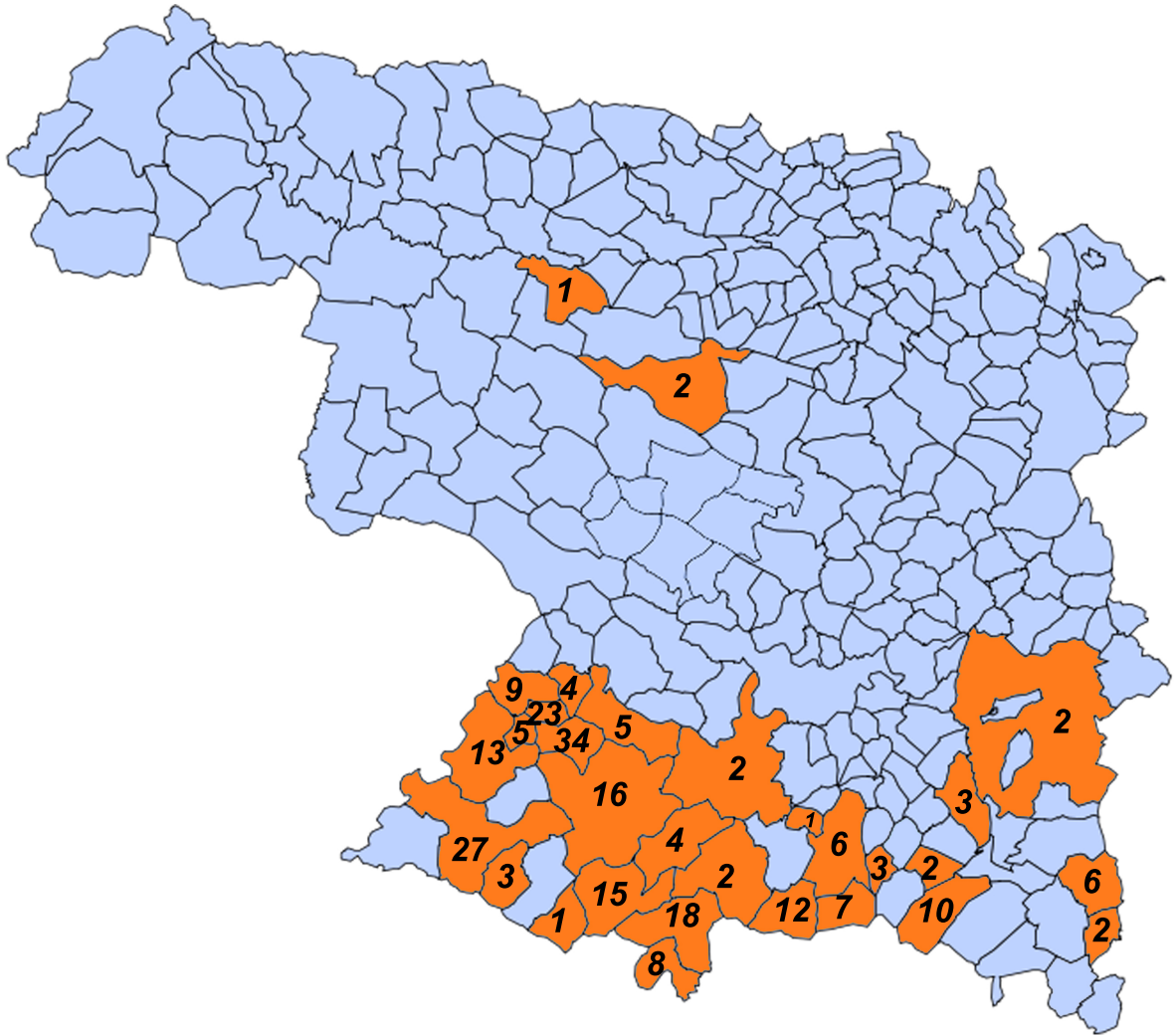


Figura 6.- Número de muestras de zorro y otros mesocarnívoros analizados por cada municipio de la provincia de Zamora en búsqueda de *Trichinella* spp.

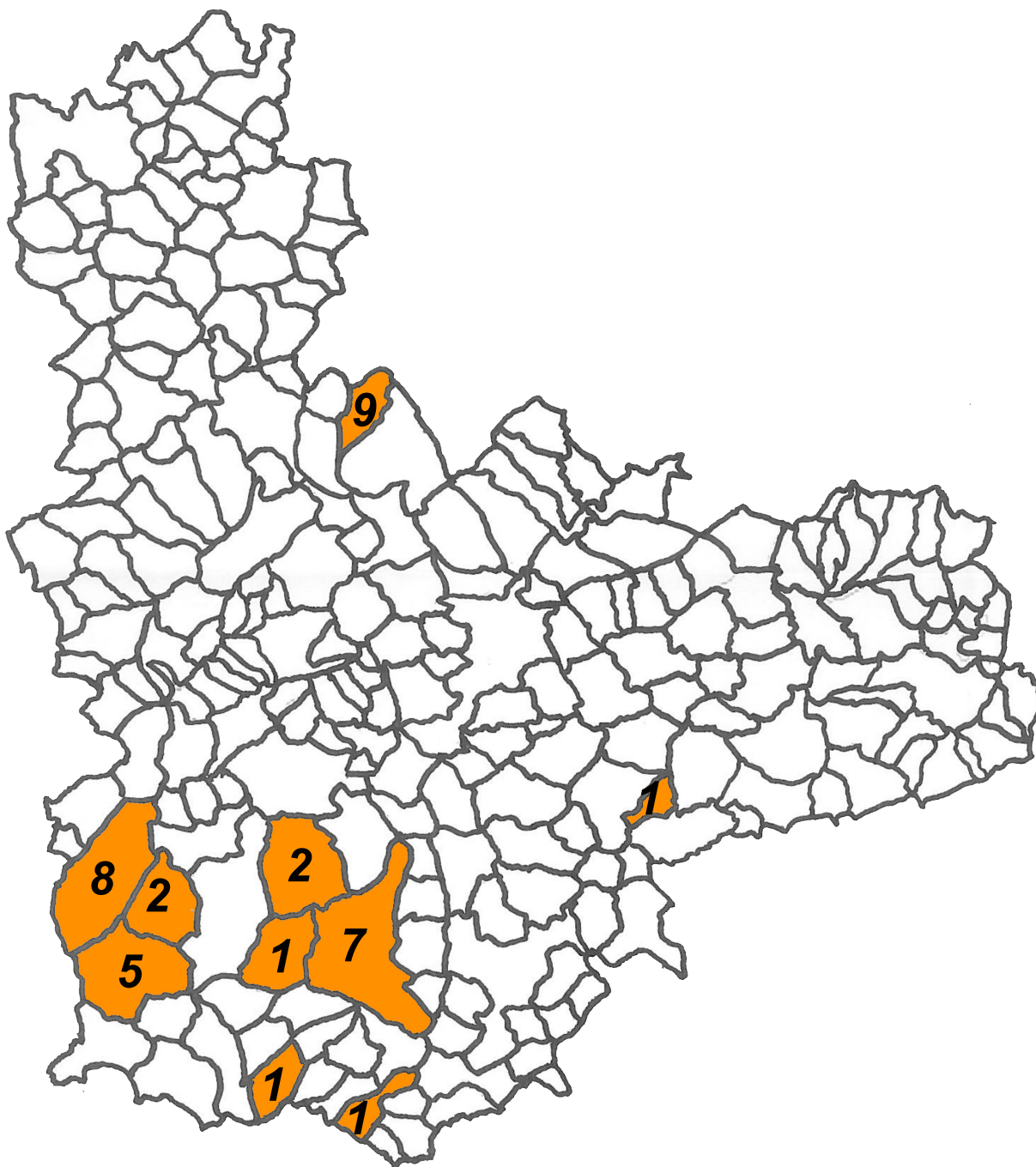


Figura 7.- Número de muestras de zorro y otros mesocarnívoros analizados por cada municipio de la provincia de Valladolid en búsqueda de *Trichinella spp*

Resultados

El análisis de las muestras permitió detectar la presencia de zorros positivos en las provincias de Salamanca y de Zamora, si bien también se evidenció positividad en otros mesocarnívoros, hecho este último que no ocurrió en el primer trabajo presentado y publicado mediante comunicación a un congreso. Por tanto, la ampliación del muestreo permitió la detección de 2 mesocarnívoros positivos (jineta y garduña). En la tabla 20 se detallan todos los casos confirmados positivos a *Trichinella spp.* encontrados gracias a este trabajo experimen-

tal. En alguno de los casos no fue posible determinar la carga parasitaria (número de larvas por gramo de carne o LPG) debido a problemas logísticos (congelación de las muestras), falta de muestra suficiente, etc.

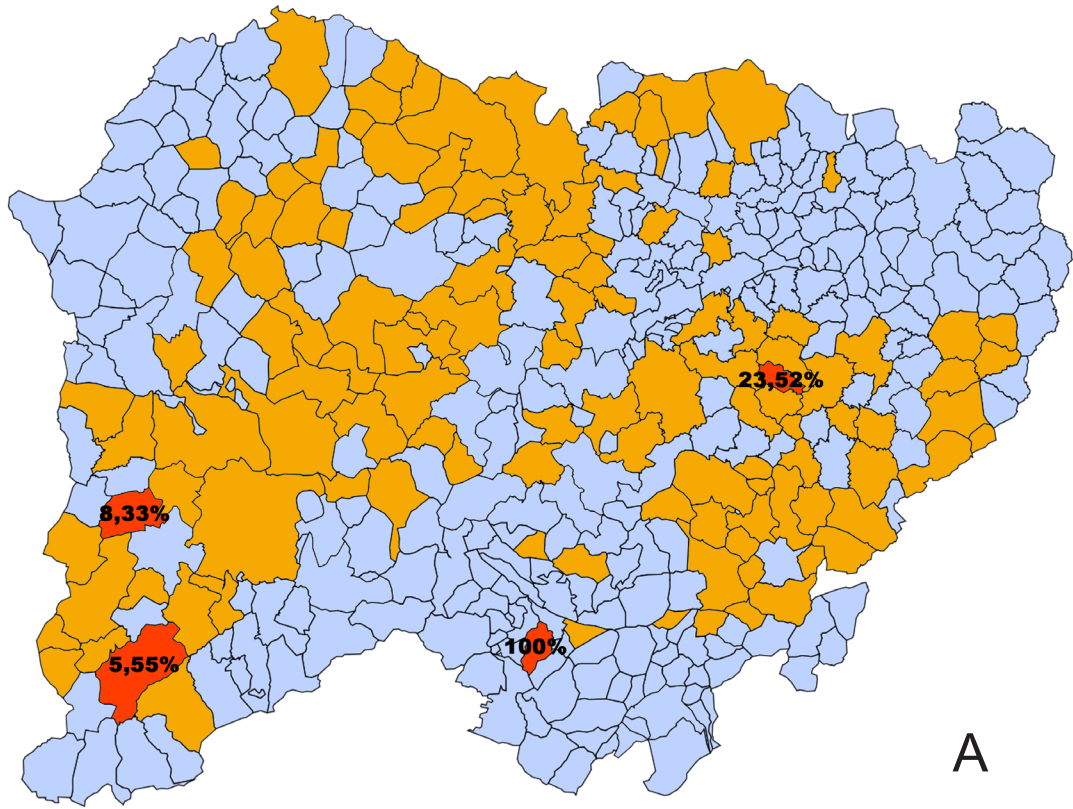
Sobre el total del muestreo efectuado (n= 910), la prevalencia encontrada (zorros + mesocarnívoros) de *Trichinella* spp, fue del 1,098 %, ya que se encontraron un total de 10 animales positivos. Si tenemos en cuenta solamente el análisis en zorros (n=805), la prevalencia fue del 0,99, hallándose 8 animales positivos. Finalmente, respecto a otros pequeños mesocarnívoros, se detectaron 2 animales positivos entre 105 analizados, lo que equivale a una prevalencia del 1,904 %.

Por provincias, solamente en Salamanca y en Zamora se encontraron animales positivos. En Salamanca, se observó una prevalencia del 1,346% sobre el total de animales muestreados (n=594; 8 positivos) y del 1,353% si se analizan solamente los zorros (n=517; 7 positivos). Por su parte, en Zamora la prevalencia global de *Trichinella* spp fue del 0,813% (n= 246; 2 positivos), mientras que alcanzó el 0,456% entre los zorros analizados (n=219; 1 positivos)

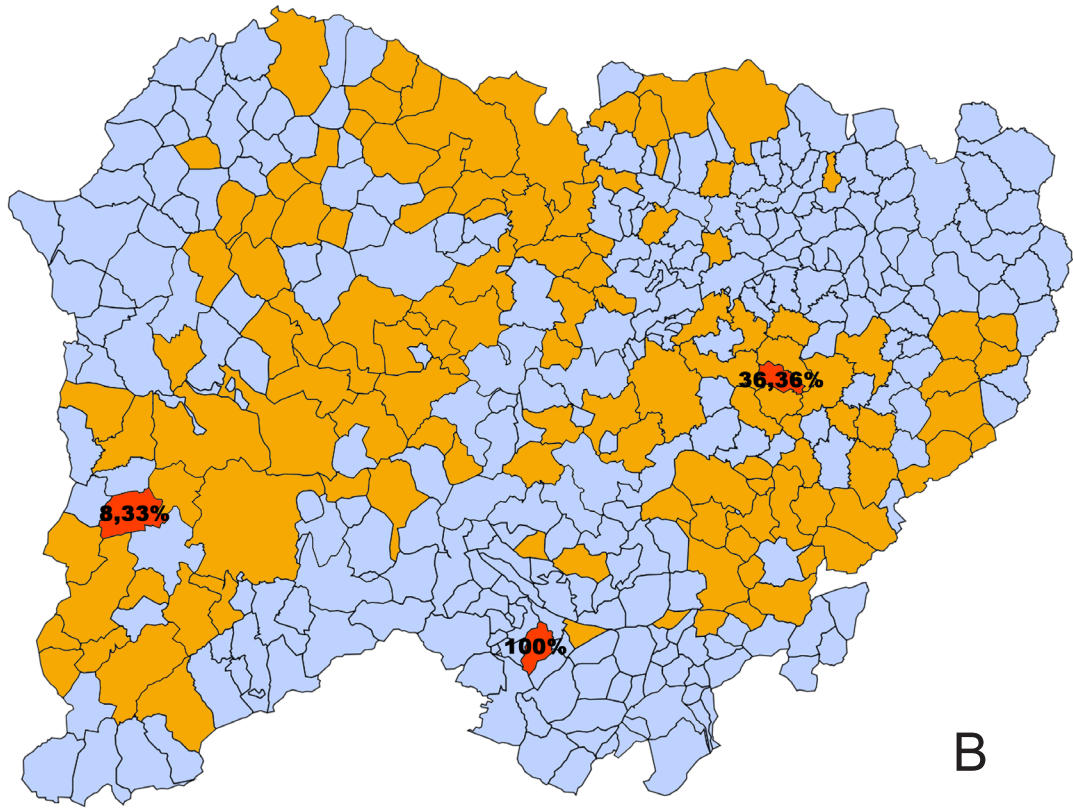
La prevalencia de la *Trichinella* por municipios es variable, si bien es importante mencionar que el número de animales analizados varió de forma considerable entre ellos. Se detectó algún animal positivo en 6 municipios de Castilla y León (4 en Salamanca y 2 en Zamora), figura 8, 9 (anexo 3 de esta tesis). En Luelmo (Zamora), se detectó un animal positivo de 34 muestras totales, por lo que la prevalencia en este municipio fue del 2,94%. Sin embargo, llegó al 23,52% en Valdemierque (Salamanca), ya que se observaron 4 casos positivos de un total de 17 analizados. En otros municipios, como Miranda del Castañar (Salamanca), aunque el muestreo no fue representativo la presentación de *Trichinella* spp, encontrada revelo que todos los animales analizados fueron positivos (2 de 2), lo que podría indicar que en esa zona se da una alta prevalencia de *Trichinella* spp, en los animales de vida silvestre.

La imagen global de estos mapas epidemiológicos evidencia varias zonas de especial riesgo de presencia de *Trichinella* spp en animales silvestres. Concretamente, se establecen tres áreas en la provincia de Salamanca y una más en la de Zamora (figura 8, 9).

Respecto de las especies de *Trichinella* encontradas, se puede observar que en la zona de estudio se dan tres posibilidades: infecciones por *T. britovi*, que parece ser la especie más frecuentemente asociada a ciclos de vida silvestres; infecciones por *T. spiralis*, especie normalmente más relacionada, según la bibliografía, a los ciclos de vida domésticos; e infecciones conjuntas de las dos especies. En el municipio de Gallegos de Argañan (Salamanca), se detectó una infección mixta *T. britovi* y *T. spiralis* en un zorro. Es de reseñar igualmente lo que se encontró en los 2 únicos zorros que se muestrearon en Miranda del Castañar (Salamanca), en los que resultaron ambos positivos, si bien uno estaba infectado por *T. britovi* y el otro por *T. spiralis*, lo cual implicaría una fuente de infección distinta para cada uno de ellos.

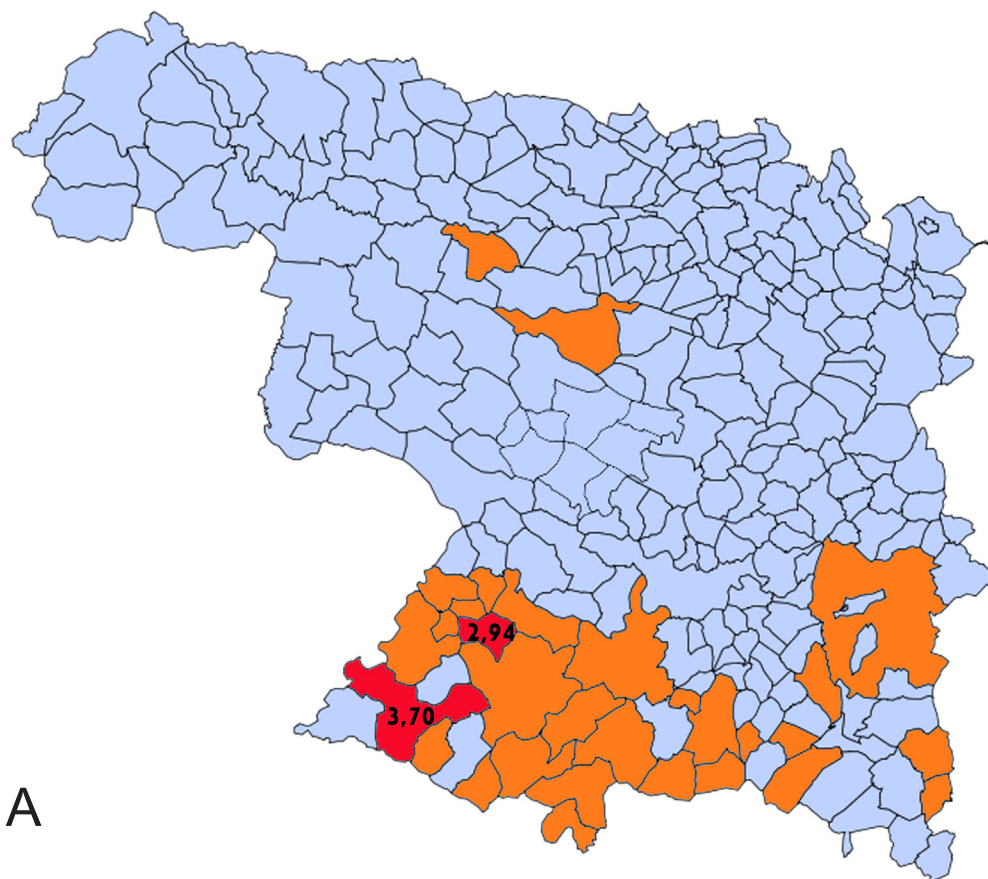


A

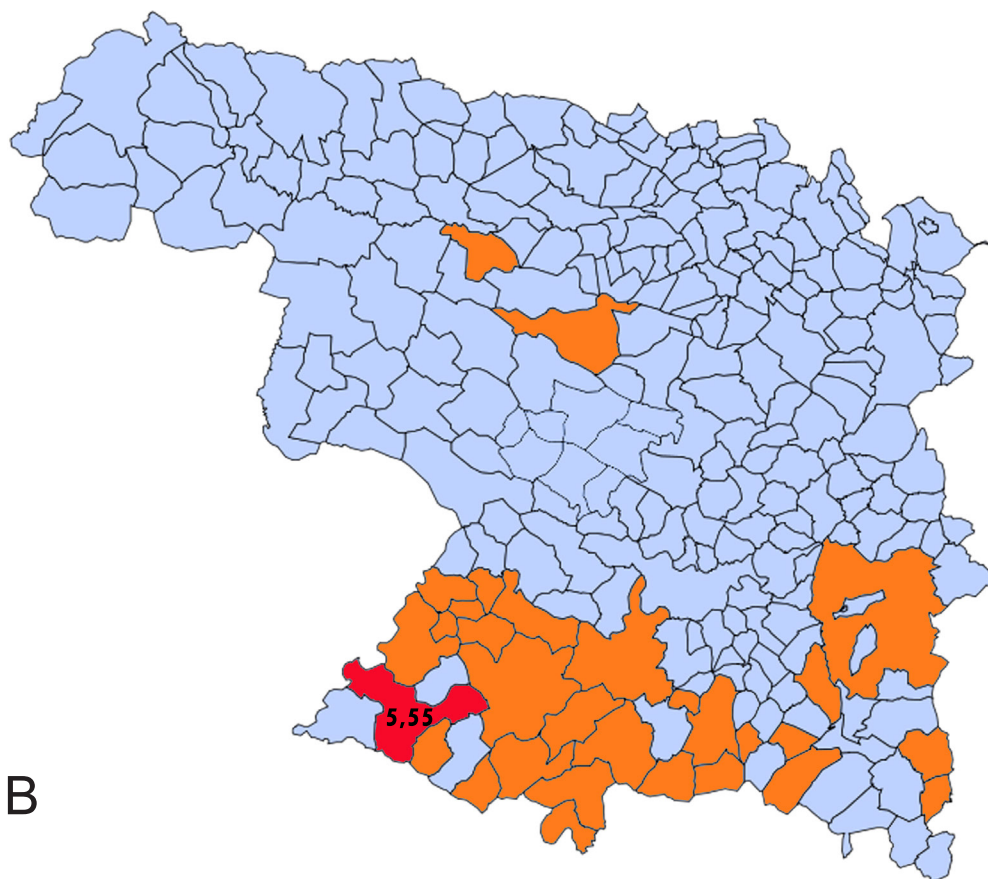


B

Figura 8.- Municipios muestreados en la provincia de Salamanca (coloreados). Representación de la prevalencia *Trichinella* spp (en rojo), en el total de hospedadores silvestres (A). Representación de la prevalencia en el zorro de *Trichinella* spp (B).



A



B

Figura 9.- Municipios muestreados en la provincia de Zamora (coloreados). Representación de la prevalencia *Trichinella spp* (en rojo), en el total de hospedadores silvestres (A). Representación de la prevalencia en el zorro de *Trichinella spp* (B).

Tabla 20.- Resultados obtenidos para *Trichinella spp.*, en la zona de estudio.

Identificación	Edad / Sexo	Especie		Localización	Nº larvas/ gr	Especie Parásita	Publicado
		Nombre vulgar					
Z1 (15081611)	5 años Hembra	<i>Vulpes vulpes</i> Zorro		41° 19' 41,08" N / 6° 11' 14,79" W Villar del buey (Zamora)	4,33 LPG	<i>T. britovi</i> XX SOCEPA	Congreso
Z2 (17091604)	5 años Hembra	<i>Vulpes vulpes</i> Zorro		40° 49' 17" N / 5° 35' 00" W Valdemierque (Salamanca)	7,86 LPG	<i>T. britovi</i> XX SOCEPA	Congreso
Z3 (18091607)	7 meses Macho	<i>Vulpes vulpes</i> Zorro		40° 49' 17" N / 5° 35' 00" W Valdemierque (Salamanca)	24,00 LPG	<i>T. britovi</i> XX SOCEPA	Congreso
Z4 (15011704)	2 años Macho	<i>Vulpes vulpes</i> Zorro		40° 29' 3" N / 5° 59' 50" W Miranda del Castañar (Salamanca)	36,63 LPG	<i>T. britovi</i> XX SOCEPA	Congreso
Z5 (22031702)	2 años Macho	<i>Vulpes vulpes</i> Zorro		40° 37' 52" N / 6° 42' 17" W Gallegos de Argañan (Salamanca)	1,18 LPG	<i>T. spiralis</i> + <i>T. britovi</i> XX SOCEPA	Congreso
Z6 (01051701)	1 año Macho	<i>Vulpes vulpes</i> Zorro		40° 29' 3" N / 5° 59' 50" W Miranda del Castañar (Salamanca)	8,33 LPG	<i>T. spiralis</i> XX SOCEPA	Congreso
Z7(13071701)	5 años Macho	<i>Vulpes vulpes</i> Zorro		40° 49' 17" N / 5° 35' 00" W Valdemierque (Salamanca)	2.2 LPG	Sin determinar	Pendiente publicar
Z8(23121701)	1 año Hembra	<i>Vulpes vulpes</i> Zorro		40° 49' 17" N / 5° 35' 00" W Valdemierque (Salamanca)	0.15 LPG	Sin determinar	Pendiente
J1(13011802)	1 año Hembra	<i>Genetta genetta</i> Jineta		40° 25' 2" N / 6° 42' 11" W Fuenteguinaldo (Salamanca)	50.00 LPG	Sin determinar	Pendiente publicar
G1(02121801)	2 años Macho	<i>Martes foina</i> Garduña		41° 24' 43" N / 6° 7' 36" W Luelmo (Zamora)	Sin determinar	Sin determinar	Pendiente publicar

Capítulo 6.- Discusión general

En cuanto al zorro como especie centinela.

El zorro ha demostrado ser una buena especie centinela para la vigilancia pasiva de *Trichinella* spp y *Spirocercas vulpis*, ya que es un animal que resulta fácil de monitorizar, gracias a la gestión cinegética que se realiza sobre él para su control poblacional, siendo además una especie abundante en los ecosistemas de dehesa, que permite tener una amplia representatividad y extrapolación de los resultados obtenidos en el amplio número de animales muestreados. En cuanto al análisis de las enfermedades parasitarias objeto de este estudio, que se han definido por sus ciclos de transmisión (directo e indirecto), el zorro ha permitido monitorear ambos tipos de ciclos, como ya describiesen con anterioridad otros autores (Serrano, 2004; Rodríguez, 2015).

En cuanto a la zoonosis causada por *Trichinella* spp.

El zorro es un depredador generalista, que usa recursos naturales en función de su disponibilidad y, por lo tanto, es un animal oportunista en su comportamiento (Webbon *et al.*, 2006; Dell'Arte *et al.*, 2007). Su gran habilidad para utilizar los recursos alimenticios existentes, le permite colonizar diversos hábitats (Fedriani, 1996; Gortázar, 1998). En ambientes antropizados, aproximadamente la mitad de la dieta del zorro está compuesta por basura y carroña de animales domésticos (Palomo *et al.*, 2007), por lo que su proximidad al hombre, lo convierten en un buen candidato para su elección como centinela en el monitoreo de *Trichinella* spp (Balestrieri *et al.*, 2007; Rodríguez, 2015). Nuestros datos de muestreo indican que, en una escala espacial más reducida, como puede ser el municipio, esta especie centinela se encuentra parasitada por varias especies de *Trichinella*, como ocurrió en el municipio de Miranda del Castañar (Salamanca), donde se encontró un zorro parasitado por *T. spiralis* y otro parasitado por *T. britovi*.

Los casos positivos a *Trichinella* en zorro se localizan geográficamente en las provincias de Salamanca y Zamora, lugares donde se explota el cerdo ibérico en régimen extensivo para el aprovechamiento de los recursos naturales de la dehesa, circunstancia ya descrita por otros autores (Pérez-Martín *et al.*, 2007). No se debe subestimar la presencia de *Trichinella* spp. en el medio silvestre, por pequeña que parezca la prevalencia, con cifras que, como aquí describimos, oscilan entre el 1% y el 2%, puesto que una sola carroña infectiva traslada exponencialmente la dispersión a múltiples mesocarnívoros, los cuales mantendrán el ciclo y lo dispersarán. Debido al pequeño tamaño corporal de los mesocarnívoros silvestres estudiados, la capacidad de ingestión de carne de estas carroñas, que será proporcional a su tamaño, supone poca cantidad en masa ingerida, por lo que una gran masa de carroña de jabalí daría para alimentar a varios mesocarnívoros que podrán dispersar la infección posteriormente a otras áreas y otros hospedadores. Diversos autores, como Gottstein *et al.* (2009) y Pozio *et al.* (2010) y organismos como la European Commission (2001), y la OIE (2018) han estudiado *Trichinella* spp. desde la perspectiva de la vigilancia y del control oficial/no oficial, como problema de salud pública, y también de sanidad animal, abarcando todas las especies animales domésticas y salvajes implicadas. Se ratifica el método de digestión de referencia que plantea el Reglamento de Ejecución (UE) 2015/1375, así como el método propuesto por la norma ISO 18743:2015 en el Reglamento de Ejecución (UE) 2020/1478, como métodos válidos para la

detección de pequeñas cargas parasitarias en fauna silvestre, siempre teniendo en cuenta las peculiaridades de estas carnes en los procesos de digestión, como son completar adecuadamente los tiempos de digestión establecidos, los tiempos de decantación, posibles aclarados del sedimento o filtrados exhaustivos por los tamices.

Nuestro estudio epidemiológico sobre *Trichinella* spp. en el zorro rojo arrojó una prevalencia total del 0,99%, en un total de 805 animales analizados. Estudios en Cataluña muestran prevalencias inferiores a la encontrada en este trabajo, alcanzando el 0,30% (López-Olvera *et al.*, 2011). Sin embargo, nuestro estudio difiere de otros con tasas mucho más altas, como el 8,95% de prevalencia en zorros analizados en Guadalajara (Criado-Fornelio *et al.*, 2000), o el 15,5% en Soria (Lledó *et al.*, 2015). En una zona próxima a la de este estudio, dentro del territorio portugués, se encontró una prevalencia del 13,3% en zorros (n=206), en la zona de Beira interior. Esto remarca la importancia del zorro en la epidemiología de la trichinellosis en Portugal (Fazendeiro *et al.*, 2004). En otras Comunidades autónomas limítrofes a CyL, como Extremadura, la prevalencia informada en zorros en el periodo comprendido entre los años 1988-1995 fue del 4,8% (Pozio *et al.*, 1997a). Estudios posteriores en Extremadura describen la prevalencia para el zorro en el 3%, con unas cargas parasitarias medias encontradas por digestión enzimática de 30,6 larvas por gramo de carne (LPG). La evolución de los casos en esta misma región extremeña entre 2003 y 2005, evidencian una subida hasta el 3,59% en zorros, siendo mucho mayor que la obtenida para el jabalí, que fue del 0,17% (Pérez-Martín *et al.*, 2007). Como puede comprobarse, los datos obtenidos en el desarrollo de esta Tesis se encuentran por debajo de esas cifras, pero hemos de tener en cuenta que han transcurrido casi dos décadas, y, sin embargo, se comprueba que la infección en el ciclo de vida silvestre continua en la actualidad. Todo ello, pese a llevar también varias décadas aplicando una estricta legislación comunitaria en el control de la trichinellosis en el ámbito doméstico, pero que no ha logrado erradicar esta parasitosis en el medio silvestre. Actualmente la infección aún está activa en una pequeña parte de las producciones porcinas domésticas, y mayor aún si hablamos de carnes de jabalí. Si relativizamos los datos a comarcas o municipios más concretos, las cifras de prevalencia ascienden rápidamente, llegando a encontrar municipios donde las prevalencias son del 23,52% sobre un total de 17 muestras examinadas para ese municipio (Valdemierque), lo que convierte esos ecosistemas en lugares de alto riesgo. De los resultados que aquí informamos se puede concluir que, mientras en el ecosistema exista un reservorio silvestre de esta parasitosis y en la medida que el ecosistema está influenciado por el hombre y el cambio climático, seguirá existiendo un riesgo potencial para la salud humana, por lo que nada nos indica que podamos relajar las medidas de vigilancia y prevención frente a esta zoonosis parasitaria. Estos datos están en concordancia con lo publicado por Pozio (2020), quien argumenta que la globalización y el cambio climático tendrán un tremendo impacto sobre estos parásitos transmitidos por los alimentos. Se producirá una modificación de los patrones epidemiológicos de estas enfermedades debido a los complejos cambios de parámetros bióticos y abióticos en el ecosistema, por lo que será muy difícil prever las consecuencias de esas modificaciones. Es importante que biólogos, epidemiólogos, médicos, veterinarios y otros profesionales aborden el problema conjuntamente dentro de un enfoque de una sola salud. Por todo ello, estudios de este tipo en la fauna silvestre se hacen necesarios.

Las cargas parasitarias resultaron ser variables, con un promedio de 13,2 LPG, siendo inferior a las cargas encontradas previamente en zorros extremeños (30,6 LPG) (Pérez-Martín *et al.*, 2000). Tal vez las diferencias se deban a factores ambientales, como el nivel de altitud promedio o la dominancia de la vegetación. Históricamente, los valores de prevalencia más altos se asociaron a 500 m sobre el nivel del mar y se redujeron cuando otros recursos (cultivos, árboles frutales y abundancia de ganado como aves y ovejas) están disponibles para los zorros, proporcionándoles una dieta suplementaria distinta de las fuentes asociadas a *Trichinella* spp., en carroñas (jabalíes) a estos carnívoros en su alimentación (Pozio, 1998).

En el hombre está descrito que la ingestión de más de 10 larvas por gramo entraña un alto riesgo para la salud (Teunis *et al.*, 2012). La guía de la FAO (2007) sobre triquinelosis cita, acerca de la dosis infectiva, que carnes con 1 LPG cuando se toman como ingesta habitual, llegando a unos 150 g de carne (unas 150 larvas), son suficientes para provocar triquinelosis clínica. En resumen, según la guía FAO, en el caso de *T. spiralis*, la dosis infectiva mínima en el hombre es de 100-300 larvas. Por su parte, una ingesta de 1.000-3.000 larvas puede provocar una trichinelosis grave. En este estudio, se han encontrado bajas cargas parasitarias en el zorro o en otros mesocarnívoros, pero se ha de tener en cuenta que la capacidad de ingesta del ser humano de carne de suidos (tanto silvestres como domésticos) es muy superior a la de estos mesocarnívoros.

Aunque en la fase inicial del estudio epidemiológico sobre *Trichinella* spp., en animales silvestres solo arrojó al zorro como animal infectado, la continuación del estudio confirmó que otros pequeños carnívoros también pueden ser reservorios de esta parasitosis. No obstante, más allá de esa cuestión, también se confirmó que cuando la infección se encuentra en un determinado ecosistema, puede implicar a todas las especies potencialmente carnívoras y omnívoras, en concordancia con lo descrito anteriormente por Dick & Pozio (2001). La escasez de infecciones en mesocarnívoros como hospedadores podría deberse al bajo número de muestras analizadas en el presente trabajo, ya que solamente estaban disponibles las encontradas fruto de atropellos o los cadáveres facilitados por agentes medioambientales. Es muy probable que un aumento del número de animales analizados conllevara probablemente un mayor número de animales positivos.

Finalmente, se ha observado una dominancia de *T. britovi* sobre *T. spiralis* en los animales positivos, hecho que también concuerda con otros trabajos realizados anteriormente en animales silvestres (Pozio *et al.*, 2004; Fonseca-Salamanca *et al.*, 2009; Pozio *et al.*, 2009b).

En cuanto a la transmisión de parasitosis de ciclo indirecto: *Spirocerca vulpis*.

Nuestro estudio sobre *Spirocerca* en zorros en diferentes provincias del oeste de España confirmó, mediante análisis moleculares, una alta homología de nuestras secuencias con la nueva subespecie *S. vulpis* descrita por Rojas *et al.* (2018a). Por tanto, en esta zona del oeste español, se confirma la preferencia de esta subespecie por el zorro como HD. De hecho, como ya fue descrito en los resultados, la totalidad de los zorros encontrados positivos, lo fueron a la nueva subespecie descrita *S. vulpis*. La variabilidad filogenética dentro del género

concuerta con los recientes descubrimientos presentados por algunos autores (Rojas *et al.*, 2018b y Sanchis-Monsonís *et al.*, 2019).

Este es uno de los primeros estudios de variables y factores de riesgo respecto a la presencia de *S. vulpis*, el primero en el oeste de España, mejorando así nuestra comprensión de su epidemiología y distribución en la PI. Nuestro estudio aporta un modelo predictivo, en el que las variables número de zorros muestreados en cada municipio, la época del año, edad de los animales y sobre todo las variables topoclimáticas, que a su vez condicionan también el número y características de los HI, son los parámetros que determinan la ocurrencia y la prevalencia de *S. vulpis*.

Mediante el trabajo presentado en esta Tesis, publicado en 2020 (Martín-Pérez *et al.*, 2020), se ha logrado establecer la prevalencia de la espirocercosis en el zorro en el 6.09% en esta zona del oeste de España. Dada la gran cantidad de animales analizados (n=1644) y la amplia zona de muestreo chequeada, los resultados son bastante consistentes, pudiendo confirmar de forma fehaciente las zonas de distribución de esta parasitación. Estudios previos realizados en España, indican una prevalencia inferior a la encontrada en el presente trabajo, ya que solo se encontró la presencia de *Spirocerca* en menos del 2,5% de los animales analizados del noreste de la PI (Gortázar, 1997; Segovia *et al.*, 2004). Sin embargo, en la Comunidad Autónoma valenciana (este de España), un estudio sobre 286 zorros en una zona no muy amplia evidenció una prevalencia del 22% (Sanchis-Monsonís, 2015; Sanchis-Monsonís *et al.*, 2019). Por su parte, en la parte central de la PI, concretamente en la provincia de Ciudad Real, un estudio de Valcárcel *et al.*, en 2018, estableció la prevalencia para *S. lupi* en el 18.03%. No obstante, el estudio de Valcárcel *et al.* (2018), está basado en un número muy reducido de zorros (n=61), por lo que, si comparamos esos datos con determinados municipios de nuestra zona de muestreo, se obtienen unas cifras de prevalencia equivalentes, incluso en algunas zonas analizadas en nuestros estudios se llegaron a alcanzar cifras por encima del 33% de prevalencia.

Nuestros resultados también proporcionan datos sobre la importancia que tiene la metodología del muestreo cuando se trata de establecer un modelo predictivo. Así el número de zorros estudiados en cada municipio (SB) ayuda a explicar la aparición y prevalencia de la espirocercosis. Debido a que había una mayor probabilidad de identificar casos positivos de infección cuando se examinaban más zorros, la detección de infección debería requerir un muestreo extenso. En consecuencia, concluir que un municipio está libre de infección es arriesgado, debido a la baja prevalencia de infección en el oeste de España (6%) y, sobre todo, si el muestreo incluye un bajo número de zorros analizados. Cuando solo se consideran los datos de aquellos municipios con casos positivos, la prevalencia es mayor si el número de zorros recolectados es bajo. Este resultado también puede ser consecuencia de sesgos de muestreo.

En otras áreas del sur de Europa con climas similares, la prevalencia encontrada en zorros varió del 9.16% al 23.5% en Italia (Ferrantelli *et al.*, 2010; Magi *et al.*, 2015) y el 12.9% en Portugal (Eira *et al.*, 2006b). La prevalencia de *Spirocerca* spp., difiere ampliamente entre

localidades, a pesar de climas similares entre zonas y regiones. Esto sugiere que la influencia de factores de riesgo a nivel local (vegetación local, concentración de agua, presencia y concentración de hospedadores, tipo de suelo, densidad humana, etc.) puede desempeñar un papel decisivo en la prevalencia de esta parasitosis. En general, parece claro que los factores que más afectan a la prevalencia de *Spirocercia spp.*, son la presencia de HI y HP en el ambiente, así como la densidad de HD infectados en áreas específicas (Urquhart *et al.*, 1996; Du Toit *et al.*, 2008).

En nuestro estudio, el mayor porcentaje de infección en zorros se encuentra durante los meses de invierno, datos que coinciden con estudios recientes en la PI, en un área de clima mediterráneo, donde la mayor probabilidad de encontrar *S. vulpis* fue a temperaturas de 4°C, disminuyendo muy por encima de 21°C o por debajo de 2°C (Sanchis-Monsonís *et al.*, 2019). De acuerdo con los resultados de estudios previos realizados en perros, la estacionalidad en la aparición de espirocercosis en el HD puede explicarse por la estacionalidad del HI (Mazaki-Tovi *et al.*, 2002; JyothiSree & Hafeez, 2013). Según el ciclo de vida del parásito, la mayor incidencia en zorros ocurriría entre los 3 y 6 meses después del período de máxima actividad de los escarabajos coprófagos (Van der Merwe *et al.*, 2008). En nuestra área de estudio, se ha demostrado que la actividad de estos escarabajos tiene dos máximos anuales claros, como es típico en las regiones mediterráneas: finales de primavera y principios de otoño (Cabrerro-Sañudo *et al.*, 2008). Esto implicaría que los zorros se infectan con mayor frecuencia en la temporada de otoño, debido a la ingestión de escarabajos infectados. Estas circunstancias podrían ser debidas a múltiples razones, incluido un mayor consumo de frutas y coleópteros por parte de zorros oportunistas a finales de verano y principios de otoño (Carvalho & Gomes, 2004; Santos *et al.*, 2007; Díaz-Ruiz *et al.*, 2013). Esto también podría deberse al aumento del consumo de ciertas especies de escarabajos estercoleros, dependiendo de la estación del año, cuando el zorro tiene que diversificar su dieta para sobrevivir. Rau *et al.* (1987) sostienen que la dieta del zorro en el área mediterránea es muy versátil y que puede ser debida, en parte, a las diferencias locales de disponibilidad de presas y al elevado oportunismo trófico de estos animales. Por su parte, también, Dell'Arte *et al.* (2007) comprobaron que los zorros realizan un mayor consumo de plantas e insectos durante el verano, posiblemente por carencia de otras fuentes alimenticias.

Nuestros resultados también muestran que la edad del zorro es relevante para explicar la presencia de espirocercosis. La mayor proporción de casos positivos ocurrió en zorros jóvenes, entre 1 y 2 años. A estas edades, los animales necesitan un alto consumo de proteínas y es más probable que busquen activamente insectos, como los escarabajos coprófagos y otros posibles hospedadores intermediarios o paraténicos de *Spirocercia spp.* (NRC, 1982). Sanchis-Monsonís *et al.* (2019) observaron que la prevalencia de la espirocercosis en los zorros era mayor en animales mayores de 6 meses que en la descendencia, un hecho explicado por el largo ciclo de vida del nematodo. Es difícil establecer una comparación clara de este último trabajo con nuestros resultados, ya que consideraron animales adultos a partir de los 6 meses y nuestro criterio de clasificación estableció la edad adulta después del año de vida, encontrando las tasas más altas de infección en animales entre 1 y 2 años. En perros,

Lobetti (2000, 2014) no identificó un grupo de edad específico en riesgo de infección por *S. lupi*. Sin embargo, algunos estudios han informado que los perros de entre 1 y 4 años son los más comúnmente afectados (Chhabra & Singh, 1972; Dixon & McCue, 1967). Otros estudios realizados en perros encontraron que los animales de 1 año o menos tenían el menor riesgo de infección por espirocercosis y la mayor probabilidad de infección ocurriría en animales de 5 o más años (Mazaki-Tovi *et al.*, 2002; Sasani *et al.*, 2012; Aroch *et al.*, 2015a). Estudios recientes describen la presencia de *S. lupi* en perros desde la edad de 6 meses en adelante (Brenner *et al.*, 2020), lo cual aproxima bastante la edad de presentación a lo encontrado en este trabajo, en el que observamos infección de *S. vulpis* en diferentes edades de zorros, pero la incidencia más alta se produjo en animales jóvenes, a pesar del ciclo de 140-161 días después de la infección.

La densidad de los HI (escarabajos coprófagos) en un área determinada puede influir en la variación en la prevalencia de la infección, teniendo en cuenta, además, que esta densidad está relacionada con otros factores, como el sustrato del suelo, las condiciones climáticas, la densidad del ganado y/o los métodos agrícolas de cultivo (Bailey, 1972; Lumaret *et al.*, 1992; Gottlieb *et al.*, 2014). De hecho, los valores de prevalencia más altos de *S. vulpis* se encontraron en las áreas de dehesa con una alta densidad de ganado y especialmente con alta densidad de cerdo ibérico, que come bellotas durante el otoño y el invierno (provincias de Salamanca y Zamora). En estas áreas, hay una mayor disponibilidad de fuentes de alimentos para los escarabajos coprófagos, lo que significaría una mayor densidad de estos HI, y a su vez, una mayor probabilidad de infección por parte de los zorros. Estos resultados son concordantes con los obtenidos por Frediani (1996) en el coto de Doñana, quien encontró un mayor porcentaje de escarabajos coprófagos en las heces de zorros que habitan sobre pastos, en comparación con los que habitan en el bosque, lo que podría explicarse por la presencia de una mayor densidad de ganado en estos pastizales. El papel de las especies de escarabajos coprófagos como HI de *S. lupi*, puede entenderse considerando que la mayor parte de estos escarabajos del paleártico occidental se sienten atraídos por diferentes tipos de estiércol (Martín-Piera & Lobo, 1996; Frank *et al.*, 2018). Aquellas áreas naturales con una alta densidad de ganado tienen una mayor riqueza de especies, abundancia y biomasa de escarabajos coprófagos, por consiguiente, son áreas donde existe una mayor probabilidad de infección por *Spirocerca* spp. a los cánidos silvestres (Lumaret *et al.*, 1992; Galante *et al.*, 1995; Lobo *et al.*, 2006).

Los resultados sugieren que, tanto la aparición de infecciones por *S. vulpis*, como la prevalencia en los municipios con casos positivos, parecen estar estructuradas espacialmente. Los valores de prevalencia más altos y con una mayor probabilidad de contraer infecciones por *Spirocerca* ocurrieron en la zona occidental del territorio estudiado, la situada en la frontera con Portugal. Sin embargo, este patrón espacial desaparece cuando se consideran las variables climáticas y de hábitat, lo que sugiere que un componente ambiental está en juego en la infección por *S. vulpis*. Algunos autores consideran que las variables climáticas, como la temperatura ambiente y la humedad, pueden explicar la tasa de infección en el HI. En estudios previos con nematodos filaroides, las altas temperaturas agravaron la infección de

los HI (Genchi *et al.*, 2009; Laaksonen *et al.*, 2010). Sin embargo, en condiciones más áridas, el riesgo de infección por *S. lupi* parece ser mayor en entornos combinados con riego y sombra durante el verano, mientras que una disminución de la humedad y un aumento de la temperatura provocarían también una disminución del riesgo de infecciones por *S. lupi* (Gottlieb *et al.*, 2011; 2014). Nuestros resultados indican que las variables climáticas tienen un mayor efecto en la presencia del parásito que las variables de hábitat, de modo que la ocurrencia, pero principalmente la prevalencia de *S. vulpis*, es mayor en las tierras bajas y las regiones más cálidas. En el área de estudio, estas tierras bajas están intercaladas con árboles y tienen las temperaturas mínimas y máximas medias más altas. Al igual que con la temperatura, la disminución de la humedad parece causar una disminución en las tasas de infección de los escarabajos coprófagos (Gottlieb *et al.*, 2014), coincidiendo con las conclusiones publicadas por Rojas *et al.* (2017a). En nuestro estudio explicamos que el papel del medio ambiente es más importante para explicar la proporción relativa de casos positivos en los municipios infectados ($\approx 64\%$) que para tener en cuenta la presencia-ausencia de *S. vulpis* ($\approx 48\%$). Esto sugeriría que la infección en una zona puede depender de factores locales idiosincráticos, pero cuando un territorio ha sido infectado, la prevalencia estará condicionada por factores ambientales.

Solamente el zorro resultó ser hospedador de *S. vulpis*, ya que no se encontró ninguna otra especie de mesocarnívoro infectado con *Spirocerca* en la región de estudio. Aunque en el estudio se incluyeron otros nueve mamíferos silvestres, además del zorro, en su mayoría pequeños mesocarnívoros, no se puede descartar su presencia en estos carnívoros ibéricos, ya que el número de muestras analizadas en estas otras especies no fue muy elevado. Numerosos autores han descrito *S. lupi* en miembros de la familia *Canidae*, especialmente en perros domésticos (*Canis familiaris*). En las poblaciones de lobos de la meseta ibérica del norte, se ha comprobado que *S. lupi* apareció en el 16% de los animales (Domínguez & de la Torre, 2002). También se ha descrito *S. lupi* en muchos animales domésticos, como cabras, ponis, burros, gatos domésticos, etc. (Ndiritu & Al-Sadi, 1976; Mense *et al.*, 1992). Del mismo modo, además del zorro rojo (Martínez *et al.*, 1978; Diakou *et al.*, 2012), otros autores han informado de espirocercosis en una amplia variedad de carnívoros salvajes, incluido el coyote (*Canis latrans*), el zorro gris (*Urocyon cinereoargenteus*), el lince (*Felis rufus*), el lobo (*Canis lupus signatus*), el perro arbusto neotropical (*Speothos venaticus*), el chacal de lomo negro (*Canis mesomelas*), el guepardo (*Acinonyx jubatus*) y los lémures (*Lemur fulvus*, *Lemur macaco*, *Lemur cattaurs*) (Murray *et al.*, 1964; Blancou *et al.*, 1976; Pence & Stone, 1978; Domínguez & de la Torre, 2002; Szczęśna & Popiołek, 2007; Rinas *et al.*, 2009; Bumby *et al.*, 2017). Más estudios, aumentando el número de ejemplares analizados, serían necesarios en esa búsqueda de posibles HD en el área de muestreo.

Según nuestros resultados, no hubo diferencias estadísticamente significativas en la aparición de espirocercosis según el sexo de los animales, como señalaron previamente otros autores también en zorros (Sanchis-Monsonís *et al.*, 2019) y en perros (Wandera, 1976; Mylonakis *et al.*, 2006; Chikweto *et al.*, 2012; Lobetti, 2014).

En cuanto al tipo y evolución de las lesiones ocasionados por *Spirocerca vulpis*.

La patogenia y la localización de las lesiones causadas por *S. vulpis* observadas en nuestros estudios, se describen como nódulos con una localización a nivel gástrico principalmente. Estos resultados son similares a los hallados por Rojas *et al.* (2018b), y muy probablemente también con otros autores como Ferrantelli *et al.* (2010); Al-Sabi *et al.* (2014) o Valcárcel *et al.* (2018), que refieren lesiones en zorro a nivel gástrico atribuyéndoselas a *S. lupi*, si bien aún no se había descrito la nueva subespecie *S. vulpis*. Por lo tanto, se confirma que la localización de las lesiones en zorro difiere de las presentadas en el perro, en los que los parásitos adultos se hallan sobre todo en nódulos en la pared esofágica (Mazaki-Tovi *et al.*, 2002). En perros, las migraciones aberrantes de L3 de *S. lupi* ocurren a través de las arterias mesentéricas, que llevan a un infarto del intestino delgado o grueso (Brenner *et al.*, 2020), y larvas aberrantes con migración hacia el sistema nervioso central, que pueden causar manifestaciones neurológicas graves (Rojas *et al.*, 2019). Estudios previos no encontraron nódulos en el epiplón gástrico o en la pared intestinal en el zorro, si bien en el presente trabajo sí se encontró un pequeño porcentaje de zorros con nódulos en esas localizaciones. Como ya hemos mencionado, la mayoría de los casos positivos (un 96,9%) presentaban nódulos de *S. vulpis* localizados en la zona gástrica (pared y/o epiplón), y solamente el 3,1% tenían nódulos en el intestino delgado. Sin embargo, en nuestro estudio no se encontraron nódulos en el pericardio o en la aorta, que sí refieren otros autores (Morandi *et al.*, 2014; Rojas *et al.*, 2018b), ni tampoco en ganglios linfáticos, que sí fue descrita como una localización de *Spirocerca* por parte de Reina *et al.* (1994). Por el momento se desconoce la especificidad de especie en el género *Spirocerca*, pero las lesiones en zorro también difieren de las encontradas en otros cánidos silvestres, como los chacales (*Canis mesomelas*), donde los nódulos también se encontraron en la aorta torácica, pero muy poco frecuentemente en la pared gástrica (Bumby *et al.*, 2017). Al-Sabi *et al.* (2014) planteó la hipótesis de que las ubicaciones atípicas podrían relacionarse con diferencias genéticas entre varios haplotipos de *S. lupi*. Los resultados de nuestro trabajo apoyan esta hipótesis, ya que la especie *S. vulpis* parece mejor adaptada al zorro al no encontrar la especie *S. lupi* en ninguno de los animales positivos. No obstante, creemos necesarios estudios complementarios que determinen molecularmente las especies que parasiten a otros hospedadores silvestres, así como estudiar las lesiones que producen en los distintos hospedadores.

En cuanto a la estructura e implantación del nódulo en las mucosas, uno de los artículos derivados de nuestros estudios (Martín-Pérez *et al.*, 2022), describe como el nódulo se comunica con la luz gástrica a través de un opérculo, a diferencia de migraciones aberrantes descritas para el perro a nivel del intestino, sin que se produzca esa comunicación del nódulo con la pared intestinal (Brenner *et al.*, 2020).

El tamaño de los nódulos encontrados en este estudio es similar a los descritos anteriormente y está correlacionado con el número de nematodos presentes en el interior de dicho nódulo, como también especificaban otros autores (Sanchís-Monsonis *et al.*, 2019; Rojas *et al.*, 2018b; Valcarcel *et al.*, 2018).

En ausencia de mitosis y células gigantes, todas las lesiones analizadas en este trabajo se clasificaron como no neoplásicas, a diferencia de las descritas en la espirocercosis en

perros que sí pueden llegar a desarrollar lesiones de carácter neoplásico (Van der Merwe *et al.*, 2008; Dvir *et al.*, 2010; Dvir *et al.*, 2011). Esta característica de la espirocercosis en zorros es uno de los hallazgos más importantes de este estudio.

Un punto en común a todas las muestras analizadas de los zorros positivos era la presencia de un infiltrado linfoplasmocitario de moderado a severo, como ya se observó en estudios precedentes analizando perros infectados por *S. lupi*. Las lesiones preneoplásicas en perros tenían de moderado a severo infiltrado linfoplasmocitario e infiltrado de colágeno (Dvir *et al.*, 2010). Rojas *et al.* (2019) sugirieron que el nódulo en perros progresa desde una lesión fibrocítica inflamatoria a un nódulo preneoplásico, caracterizado por la presencia de fibroblastos activos que eventualmente pueden sufrir transformación neoplásica hacia sarcoma. Por lo tanto, al no encontrar en el zorro transformación neoplásica no se ha visto la evolución de las lesiones a osteosarcoma o fibrosarcoma, como se describe en perro (Dvir *et al.*, 2010; Dvir *et al.*, 2011), o evoluciones provocadas experimentalmente en un modelo murino de xenoinjerto de sarcoma asociado a *S. lupi* (Stettner *et al.*, 2005).

En nuestro estudio, las células predominantes fueron linfocitos, neutrófilos y, en menor medida, células plasmáticas y macrófagos. Estudios en perros han destacado la presencia de leucocitosis como hallazgo significativo (Mylonakis *et al.*, 2001), además de un infiltrado severo de eosinófilos (Brenner *et al.*, 2020). En aquellas lesiones catalogadas como difusas en el presente estudio, otros tipos de células prevalecieron sobre los eosinófilos. La presencia de eosinófilos se ha asociado siempre con reacciones parasitarias, junto con una mayor capacidad de vasopermeabilización, facilitando la llegada de otras células a los focos de inflamación (Rothenberg *et al.*, 2006; Ortigoza *et al.*, 2009).

En este trabajo también se describe una alta presencia de neutrófilos en los nódulos, destacando significativamente los encontrados en las lesiones de tipo parcheadas sobre las de carácter difuso. En otros trabajos, como el realizado en perros Dvir *et al.* (2010), se encontró que en el 40% de las lesiones no neoplásicas, el infiltrado inflamatorio predominantemente fue de tipo linfoplasmocitario, en el 24%, el infiltrado fue mixto de linfocitos y neutrófilos, y en el 21% de las lesiones no neoplásicas predominaron los neutrófilos. En cambio, en el caso de las lesiones de carácter neoplásico, en el 25% de ellas el infiltrado fue de tipo linfoplasmocitario, en el 5% se observó un infiltrado de tipo mixto (linfocitos y neutrófilos), y en el 70% de los casos predominaban los neutrófilos. En las lesiones neoplásicas por *Spirocerca* en perros, las células mieloides y especialmente neutrófilos, juegan un papel importante en la inflamación local innata en respuesta a la infección por el parásito (Dvir *et al.*, 2010). Entre las propiedades que clásicamente se les han atribuido a las poblaciones de neutrófilos están las de mediar en el daño tisular a través de la liberación de citocinas, proteasas y otros factores contenidos en sus gránulos citoplasmáticos y, por lo tanto, regulando la respuesta adaptativa de la inmunidad, incluida la activación de células T y células B (Appelberg, 2007; Kobayashi, 2008; De Oliveira *et al.*, 2016).

En los nódulos analizados en nuestro estudio, la necrosis estaba presente en una baja a moderada proporción en las lesiones de tipo difuso y una menor presencia en las lesiones parcheadas. La destrucción de tejido que se produce en la fase invasiva de grandes parásitos,

como se describe por Jubb *et al.* (2015), podría estar asociado con necrosis en las lesiones iniciales durante la invasión de *S. vulpis* en el zorro.

Las lesiones de *Spirocerca* no habían sido previamente caracterizadas mediante inmunomarcaje en zorros. Observamos un aumento en el número de células T sobre células B. Sin embargo, no fue posible diferenciar entre las diferentes poblaciones de células T, con marcadores tipo CD4 y CD8, ya que esto requiere muestras congeladas, que no pudimos obtener en nuestro estudio. En otros estudios, sobre lesiones de tipo parcheado, el uso de células T inmunomarcadas demostró un papel importante en el desarrollo de las lesiones homogéneas asociadas a una respuesta inmune coordinada entre diferentes poblaciones celulares (Ulrichs *et al.*, 2004; García- Jiménez *et al.*, 2013). Algunos autores atribuyen un papel importante de los linfocitos T, junto con sus mediadores, al desarrollo de las lesiones asociadas a *S. lupi* (Dvir *et al.*, 2010). Se necesitan más estudios en zorros para determinar las implicaciones de los linfocitos T reguladores en el desarrollo de la lesión, como ha ocurrido con el conocimiento que se tiene sobre las lesiones en el perro.

La baja presencia de linfocitos B en ambos tipos de lesiones (parcheadas y difusas) indican etapas tempranas del desarrollo de la lesión. Según otros autores, estas células son necesarias y se observan en etapas crónicas, incluyendo la posible inducción de carcinogénesis (Caín *et al.*, 2009).

La importancia de los macrófagos en el desarrollo de lesiones por *S. lupi* fue descrito por Dvir *et al.* (2011). Estos autores describen los macrófagos en lesiones parcheadas, e indican que pueden participar en la remodelación de la lesión. Números más bajos de estas células se asocia con una mayor presencia de colágeno. El marcador CD68 fue utilizado como un marcador de macrófagos ya que, según la experiencia de nuestro grupo de investigación, hay una gran similitud con otros marcadores de macrófagos.

El área de estudio donde se han recogido la mayor parte de los animales de este trabajo está sometida a una alta presión de caza, por lo que es posible que estos animales hayan sido cazados antes del posible desarrollo del nódulo hacia una forma tumoral. Estudios similares (Dvir *et al.*, 2011) indicaron la necesidad de investigación molecular (interleucinas y quimiocinas) para analizar la desarrollo y evolución de la lesión causada por este parásito en los zorros.

Como hemos descrito anteriormente, los casos positivos fueron especialmente encontrados entre los animales jóvenes, siendo probable que los animales mayores hubieran desarrollado cierto grado de inmunidad, debido a la exposición repetida al parásito, como es el caso de la infección en zorros por *Angyostrongylus vasorum* (Webster *et al.*, 2017). Este posible contacto previo podría provocar una resistencia adquirida a la infección tras haberla pasado, o estar expuestos de manera continuada. Esta hipótesis se ve reforzada al observar nódulos diminutos calcificados en las paredes gástricas de los zorros de edades avanzadas. Debido a la ausencia de estudios sobre inmunidad frente a la espirocercosis en zorros, análisis futuros en este sentido serían necesarios para confirmar estas hipótesis.

En cuanto al estudio de los hospedadores intermediarios y hallazgos de *Gongylonema* spp.

Según la bibliografía consultada, aproximadamente 50 especies de insectos actúan como HI de *Spirocercia*, siendo los escarabajos coprófagos y cucarachas las que desempeñan uno de los papeles principales (Lichtenfels, 1971; Kirkpatrick *et al.*, 1986; Anderson, 2000; Haruki *et al.*, 2005; Sato, 2009; Mowlavi *et al.*, 2009; Mukaratirwa *et al.*, 2010; Setsuda *et al.*, 2016; Kinsella *et al.*, 2016).

La investigación científica en la búsqueda de las especies de escarabajos que pudieran actuar como HI frente a *S. vulpis* en el área de estudio, no evidenció ningún ejemplar positivo a este parásito. Seguramente esto fue debido, tanto a las bajas prevalencias parasitarias, como a la época de muestreo, que fue en periodo otoñal. Acorde a nuestros resultados, las mayores prevalencias de *S. vulpis* en zorros se observaron a finales de otoño y los meses de invierno. Además, habría que tener en cuenta el periodo de prepatencia del ciclo biológico de *Spirocercia*, que es entorno a los 140 días (Rojas *et al.*, 2019), pudiendo incluso ser menor en *S. vulpis*, ya que parece que las larvas no emigran hasta la localización definitiva a través de la aorta, si no por migración directa desde el estómago a la pared gástrica. Todos estos conocimientos nos inducen a pensar que, probablemente, las especies de escarabajos transmisoras de la espirocercosis en el zorro sean las que tienen desarrollo primaveral, cuando el zorro se alimenta de dichas especies en los meses finales de la primavera y primeros meses de verano, entre mayo y julio.

En uno de los trabajos publicados presentados en esta tesis (Bravo-Barriga *et al.*, 2021), se explica la presencia de *Gongylonema* spp. en una de las especies de escarabajos coprófagos que se capturaron con el objetivo inicial de encontrar HI de *S. vulpis* en el área de estudio. De hecho, se analizaron un total de 551 especímenes de escarabajos coprófagos y se detectaron tres larvas infecciosas de nematodos en dos especímenes de *Geotrupes mutator*, lo que indica una prevalencia del 0,36% sobre el total de especímenes de escarabajo muestreados.

Hasta la fecha de este estudio, en España, el conocimiento sobre la presencia de nematodos en el escarabajo *G. mutator* era inexistente. En otros países, sí han sido descritos varios géneros de estos vermes en este escarabajo, como *Ascarops*, *Diplocapter*, *Diplogaster*, *Eudiplogaster*, *Holodiplogaster*, *Physocephalus*, *Pelodera*, *Paroigolaimella*, *Rhabditis*, *Spirocercia* y *Gongylonema*. En el caso de este último género, solamente la especie *Gongylonema pulchrum* ha sido descrita en *G. mutator* (Poinar, 1975). Por tanto, gracias al trabajo desarrollado por nuestro equipo de investigación, este sería el primer informe de otras especies de *Gongylonema* (distintas a *G. pulchrum*) encontradas en el escarabajo *G. mutator*, al menos en Europa. *G. mutator* es una especie ampliamente distribuidas en Europa, desde el sur de Suecia al Cáucaso y la PI, habitando también en algunas regiones asiáticas de Irán, Kazajstán y Turquía (Löbl & Smetana, 2016). En la PI esta especie de escarabajo es frecuente en la mitad norte (Martín-Piera & López-Colón, 2000).

En el estudio realizado sobre los HI, los únicos escarabajos infectados con larvas de *Gongylonema* se recolectaron en trampas cebadas con excrementos de cerdo. En general,

las especies pertenecientes a la subfamilia Geotrupinae se asocian frecuentemente con estiércol de mamíferos herbívoros, si bien no existe una alta especificidad trófica (Martín-Piera & López-Colón, 2000). *G. mutator* normalmente excava galerías inmediatamente debajo o al lado de las heces de vaca y caballo, usando estas boñigas para alimentarse o anidar (Teichert, 1955). Siguiendo el rastro de los excrementos, vacas y caballos serían, por tanto, los candidatos más probables para albergar este parásito como HD. Sin embargo, como ya hemos comentado, la baja especificidad trófica de los escarabajos coprófagos (Martín-Piera & Lobo, 1996), permitió que, en nuestras trampas de captura, cebadas con excremento de cerdo, pudieran recolectarse los especímenes de *G. mutator* que resultaron positivos, por lo que no podría descartarse que los porcinos también pudieran ser HD de este género parasitario.

Los miembros del género *Gongyлонema*, en su estado adulto, son fácilmente reconocidos gracias a su visualización en microscopio, especialmente por microscopía electrónica de barrido (SEM), porque su cutícula está cubierta por grandes engrosamientos verruciformes, especialmente prominentes en la parte anterior del cuerpo. En nuestro estudio, mediante esta técnica, claramente se identificaron los vermes como formas juveniles, pero no pudieron ser identificados a nivel de especie, dado que no se encontró una descripción exhaustiva en la literatura de estas formas juveniles y, además, porque estas larvas aún no han adquirido todas las características morfológicas de las formas adultas.

Por su parte, el análisis genético de estas larvas, a través del estudio de su árbol filogenético bayesiano, también mostró que las secuencias *cox1* se asociaron con los correspondientes al género *Gongyлонema*. Sin embargo, la homología con algunas de las especies conocidas y con secuencias en las bases de datos fue solamente del 88%. Así pues, los escasos datos en bancos genéticos sobre secuencias de *Gongyлонema* spp., imposibilitaron la clasificación a nivel de especie de las larvas de *Gongyлонema* encontradas, si bien se han logrado describir nuestras secuencias del *cox 1* y se han publicado en bases genéticas informatizadas con números de referencia LC577505 y LC612845 para comparar con estudios futuros. Así pues, se demuestran las divergencias genéticas interespecíficas de este género poco estudiado, y nuestras secuencias servirán como aportación científica en el futuro.

Como ya hemos comentado, la escasez de datos sobre las secuencias genéticas de las distintas especies de *Gongyлонema* encontradas en España, incluso en otras partes del mundo, no nos permitieron clasificar nuestros hallazgos en una especie determinada, planteando, por tanto, diferentes hipótesis con los escasos datos genéticos disponibles, junto con los detalles que hemos observado en el examen de las L3 por SEM. De las siete especies del género *Gongyлонema* descritas en España (Cordero del Campillo *et al.*, 1994; Fernández-De-Mera *et al.*, 2003; Da Costa Cordeiro *et al.*, 2018), se podrían descartar, gracias al análisis genético, a las especies *G. pulchrum* y *G. neoplasticum*.

En el trabajo de Esperón *et al.* (2013), se documentó la presencia del género *Gongyлонema* spp., en autillos europeos en la comunidad de Madrid, sin poder llegar a determinar la especie concreta por análisis moleculares. Gracias a una estrecha colaboración entre nuestro grupo de investigación con el equipo de trabajo que detectó dicho parásito en los autillos, se

podieron comparar las larvas encontradas en los escarabajos de nuestro estudio con las formas de *Gongyлонema* en estas aves, determinando que correspondían a especies diferentes. Sin embargo, el análisis filogenético de las 3 larvas encontradas en nuestro estudio incluso nos hace pensar en que se trate de especies diferentes entre ellas, al encontrarse una de ellas con una homología mayor con las aparecidas en los autillos que con las otras 2 larvas de nuestros escarabajos. De hecho, la distancia genética de una de nuestras larvas respecto a las otras 2 larvas es similar a la que también se observa con otras especies de referencia (*G. aegypti*, *G. neoplasticum*, *G. nepalensis* y *G. pulchrum*). Esto apoya el hecho de la existencia de una gran diversidad de este género en España.

Como ya se comentó con anterioridad, mediante SEM, nuestras muestras podrían corresponderse a larvas del género *Gongyлонema*, concretamente al subgénero *Progongyлонema*, debido a la ausencia de protuberancias cuticulares que caracterizan a *Progongyлонema* (Hernández-Rodríguez & Gutiérrez-Palomino, 1992). Sin embargo, dado que nuestras larvas pertenecen a fases juveniles (L3), sin que hayan desarrollado todas las características del nematodo en estado adulto, cabe también la posibilidad que nuestras larvas sean de las especies que sí desarrollan dichas protuberancias en su fase adulta, como apuntan algunos autores que sucede con la evolución de las larvas L3 al estado adulto (Alicata, 1935).

La larva infectante de *G. soricis*, en los detalles observados mediante SEM, es similar a nuestro nematodo, debido a su tamaño similar (1545 µm-1580 µm) y a su ornamentación caudal adornada con un mechón de digitaciones cuticulares (Quentin & Gunn, 1981). No obstante, el nematodo *G. soricis* se ha recolectado raramente en España, teniendo registros solamente en Valencia en 1996 (Portoles *et al.*, 1996). El HD de esta especie es la musaraña gris (*Crocidura russula*), ampliamente distribuida en España, con lo que esta es una de las posibles especies que barajamos como candidatas en la identidad de los ejemplares analizados en nuestro estudio, pero la falta de datos genéticos sobre *G. sociris* no nos permite confirmar esta hipótesis.

Otras especies encontradas en España incluyen a *G. pithyusensis n. sp.*, (*Gongyлонematiidae*), descrita por primera vez en 1977 parasitando la mucosa del esófago del lirón (*Eliomys quercinus*) en las Islas Baleares, España (Mas-Coma, 1977). Desde entonces, solo se ha detectado otra vez en Murcia (sureste) (Esteban *et al.*, 2004). La falta de descripciones morfológicas exhaustivas para esta especie y de datos genéticos de la misma, hacen que no podamos descartar esta especie como una candidata comparada con la de nuestro estudio. Sin embargo, teniendo en cuenta la distribución del lirón en nuestro país, el cual es poco probable encontrarlo en las dehesas del oeste de España, hace que las posibilidades de que nuestro hallazgo se corresponda con *G. pithyusensis* sean realmente escasas.

G. mucronatum ha sido descrito parasitando al erizo (*Atelerix algirus*) como HD en el norte de África y también en España (en las islas Baleares y Valencia) (Ferrer Màrius Vicent *et al.*, 2000). Al igual que ocurría con la especie anterior, a pesar de la escasez de descripciones morfológicas y estudios genéticos, sería poco probable que se tratara de esta especie, si se tiene en cuenta la distribución de *A. algirus*, que se limita al este de la PI.

Otra especie de *Gongylonema* que habita la PI es *G. musculi*, concretamente se ha descrito en varias islas del Mediterráneo (Milazzo *et al.*, 2003), pero se dispone de limitada información sobre datos genéticos y la morfología de las larvas de esta especie, lo que impide hacer cualquier comparación.

Así pues, dado que las homologías de las secuencias de nuestras larvas no han podido asociarse con ninguna de las descritas en las bases de datos genéticos, nuestros hallazgos podían corresponderse con larvas de alguna especie de *Gongylonema* ya descrita en nuestro país, pero sin que se haya secuenciado previamente, o bien podría tratarse de una nueva especie no encontrada anteriormente a nivel mundial. Estas hipótesis quizás sean resueltas en el futuro, gracias a otros estudios que permitan comparar nuevas secuencias incorporadas a las bases de datos genéticas y pudieran tener una alta homología con las de nuestro trabajo.

Capítulo 7.- Conclusiones.

- 1.- La prevalencia de *Trichinella* spp. en el zorro en el oeste español alcanza el 0,993 %, mientras que en otros mesocarnívoros es del 1,098 %. Considerando la abundancia del zorro, y las posibilidades de controles poblacionales de esta especie, se destaca al mismo como una posible especie centinela en la detección de este parásito.
- 2.- Se evidencian 4 zonas de especial riesgo para la presencia de *Trichinella* spp. en zonas del oeste español. En Salamanca, se correspondería con el área entre los municipios de Gallegos de Argañán y Fuenteguinaldo (comarca de Ciudad Rodrigo) junto con otras dos zonas en los municipios de Miranda del Castañar y Valdemierque. En Zamora, el área entre Luelmo y Villar del Buey (en la comarca de Sayago) se establecería como de alto riesgo, por lo que se deberían tomar medidas especiales de prevención en todas estas áreas.
- 3.- La prevalencia de *Spirocerca vulpis* en el zorro en el oeste español alcanza el 6,09 %, mientras que en otros mesocarnívoros no se encontró este proceso parasitario.
- 4.- La ocurrencia (presencia o ausencia) y la prevalencia de *Spirocerca vulpis* estarían determinadas por causas multifactoriales, incluida la estación del año (mayor porcentaje de casos positivos a finales de otoño e invierno, especialmente entre diciembre y febrero), la edad de los zorros (proporcionalmente más frecuente entre los individuos jóvenes) y, especialmente, factores topoclimáticos y del hábitat.
- 5.- Los factores topoclimáticos que mayormente incrementan la ocurrencia y prevalencia de *Spirocerca vulpis* son las mayores temperaturas mínimas mensuales, y las zonas de menor altitud. Entre los factores de hábitat, las mayores prevalencias de *Spirocerca vulpis* se encuentran en las áreas con un uso natural de la tierra (dehesas). Finalmente, el modelo predictivo sobre la ocurrencia y prevalencia también destaca la existencia de un patrón espacial, dándose las mayores probabilidades de infección hacia zonas del oeste en el área de estudio.
- 8.- La localización de los nódulos parasitarios por *Spirocerca vulpis* en el zorro difiere de la encontrada por *Spirocerca lupi* en el perro, de tal forma que, en el zorro, los nódulos se localizan mayoritariamente en la pared gástrica, con algunas presentaciones minoritarias a nivel intestinal.
- 9.- El patrón lesional analizado en los nódulos parasitarios por *Spirocerca vulpis* evidencia una progresión de la distribución de las células desde una forma difusa inicial a una distribución irregular (parcheada) posterior, posiblemente a través del control de la infección de los parásitos por parte del hospedador. En ninguno de los nódulos se observó evolución de las lesiones hacia formas neoplásicas.
- 11.- El escarabajo *Geotrupes mutator*, perteneciente a la Familia Geotrupidae, interviene en el ciclo de vida de transmisión de las infecciones producidas por *Gongylonema* spp. en el continente europeo.
- 12.- La imposibilidad de identificación de la especie de *Gongylonema* encontrada en *Geotrupes mutator*, ni por métodos moleculares ni por identificación morfológica, evidencian una carencia de conocimiento de este género a nivel mundial, por lo que son necesarios más estudios para conocer la diversidad de dicho género.

Índices

Índice de abreviaturas

Abreviaturas

AECOSAN. Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición.

ADNr. ADN ribosómico.

AEMA. Agencia Europea de Medio Ambiente.

AESAN. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición.

Ag EBL. Extracto bruto larvario, antígeno de *Trichinella* spp.

Ag ES. Antígeno excretor-secretor de *Trichinella* spp.

ArrSA. Arribes del Duero de la provincia de Salamanca.

ArrZA. Arribes del Duero de la provincia de Zamora.

BCR. Receptor de membrana específico de los linfocitos B.

CD. moléculas receptoras de antígeno de superficie de los linfocitos

CD20+. Marcador de linfocitos de linaje B.

CD25+. Marcador del receptor α de la IL-2, presente en linfocitos T y B activados, algunos timocito, células precursoras mieloides y oligodendrocitos.

CD3. Conjunto de proteínas de membrana que reconoce los linfocitos T. Su marcador se representa como **CD3**.

CD4+. Marcador de células T colaboradoras.

CD68. Molécula que forma parte de la glicoproteína de membrana de los monocitos y macrófagos (marcador CD68+).

CD79. Molécula que forma parte de la glicoproteína de membrana de los linfocitos B (marcador CD79+)

cm₂. Centímetro cuadrado.

CMH. Complejo mayor de histocompatibilidad.

CMH-II. Complejo mayor de histocompatibilidad tipo II.

CO₂. Dióxido de carbono.

COI. Gen citocromo oxidasa I.

Csb. Clima mediterráneo con influencia oceánica (clasificación climática de Köppen).

CyL. Castilla y León

DOUE. Diario Oficial de la Unión Europea

DV. Dorso-ventral.

EBL. Extracto bruto larvario, antígeno de *Trichinella* spp.

EFSA. Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria.

ELISA. Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).

ES. Antígeno excretor - secretor de *Trichinella* spp.

FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.

WHO. Organización mundial de la Salud.

OIE. Organización Mundial de Sanidad Animal.

FLOTAC. Técnica de diagnóstico copromicroscópica.

Foxp3+. Marcador de célula T específico de las células T-reguladoras naturales.

FA. Frecuencia de aparición

FR. Frecuencia relativa.

GalNAcb1-4 (Fuca1-3). Antígeno de glucano de *Trichinella* spp.

GlcNAc-R (LDNF). Antígeno de glucano de *Trichinella* spp.

gr. Gramos.

H. Variables de hábitat.

Ha. Hectárea.

HD. Hospedador definitivo.

H&E. Tinción de hematoxilina y eosina

HI. Hospedador intermediario.

HP. Hospedador paraténico.

hpg. Huevos por gramo de heces.

HR. Humedad Relativa.

HRM Qpcr. Un tipo de PCR cuantitativa de alta resolución.

ICH. Marcadores inmunohistoquímicos

IFN- γ . Interferón gamma.

IgA. Inmunoglobulina A.

IgE. Inmunoglobulina E.

IgG. Inmunoglobulina G.

IL-1. Interleuquina 1.

IL-2. Interleuquina 2.

IL-3. Interleuquina 3.

IL-5. Interleuquina 5.

IL-8. Interleuquina 8.

IL-13. Interleuquina 13.

IL-23. Interleuquina 23.

IL-25. Interleuquina 25.

ISO. Organización Internacional de Normalización.

ITIS. Sistema Integrado de Información Taxonómica.

IUCN. Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza.

K. Células Killer.

KDa. kilodalton.

Km. Kilómetros.

Km². Kilómetros cuadrados.

L1. Larva 1.

L3. Larva 3.

L4. Larva 4.

LAK. Células NK activadas (lymphokine-activated killer cells).

LCR. Líquido cefalorraquídeo.

LDNF. Glicano antigénico

LLR. Radiografía reclinada lateral izquierda.

LPG. Larvas por gramo.

LRN. Larva recién nacida.

m. Metro.

MM. Técnica diagnóstica de Markovics & Medinski.

μl. Microlitro

μm. Micrómetro.

mm. Milímetros.

NK. Células Natural Killer.

PCR. Reacción en Cadena de la Polimerasa.

pH. Medida del grado de acidez o alcalinidad de una sustancia o solución.

PI. Península Ibérica.

RLR. Radiografía reclinada lateral derecha.

SARS-CoV. Especie de coronavirus respiratorio surgido en 2003.

SARS-CoV-2 = COVID-19. Coronavirus de tipo 2 surgido en 2019.

SB. Número de zorros recolectados en cada localidad.

SEM. Microscopia electrónica

SG. Gravedad específica.

SIG. Sistema de Información Geográfica.

SOCEPA. Sociedad Española de Parasitología.

T6. *Trichinella* T6.

T8. *Trichinella* T8.

T9. *Trichinella* T9.

TA. Temperatura ambiente.

T^a. Temperatura.

TAM. Macrófagos activados alternativamente y asociados a tumores.

T.C. Tomografía Computarizada.

TC. Variables topoclimáticas.

TCR. Receptor de membrana específico de los linfocitos T.

TCR $\alpha\beta$. Un tipo de linfocitos

TCR $\gamma\delta$. Un tipo de linfocito T, de abundancia en la mucosa intestinal.

Th1. Uno de los tres tipos de linfocito (linfocito T helper).

Th17. Uno de los tres tipos de linfocito (linfocito T helper).

Th2. Uno de los tres tipos de linfocito (linfocito T helper).

Th9. Tipo de linfocito proinflamatorias, y anticancerígenas.

TIG. Tecnologías de la Información Geográfica.

TNF- α . Factor de necrosis tumoral alfa.

TSL-1. Antígeno de la superficie de la cutícula y de los esticocitos de las larvas musculares de *Trichinella* spp.

UE. Unión Europea.

VD. Ventre dorsal.

VEGF. Factor de crecimiento vascular endotelial.

Índice de imágenes

Índice de imágenes.

Imagen 1: A , morfología de la cápsula bucal hexagonal de larvas adultas de <i>Spirocerca lupi</i> , mediante microscopía óptica de luz. B , morfología de la cápsula bucal hexagonal de larvas adultas de <i>Spirocerca lupi</i> , mediante microscopía electrónica de barrido	76
Imagen 2: C , imágenes de microscopía óptica de <i>Spirocerca vulpis</i> sp. nov. Parte anterior del cuerpo de una hembra que muestra las papilas cefálicas, esófago muscular y porción anterior del esófago glandular. D , imágenes de microscopía óptica de <i>Spirocerca vulpis</i> sp. nov. Estructuras triangulares similares a dientes, que emergen de la cápsula bucal a la abertura oral	77
Imagen 3: E , microscopía electrónica de barrido, especímenes de <i>Spirocerca vulpis</i> sp. nov. Extremo anterior que muestra cuatro papilas cefálicas, abertura oral y estructuras en forma de dientes saliendo de la cápsula bucal. F , microscopía electrónica de barrido, especímenes de <i>Spirocerca vulpis</i> sp. nov. Primer plano de la abertura oral que muestra seis dientes, y un par de anfidios colocados ventral y dorsalmente	77
Imagen 4: A , extremo posterior de las hembras de <i>Spirocerca lupi</i> mediante microscopía óptica de luz. B , extremo posterior de las hembras de <i>Spirocerca lupi</i> mediante microscopía electrónica de barrido	78
Imagen 5: C . Imagen de microscopía óptica de <i>Spirocerca vulpis</i> sp. nov. Abertura anal observada en el extremo posterior de una hembra. (D) Apertura de vulva (triángulo negro) observado en una hembra. D , imagen de microscopía óptica de <i>Spirocerca vulpis</i> sp. nov. Apertura de vulva observada en una hembra	78
Imagen 6: E . Extremo posterior de las hembras de <i>Spirocerca vulpis</i> sp. nov. Mediante microscopía electrónica de barrido, mostrando apertura anal. F , extremo posterior de las hembras de <i>Spirocerca vulpis</i> sp. nov. Mediante microscopía electrónica de barrido, papilas terminales	79
Imagen 7: A , imagen de microscopía óptica de luz de <i>Spirocerca vulpis</i> sp. nov. Extremo posterior de un macho que muestra papilas preanales, postanales, espícula menor y gubernamentaculum. B , imagen de microscopía óptica de luz de <i>Spirocerca vulpis</i> sp. nov. Primer plano del gubernaculum de forma irregular en el extremo posterior de un macho	79
Imagen 8: C , extremo posterior de los adultos machos de <i>Spirocerca lupi</i> ., mediante microscopía óptica de luz para el sexado, mostrando la espícula menor de un macho. D , extremo posterior de los adultos machos de <i>Spirocerca lupi</i> ., mediante microscopía electrónica de barrido, describe detalles del extremo posterior de un macho con espículas menores, estriación paralela de la cutícula, cuatro pares de papilas preanales equidistantes y gubernaculum para su sexado	80

Imagen 9: E , microscopía electrónica de barrido del extremo posterior de un macho de <i>Spirocerca vulpis</i> sp. nov. Parte posterior de un macho que muestra espícula menor, papilas preanales y postanal. F , microscopía electrónica de barrido del extremo posterior de un macho de <i>Spirocerca vulpis</i> sp. nov. Primer plano de papilas preanales y estrías longitudinales paralelas cortas	80
Imagen 10. Localización principal de <i>Spirocerca vulpis</i> sp. nov., en zorro rojo	75
Imagen 11. Localización principal de <i>Spirocerca vulpis</i> sp. nov., en zorro rojo	75
Imagen 12. Fase del proceso de digestión de decantación en embudo	245
Imagen 13. Probeta inferior graduada, o tubo de centrifugación en el proceso de digestión	246
Imagen 14. Aspirado con una pipeta desde la parte superior de la probeta graduada, de 30 ml de contenido, una vez transcurridos 10 minutos de reposo en esta probeta ...	247
Imagen 15. Aclarado del líquido de la probeta inferior	248
Imagen 16. Placa de petri con cuadrículas para visionado del líquido de digestión	249

Índice de figuras

Índice de figuras.

Figura 1.- Representación del concepto de One Health	27
Figura 2.- Ciclo Biológico de <i>Spirocerca</i> spp.	84
Figura 3.- Ciclo Biológico de <i>Gongylonema</i> spp.	105
Figura 4.- Número de muestras de zorro y otros mesocarnívoros analizados por cada municipio de la provincia de Ávila en búsqueda de <i>Trichinella</i> spp.	162
Figura 5.- Número de muestras de zorro y otros mesocarnívoros analizados por cada municipio de la provincia de Salamanca en búsqueda de <i>Trichinella</i> spp.	163
Figura 6.- Número de muestras de zorro y otros mesocarnívoros analizados por cada municipio de la provincia de Zamora en búsqueda de <i>Trichinella</i> spp.	164
Figura 7.- Número de muestras de zorro y otros mesocarnívoros analizados por cada municipio de la provincia de Valladolid en búsqueda de <i>Trichinella</i> spp.	165
Figura 8.- Municipios muestreados en la provincia de Salamanca (coloreados). Representación de la prevalencia <i>Trichinella</i> spp (en rojo), en el total de hospedadores silvestres (A). Representación de la prevalencia en el zorro de <i>Trichinella</i> spp (B).....	167
Figura 9.- Municipios muestreados en la provincia de Zamora (coloreados). Representación de la prevalencia <i>Trichinella</i> spp (en rojo), en el total de hospedadores silvestres (A). Representación de la prevalencia en el zorro de <i>Trichinella</i> spp (B).....	168
Figura 10.- Representación de la prevalencia de <i>Spirocerca vulpis</i> en zorro (<i>Vulpes vulpes</i>), en los municipios de la provincia de Salamanca según los datos del estudio de “ocurrencia, prevalencia y variables ambientales explicativas de la infestación por <i>Spirocerca vulpis</i> en los zorros del oeste de España”.....	253
Figura 11.- Representación de la prevalencia de <i>Spirocerca vulpis</i> en zorro (<i>Vulpes vulpes</i>), en los municipios de la provincia de Zamora según los datos del estudio de “ocurrencia, prevalencia y variables ambientales explicativas de la infestación por <i>Spirocerca vulpis</i> en los zorros del oeste de España”.....	254
Figura 12.- Representación de la prevalencia de <i>Spirocerca vulpis</i> en zorro (<i>Vulpes vulpes</i>), por municipios en las provincias muestreadas de Castilla y León.	255

Índice de tablas

Índice de tablas.

Tabla 1. Clasificación de la subespecie de zorro en la Península Ibérica (<i>Vulpes silacea</i>)	40
Tabla 2. Patrón ecológico de alimentación del zorro. Díaz-Ruiz <i>et al.</i> , 2013.....	47
Tabla 3. Descripción de algunas fuentes de alimento según el análisis del contenido gástrico / o de la composición de los excrementos, en términos de frecuencia de aparición (FA).	49
Tabla 4. Tipos de alimentos en diferentes lugares que incorpora el zorro en su dieta en la Península Ibérica.....	51
Tabla 5. Especies de escarabajos coprófagos y otros insectos que potencialmente pueden actuar como posibles hospedador intermediario de <i>Spirocerca lupi</i>	55
Tabla 6. Clasificación Taxonómica del género <i>Trichinella</i>	59
Tabla 7. Distribución de <i>Trichinella</i> spp., y hospedadores habituales, junto con el autor que ha postulado cada especie o genotipo diferente	61
Tabla 8. Hospedadores silvestres de <i>Spirocerca</i> spp.	72
Tabla 9. Clasificación Taxonómica de la especie <i>Spirocerca lupi</i>	74
Tabla 10. Diferencias morfológicas encontradas por microscopia electrónica y de barrido entre <i>Spirocerca lupi</i> y <i>Spirocerca vulpis</i>	76
Tabla 11.- Prevalencias de <i>Spirocerca lupi</i> en algunos lugares del mundo.....	86
Tabla 12. Características epidemiológicas de presentación de <i>Spirocerca lupi</i> , en el perro doméstico según algunos autores	87
Tabla 13. Características epidemiológicas de presentación de <i>Spirocerca</i> spp., en el zorro rojo (<i>Vulpes vulpes</i>), según algunos autores.	88
Tabla 14. Porcentaje de signos clínicos y lesiones encontrados en infecciones de <i>Spirocerca lupi</i>	94
Tabla 15. Clasificación Taxonómica del género <i>Gongylonema</i>	99
Tabla 16. Patrón característico de la inmunidad innata y de la inmunidad adquirida.	110
Tabla 17. Principales marcadores inmunohistoquímicos de las células sanguíneas.....	115
Tabla 18. Parámetros químicos asociados con la presencia de <i>Spirocerca lupi</i> cuando induce a la formación de nódulos neoplásicos en comparación con perros con lesiones no neoplásicas.	117
Tabla 19. Total muestreo efectuado en busca de <i>Trichinella</i> spp.	161

Tabla 20. Resultados obtenidos para <i>Trichinella</i> spp., en la zona de estudio.	169
Tabla 21. Músculos preferentes recomendados para el ensayo de digestión de <i>Trichinella</i> spp., según la NORMA ISO 18743:2015, en diferentes especies animales .	226
Tabla 22. Principales diferencias entre el método de referencia para detección de triquinas recogido en el Anexo I del Reglamento de Ejecución (UE) 2015/1375 y la sustitución por el nuevo método para la detección de triquinas mediante la norma ISO 18743:2015, establecido con la entrada en vigor del nuevo Reglamento (Reglamento (UE) 2020/1478). (Aspecto que se considera como punto crítico a controlar *).	241

ANEXOS

Anexo 1.

Resumen método de referencia digestión enzimática

RESUMEN DEL MÉTODO DE REFERENCIA DESCRITO EN EL ANEXO I CAPÍTULO I DEL REGLAMENTO UE 1375/2015 (DOUE nº 212-2015)

I. Grupos completos de muestras (100 g de muestras a la vez)

- a) Añadir $16 \pm 0,5$ ml de ácido clorhídrico a un vaso de precipitados de 3 l que contenga 2 l de agua del grifo, se coloca en una placa calefactora con función de agitación, y se lleva a una temperatura de 46 a 48 °C; se añade un agitador en el vaso, se comienza a agitar.
- b) Añadir $10 \pm 0,2$ g de pepsina o $30 \pm 0,5$ ml de pepsina líquida.
- c) Triturar con una picadora / batidora o mezclador los 100 g de tejido muscular de las muestras a examinar.
- d) Llevar la carne picada al vaso de precipitados de 3 l que contenga el agua, la pepsina y el ácido clorhídrico y que se mantiene sobre la placa calefactora & agitadora
- e) Introducir varias veces el dispositivo de triturado del mezclador en el líquido de digestión del vaso de precipitados y enjuagar el vaso del mezclador/ batidora con una pequeña cantidad de líquido de digestión (*), para quitar la carne que aún esté adherida.
- f) Cubrir el vaso de precipitados con una hoja de aluminio, y mantenerlo encima de la placa calefactora & agitadora a temperatura constante (44-46 °C)
- g) Deberá regularse el agitador magnético de tal forma que durante su funcionamiento mantenga una temperatura constante de 44 a 46 °C. Durante la agitación, el líquido de digestión deberá girar a una velocidad suficiente para que se forme un remolino profundo sin salpicaduras.
- h) Agitar el líquido de digestión hasta que desaparezcan las partículas de carne (durante 30 minutos aproximadamente). Pueden ser necesarios períodos más largos de digestión (que no superen los 60 minutos) para determinados tipos de carne (lengua, carne de caza, etc.).

Detener el mezclador una vez se observen todas las partículas digeridas y verter el líquido de digestión a través del tamiz (con una malla de 180 micras), en el embudo de separación.
- i) Se considera satisfactorio el proceso de digestión si no permanece más del 5 % del peso de la muestra inicial en el tamiz.
- j) Dejar el líquido de digestión en el embudo de vidrio de decantación (de una capacidad de 2 l como mínimo, preferiblemente provistos de llaves de seguridad de teflón, durante 30 minutos.
- k) Después de 30 minutos, traspasar rápidamente una muestra de 40 ml del líquido de digestión a la probeta graduada o al tubo de centrifugación.
- l) Mantener los líquidos de digestión y otros residuos líquidos en un vaso de precipitados hasta que se haya completado la lectura de los resultados.

- m) Dejar reposar la muestra de 40 ml durante 10 minutos. Luego, aspirar con cuidado de no generar turbulencias 30 ml de líquido sobrenadante para retirar las capas superiores y dejar un volumen que no supere 10 ml.
- n) La muestra de 10 ml del sedimento restante se verterá en una cubeta para el cómputo de larvas o en una placa de petri (►).
- o) Enjuagar la probeta graduada o el tubo de centrifugación con 10 ml como máximo de agua del grifo, que se agregará a la muestra en la cubeta de cómputo de larvas o en la placa de petri.

Luego, proceder a la observación en el triquinoscopio o al examen en el estereomicroscopio con un aumento de 15 a 20 veces. Se permite la visualización utilizando otras técnicas cuando se haya comprobado que el examen de las muestras de control positivas da un resultado igual o mejor que los métodos tradicionales de visualización. Siempre que se observen zonas sospechosas o formas similares a parásitos, deberán aplicarse aumentos superiores, de entre 60 y 100 veces.

- p) Los líquidos de digestión se examinarán desde el momento en que estén dispuestos. En ningún caso se podrá posponer el examen al día siguiente.

Cuando los líquidos de digestión no se examinen en los 30 minutos siguientes a su preparación, se deberán clarificar de la siguiente manera:

- Verter la muestra final de unos 40 ml en una probeta graduada.
- Dejar reposar durante 10 minutos.
- Luego, retirar 30 ml del líquido sobrenadante, dejando un volumen de 10 ml. Dicho volumen se llevará a 40 ml con agua del grifo.
- Después de un nuevo período de reposo de 10 minutos
- Aspirar 30 ml del líquido sobrenadante para obtener un volumen máximo de 10 ml que se examinará en una placa de petri o en una cubeta para cómputo de larvas.
- Lavar la probeta graduada con 10 ml como máximo de agua del grifo y agregar el líquido obtenido a la muestra en la placa de petri o en la cubeta para el cómputo de larvas, para su examen a la observación en el triquinoscopio.

* Para facilitar la homogeneización, una pequeña cantidad de líquido que formara parte de la digestión una vez atemperado a 46 ± 2 °C (agua con la pepsina ya añadida y el ácido clorhídrico) se agrega a la carne en la batidora, que ha de ser estanca, siendo esta cuestión una modificación del método de referencia recogido en la ISO 18743:2015, donde se destaca la importancia de la secuencia correcta de mezcla del líquido de digestión.

(►) Si el examen revela que el sedimento no es transparente, verter la muestra en una probeta graduada, llevar su volumen a 40 ml con agua de grifo y seguir el procedimiento descrito en la presente sección. Este procedimiento podrá repetirse de 2 a 4 veces (**), hasta que el líquido sea lo suficientemente claro para una lectura fiable.

** Cuestión que modifica el método de referencia recogido en la **ISO 18743:2015** donde se indica un solo procedimiento de aclaración.

II. Grupos de menos de 100 g.

Cuando sea necesario, una cantidad que no supere los 15 g podrá añadirse a un grupo completo de 100 g y examinarse conjuntamente con arreglo al procedimiento (I) descrito anteriormente.

Las cantidades superiores a 15 g se deberán examinar como grupos completos. En el caso de grupos de hasta 50 g, los líquidos de digestión y los ingredientes podrán reducirse a 1 l de agua, 8 ml de ácido clorhídrico y 5 g de pepsina.

Procedimiento de limpieza y descontaminación tras un resultado positivo o dudoso.

Cuando el examen de una muestra colectiva o individual dé un resultado positivo o dudoso, se descontaminará cuidadosamente todo el material que haya entrado en contacto con la carne (la taza y la cuchilla del mezclador, el vaso de precipitados, el agitador, el sensor de temperatura, el embudo de separación cónico, el tamiz y el fórceps) dejándolo durante unos segundos en agua caliente (entre 65 °C y 90 °C). Se recomienda enjuagar a fondo cada pieza para eliminar el detergente que haya podido utilizarse en el lavado.

Anexo 2.

Resumen norma ISO 18743: 2015

Resumen NORMA ISO 18743:2015

Microbiología de la cadena alimentaria detección de *Trichinella* larvae en carne método físico por digestión artificial (AENOR. 2016).

Introducción

Trichinella spp., es el agente causante de la triquinosis humana, una enfermedad que supone un peligro para la salud pública. Los métodos de digestión para la detección de larvas de *Trichinella* en carnes de cerdos y de otras especies de animales susceptibles (caballos, jabalís, zorros) resultan efectivos para la prevención de la triquinosis clínica en humanos, pero se plantea el problema de detectar las bajas cargas parasitarias (LPG), lo cual puede dar infecciones subclínicas en humanos o riesgos asociados en el consumo de carnes de animales de abasto por falta de detección de estos casos de baja carga parasitaria.

Aplicación.

Su utilidad se destina al examen de carne procedente de animales domésticos y silvestres que puedan haber sido infectados por nematodos del género *Trichinella*. Otras herramientas como los métodos moleculares serán los encargados de determinar la especie de *Trichinella* o el genotipo implicado en la parasitación.

El método de digestión artificial/con agitador magnético se considera un método normalizado porque se ha demostrado que proporciona los resultados de mayor confianza en los estudios de validación. Además de este método debe ser utilizado junto con las directrices del Manual of Diagnostic Tests and Vaccines de la OIE (OIE, 2018), de la International Commission on Trichinellosis (ICT, 2012) para el ensayo de *Trichinella* spp., y de la inspección de canales destinados al consumo humano descrita en la ISO 7218:2007. Este método podrá no ser de necesidad, siempre que se haya demostrado de alguna otra manera que el animal no estaba en riesgo de exposición a *Trichinella*.

Otros métodos si documentan su equivalencia podrán ser considerados métodos alternativos.

Definiciones.

- Larvas musculares de *Trichinella* (LM), son el primer estadio larvario (L1) de nematodos (dimensiones de 0,7 mm a 1,1 mm de longitud y 0,03 mm de ancho), que pertenecen al género *Trichinella*, que se localizan en el músculo estriado de animales de todo el mundo y que pueden infectar a los humanos.
- La digestión, es el método para detectar larvas de *Trichinella* en tejido muscular, en él se diferenciarán 4 etapas: una etapa de digestión enzimática realizada que liberará las larvas de los tejidos musculares; una etapa siguiente consistente en la filtración; una etapa de sedimentación; finalmente una etapa de microscopía para la detección de las larvas recuperadas.
- LPG: Número de larvas de *Trichinella* encontradas bien por conteo directo o bien por estimación en conteos sucesivos en un gramo de tejido muscular.

Material.

El equipamiento habitual de un laboratorio de microbiología (véase la Norma ISO 7218) y, en particular, lo siguiente.

- Bolsas de plástico o bandejas, para las muestras, identificadas para no perder la trazabilidad de la muestra.
- Cuchillas, tijeras y pinzas, para cortar las muestras y retirar el tejido no digerible.
- Balanza calibrada, para pesar las muestras o la pepsina (de una precisión de $\pm 0,1$ g).
- Triturador, de vidrio, plástico o acero, con palas afiladas (inspeccionadas o reemplazadas periódicamente), batidora, picadora, o similar, de modo que facilite la eficacia de la digestión.
- Agitador magnético, con una placa calefactora regulable, o bien un agitador magnético introducido en un incubador.
- Termómetro (de una precisión de como mínimo $\pm 0,5$ °C, para un rango de temperaturas de como mínimo 20 °C a 70 °C).
- Barrita magnética (de 5 cm de longitud como mínimo).
- Vasos de precipitados de vidrio (de 3 l de capacidad como mínimo).
- Decantadores cónicos de vidrio (de una capacidad mínima de 2,5 l, otros para la segunda decantación de una capacidad mínima de 60 ml), con llaves de paso preferiblemente de politetrafluoroetileno (PTFE). (de un diámetro mínimo de aproximadamente 15 cm).

No debería utilizarse material de plástico o de teflón en los vasos de precipitados o los decantadores (salvo las llaves de paso) ya que las superficies rugosas y las cargas electrostáticas pueden favorecer que las larvas queden adheridas a las superficies internas del equipamiento. Debe asegurarse antes del inicio del proceso que el material está libre de contaminación de digestiones anteriores (lavados con aguas a T^a superior a 70°C y enjuagados arrastrando los posibles restos de material, o bien desinfección por medios químicos).

- Papel de aluminio, o tapas, para cubrir la boca del vaso de precipitados.
- Tamiz, fabricado de latón o acero inoxidable, de un tamaño de malla específico comprendido entre 180 mm y 200 mm (de un diámetro de aproximadamente 10 cm, o superior).
- Tubos o probetas (de 50 ml o de 100 ml de capacidad, de vidrio).
- Placas de Petri (de un diámetro de aproximadamente 90 mm), divididas en cuadrados de aproximadamente 1 cm² para facilitar los conteos, o bien un equipamiento equivalente para el recuento de larvas.
- Estéreo-microscopio, con una fuente de luz transmitida regulable situada por debajo de la platina, o bien un triquinoscopio con una superficie horizontal. Se recomienda que posea capacidad de captura y almacenamiento de imágenes (una cámara) pero no es obligatorio para documentar los resultados dudosos.
- Pipetas, de una capacidad de 1 ml, 10 ml y 25 ml.
- Viales pequeños, para recoger las larvas recuperadas.

Fundamento.

El método de digestión artificial, aceptado como método de referencia internacional en este caso es el propuesto por OIE, 2012 (véase Manual OIE, 2012. Manual of diagnostic test and vaccines, for terrestrial animals. 7th ed. 2012. Volume 1. 305-313)

Esta norma es de ámbito internacional a diferencia del Reglamento UE 1375/2015 cuyo ámbito es el europeo.

Uno de los puntos críticos es el tamaño de la muestra (las muestras de 1 g van a permitir una detección fiable de ≥ 3 LPG mientras que las muestras de 3 g a 5 g van a permitir una detección fiable de ≥ 1 LPG). Otros aspectos críticos vendrán determinados por el tipo de músculo escogido, por el método empleado (en caso de la elección de uno alternativo), y por la destreza del analista que realiza el ensayo.

Muestras

La toma de muestras, la identificación y el transporte no forman parte del método descrito en esta norma internacional, aunque esta norma resume algunos aspectos en la tabla 1 que veremos a continuación. Se debe alcanzar una sensibilidad de al menos una a tres larvas por gramo (1-3 LPG), para asegurar la protección de la salud humana, lo cual implica que debe recogerse una cantidad adecuada de muestra muscular, y esta muestra ha de ser tomada del músculo preferente del animal sometido a estudio.

El tipo de muestra de canales o cadáveres individuales con destino a consumo humano para asegurar la salud pública debe ser recogido de las posiciones preferentes (ver tabla 21 adjunta, que se asemeja a la tabla del anexo A, que aporta la ISO).

El tamaño de la muestra debe ser establecido por la autoridad competente en base a los riesgos de infección por *Trichinella* en los animales sometidos a investigación, el conocimiento científico sobre la sensibilidad del ensayo y los objetivos del ensayo, y en todo caso nunca inferior a 1 g por cuerpo.

La cantidad de las muestras musculares recogidas expresado en peso, de los cuerpos para su ensayo por digestión debería ser como mínimo dos veces superior en peso a la cantidad de muestra requerida para el análisis, para permitir la eliminación de los tejidos no digeribles.

En el momento de recepción de las muestras, se debe verificar la idoneidad de las muestras para su ensayo, comprobando la masa, la composición, su estado, la identificación y la correspondencia con la trazabilidad (aspectos que recoge la Norma ISO 7218:2007).

Las muestras musculares deberían analizarse a la mayor brevedad posible o bien almacenarse a una temperatura de 2 °C a 8 °C para ralentizar la descomposición, evitando su congelación.

Las muestras utilizadas para el ensayo deben carecer de materia grasa, tendones y fascia las muestras deben consistir exclusivamente en tejido muscular estriado. Si se utiliza

tejido de lengua, debe retirarse la superficie dura no digerible de tejido conectivo antes de proceder a la digestión.

En el caso de los cerdos, las muestras de músculo deben recogerse de los pilares del diafragma o bien del masetero, en el caso de que esto no sea posible, debe recogerse una cantidad superior de muestra muscular de otros músculos

Las muestras procedentes de animales individuales pueden agruparse; la cantidad máxima de masa de músculo que se puede digerir debe ser de 100 g, pero pueden añadirse hasta 15 g de tejido muscular adicional en caso necesario, para combinaciones de muestras con un peso inferior (por ejemplo, de 50 g), pueden ajustarse proporcionalmente los ingredientes y el volumen del medio líquido de digestión hasta un mínimo de 1 l.

Tabla 21.- Músculos preferentes recomendados para el ensayo de digestión de *Trichinella* spp., según la NORMA ISO 18743:2015, en diferentes especies animales

Especie animal	Músculo preferente
Cerdo doméstico (<i>Sus scrofa domesticus</i>)	Diafragma, masetero
Caballo (<i>Equus ferus caballus</i>)	Masetero, diafragma, lengua
Jabalí (<i>Sus scrofa</i>)	Diafragma, pata delantera, lengua
Perro (<i>Canis lupus familiaris</i>)	Diafragma, masetero, lengua
Oso (<i>Ursus spp.</i>)	Diafragma, masetero, lengua
Morsa (<i>Odobenus spp.</i>)	Lengua
Foca (familia Phocidae)	Diafragma, intercostales, lengua
Cocodrilo (<i>Crocodylus niloticus</i>)	Intercostal, masetero
Zorro (<i>Vulpes spp.</i>)	Diafragma, pata delantera, lengua
Perro mapache (<i>Nyctereutes procyonoides</i>)	Diafragma, pata delantera, lengua

Reactivos.

- Agua corriente, calentada a 47 °C ± 2 °C.
- Ácido clorhídrico (25%, concentración molar: 7,8 a 7,9, o de otro porcentaje diferente).
- Pepsina (en polvo o en gránulos: 1: 10.000 NF, 1: 12.500 BP, 2.000 FIP; líquido: 660 U/ml).

(La actividad de la pepsina en polvo se expresa en relación a la masa en gramos, bien como “NF” (formulario nacional de los EEUU), “BP” (Pharmacopoea Británica), o “FIP” (Fédération Internationale de Pharmacie); la actividad de la pepsina líquida se expresa en unidades de la Pharmacopoea Europea por mililitro, con un mínimo de 660 U/ml. Puede utilizarse pep-

sina de una actividad diferente siempre que la actividad final en el medio líquido de digestión sea equivalente a una actividad de 10 g de 1:10.000 NF.

- Etanol, (alcohol etílico del 70% al 90%). Para conservación de las larvas en caso de ser encontradas.
- Hipoclorito sódico. Para la inmersión del material de vidrio y otros instrumentos que pudieran resultar contaminados con larvas de *Trichinella*, los cuales deben descontaminarse sumergiendo en un medio químico con hipoclorito sódico, a una concentración final del 0,01% de cloro activo, durante 3 h como mínimo.

La eficacia de la digestión y su rapidez, va a depender de mantenerse una proporción máxima de carne a medio líquido de digestión de 1:20 y una temperatura de $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ a lo largo de todo el proceso.

El tiempo mínimo requerido para la digestión debe ser de 30' pero en el caso de los animales salvajes o la lengua de muchas especies se consideran los tejidos musculares menos digeribles, y el tiempo de digestión puede verse Incrementado hasta un máximo de 60', a menos que con ese tipo de tejido muscular haya sido validado otros periodos máximos de digestión.

La temperatura y el tiempo de digestión deberían ser considerados puntos críticos del proceso (si las condiciones de temperatura-tiempo son inferiores a los valores requeridos, podría producirse una digestión incompleta del tejido muscular; una temperatura elevada (superior a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$) o unos tiempos de digestión prolongados podrían ocasionar la destrucción de las larvas o la inactivación de la pepsina.

Proceso de digestión de la carne picada.

La muestra de la que se debe tener garantizada su trazabilidad estará formada por tejido muscular estriado al que se le ha quitado restos de tejido conectivo, grasa, fascias, tendones y será pesada para saber la composición de líquido de digestión en el que se añadirá.

Lo primero que se debe comenzar es preparando el medio líquido de la digestión, este medio líquido de digestión debe prepararse nuevo para cada análisis, y se prepara mediante el siguiente proceso:

- Colocar un vaso de precipitados de vidrio con 2 litros de agua corriente, pero con capacidad para 3 l, sobre el agitador magnético con placa calefactora regulable, o a un agitador magnético introducido dentro de un incubador
- Llevar el vaso de precipitados con 2 litros de agua corriente a temperatura de $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Añadir 16 ml de ácido clorhídrico al 25% al vaso de precipitados de vidrio con 2 l de agua corriente previamente calentada. (En el caso de utilizar disoluciones concentradas de ácido clorhídrico disponibles de una formulación diferente al 25%, estas disoluciones previamente a este proceso deben de ajustarse proporcionalmente. Por ejemplo, si se utiliza una disolución concentrada de ácido clorhídrico al 37% (concentración molar de 12,1), se añaden 11 ml a 2 l de agua corriente previamente calentada).

- Introduce una barrita magnética en el vaso de precipitados, el vaso de precipitados se comienza los ciclos de agitación.
- Se añaden 10 g de pepsina en polvo o en gránulos (1:10.000 NF) o 30 ml de pepsina líquida (660 U/ml). La actividad de la pepsina debe venir certificada y la pepsina se debe almacenar siguiendo las recomendaciones del fabricante, bien se trate de formatos comerciales en polvo, en gránulos o en líquido. El uso de una formulación líquida de pepsina puede suponer una ventaja ya que podría reducir el peligro de las reacciones alérgicas del personal del laboratorio.

Este proceso tiene una etapa crítica en la secuencia obligatoria de mezcla del medio líquido de digestión: 1º agua, 2º ácido clorhídrico y 3º pepsina, lo cual previene la degradación de la pepsina que podría producirse por su exposición directa al ácido clorhídrico concentrado.

Una vez que está preparado el medio líquido de la digestión, se ha de proceder a procesar la muestra de tejido muscular a digerir y que será añadida al medio líquido para comenzar el inicio de la digestión.

Muestra a digerir.

- La muestra ya pesada y seleccionada solo con tejido muscular estriado se tritura (la cantidad de tejido muscular (100 g \pm 15 g), **que será la composición máxima en cuanto a masa de muestra**).
- El procedimiento de mezcla o trituración debe ajustarse para maximizar la eficiencia de la digestión considerándose un aspecto crítico del proceso por causar digestión incompleta las deficiencias de triturado, o daño y rotura de las larvas el exceso de trituración. La mezcla/trituración debería prolongarse hasta que la carne quede bien troceada o picada (normalmente 5 ciclos de 5 s a 10 s cada uno)
- La carne triturada (tejido muscular) se transfiere al vaso de precipitados de vidrio de 3 l que contiene el líquido de digestión previamente preparado. Para evitar pérdidas de larvas por adhesión del tejido muscular, el equipamiento de mezcla/trituración debería enjuagarse exhaustivamente con el medio líquido de digestión del vaso de precipitados, que se vuelve a incorporar al vaso de precipitados de vidrio.
- En este momento se cubre el vaso de precipitados de vidrio con papel de aluminio para reducir la evaporación y mantener una temperatura constante, de 45 °C \pm 2 °C y se da por iniciado el proceso de digestión.
- Se comprueba periódicamente la temperatura del medio líquido de digestión utilizando un termómetro.
- Se verifica que durante la agitación el medio líquido de digestión gira a una velocidad suficientemente rápida como para crear un espiral en el centro del vaso de precipitados (vórtice profundo), pero sin salpicar.
- El proceso de digestión de la muestra se lleva a cabo durante 30'; en caso necesario, el tiempo de digestión puede prolongarse, pero no debe superar un tiempo total de 60 min.

Se considera que el proceso de digestión ha resultado satisfactorio si los restos de material presentes en el tamiz de filtración (que será el paso que a continuación exponemos) están compuestos fundamentalmente de tejido no muscular no digerible (consistentes típicamente en tejido conectivo y fascia) y no superan el 5% de la masa de muestra original, en caso de superarlo se plantean dos posibles situaciones.

- 1.- Repetir toda la digestión con una nueva muestra si ha quedado una mayor cantidad del 5% de muestra sin digerir, y se dispone de cantidad suficiente de tejido para iniciar un segundo examen.
- 2.- Tomar la porción de tejido muscular que ha quedado sin digerir en el tamiz y con esos restos, realizar un proceso de digestión completo que se lleven por separado al examen microscópico además del examen de la digestión inicial.

Filtración del medio líquido de digestión

Tras la digestión, el medio líquido de digestión debe filtrarse a través de un tamiz de malla de un tamaño de malla específico (fabricado de latón o acero inoxidable, de un tamaño de malla específico comprendido entre 180 mm y 200 mm y de un diámetro de aproximadamente 10 cm, o superior) donde se retiene el tejido no digerido, pero se permite el paso de las larvas. Con anterioridad a su uso, los tamices deben estar limpios de residuos y deben humedecerse previamente para dejar que el medio líquido de digestión los atraviese rápidamente. Se verifica que la llave de paso del decantador donde se va a depositar el filtrado está completamente cerrada. Se vierte cuidadosamente (para evitar que se derrame o rebose) el medio líquido de digestión del vaso de precipitados, sobre el decantador, haciendo que pase a través del tamiz de malla específico.

En cualquier caso, tras cada proceso de digestión, se enjuaga el vaso de precipitados de vidrio donde tuvo lugar la digestión y el tamiz, con un volumen adicional de agua corriente (100 ml como mínimo) para evitar pérdidas de larvas debido a que el tejido muscular o las larvas hayan quedado adheridas a las superficies del vaso de precipitados y del tamiz, incorporando este enjuague al decantador.

Sedimentación del medio líquido de digestión.

La sedimentación del medio líquido resultante de la digestión en el decantador se deja que sedimente durante 30' (sedimentación primaria).

Trascurrido ese tiempo, se dispensan aproximadamente 40 ml del medio líquido de digestión (sedimento primario) en un tubo de vidrio (segundo decantador cónico con una capacidad mínima de 60 ml), que debe estar colocado debajo del decantador que contiene el volumen total de la digestión.

Entre los puntos críticos de esta fase se encuentra la apertura de la llave de paso del embudo de decantación, esta debe abrirse de forma rápida y completa para asegurar que no quedan larvas retenidas en los bordes de la salida o que no lleguen a salir debido a que la velocidad de flujo es baja. Además, otro aspecto a considerarse como crítico es si el volumen del sedimento primario fuese demasiado pequeño, las larvas podrían permanecer en el medio

líquido de digestión del embudo de decantación y podrían perderse. Por el contrario, si el volumen del sedimento primario es excesivamente grande podría haber un exceso de desechos que afectarían a la claridad del medio.

Los 40 ml del sedimento primario colocados en el tubo de vidrio o segundo decantador se dejan reposar durante 10 min. El punto crítico de este proceso podría ser un tiempo de sedimentación demasiado corto, las larvas podrían no tener tiempo suficiente para sedimentar y podrían perderse.

Se retiran cuidadosamente 30 ml del sobrenadante mediante succión de la parte superior del medio líquido, del decantador secundario que contiene 40 ml dejando un volumen no superior a 10 ml (sedimento secundario).

En este momento surge otro punto crítico*, que el técnico analista debe valorar y si considera que el medio líquido de digestión no tiene una apariencia suficientemente clara como para examinarse (se aprecia turbidez), puede realizarse una etapa de lavado o aclarado, (se añaden 30 ml de agua corriente, sobre los 10 ml que habíamos obtenido, y se deja el sedimento en reposo nuevamente durante 10'. Transcurrido este nuevo periodo de reposo, nuevamente se retiran cuidadosamente 30 ml del sobrenadante mediante succión de la parte superior del medio líquido, dejando un volumen no superior a 10 ml que será por tanto también un sedimento secundario.

A continuación, se vierte el sedimento secundario en una placa de Petri cuadrículada o en una bandeja de recuento de larvas. Para recuperar las larvas que hayan podido quedar adheridas a las paredes internas de vidrio, el tubo de vidrio o segundo decantador cónico debe enjuagarse con 10 ml de agua, la cual se añade a continuación sobre la placa de Petri.

El volumen final de 20 ml de medio líquido de digestión de la placa de Petri debe dejarse en reposo durante un tiempo de 1 min como mínimo, para dejar que todas las posibles larvas sedimenten antes de su examen microscópico.

Los tiempos de sedimentación deben ser de 30' para la sedimentación primaria y de 10' para la y secundaria para muestras en fresco (los tiempos de sedimentación en el caso de muestras musculares congeladas varían). Si los tiempos de sedimentación son inferiores a los indicados anteriormente, podrían no sedimentar todas las larvas y no recuperarse en el sedimento recogido.

Examen microscópico.

El examen microscópico del sedimento secundario permite reconocer larvas de *Trichinella* por técnicos cualificados y distinguirlas de las de otros muchos nematodos, por su la forma, el color, y la apariencia de las de otros organismos o de los artefactos. Las larvas de *Trichinella* pueden aparecer enroscadas (en condiciones de frío), móviles (en condiciones de calor) o en forma de C (si están muertas).

Para alcanzar la cualificación en el desarrollo de ensayos de digestión de rutina, el técnico debe realizar validaciones de forma correcta el método de digestión artificial/con agi-

tador magnético utilizando muestras de larvas de *Trichinella* añadidas de forma intencionada, recuperando e identificando de forma consistente dichas larvas (proceso de validación). Los analistas deberían cualificarse en base al desarrollo de ensayos de capacitación, conforme a las directrices de la International Commission on Trichinellosis.

Se procederá al examen del medio líquido de digestión de la placa de Petri utilizando un estéreo-microscopio o un triquinoscopio con un aumento de 10x a 20x. El examen debe realizarse de forma sistemática, prestando atención en evitar movimientos de líquido en la placa de Petri.

La transparencia del medio líquido de digestión se debe comprobar **en función** de la **capacidad de enfocar** las líneas de la cuadrícula de la placa de Petri, o alternativamente, de leer una página impresa situada por debajo de la placa de Petri. Si el sedimento secundario no es lo suficientemente transparente como para permitir una fácil identificación de todas las larvas presentes, debe clarificarse de la siguiente manera:

- 1) se transfiere el sedimento secundario junto con el agua corriente de enjuagado de la placa de Petri o de la bandeja de recuento de larvas a un tubo de vidrio limpio (los 20 ml), y se añade más agua corriente, hasta un volumen total de aproximadamente 40 ml.
- 2) se deja sedimentar durante 10 min;
- 3) se retira cuidadosamente el sobrenadante, dejando un volumen de 10 ml;
- 4) se vierte en la placa de Petri cuadrículada original este sedimento junto con un volumen de 10 ml de agua corriente procedente del enjuagado del tubo.

Este proceso es equivalente al proceso de aclarado efectuado tras la obtención por primera vez del sedimento secundario y descrito como uno de los puntos críticos*.

El examen debe realizarse **inmediatamente después de la digestión**, si ello no es posible, la placa de Petri debe almacenarse en condiciones de refrigeración y el medio líquido de digestión en todos los casos debe examinarse el mismo día de la digestión.

Cuando los resultados puedan hacer sospechar la presencia de *Trichinella* o de otros organismos debe examinarse con mayor profundidad en el microscopio con un aumento de 60x a 100x. Si se observa la presencia positiva de *Trichinella*, las larvas deben transferirse lo más rápidamente posible a un vial pequeño (de 1 ml a 2 ml) lleno de etanol 70% al 90% (concentración final) para su conservación hasta ser llevadas a su identificación molecular (por ejemplo, mediante PCR) a nivel de especie/genotipo de todas las larvas que se hayan encontrado, por parte de un laboratorio cualificado.

Si la autoridad competente lo requiere, cuando se hayan efectuado digestiones de mezcla de varios animales, con resultados dudosas o positivas para *Trichinella* deberían repetirse digestiones de muestras combinadas en un número progresivamente inferior (si inicialmente se digirieron 100 cerdos a 1 g /cerdo, se pasa a grupos de 50 de 25, o de 10 cerdos), utilizando un tamaño de muestra superior (mas gramos de muestra por animal) de los animales afectados. Las digestiones de estos nuevos grupos de muestras con resultados negativos

deberían descartarse y deberían seguirse ensayando aquéllas que sigan produciendo resultados positivos, hasta que la digestión de tejidos procedentes de cuerpo(s) individual(es) demuestre el origen del resultado positivo, por todo lo cual uno de los aspectos más importantes a considerar antes del inicio de la digestión es tener asegurada la identificación y trazabilidad de todas las muestras.

Los resultados se deben expresar como larvas de *Trichinella* “presentes” o “ausentes” en “x” gramos de muestra.

Muestras congeladas.

La norma **ISO 18743:2015** contempla el proceso de digestión para muestras congeladas en algunos supuestos, aunque realiza una serie de aclaraciones para este tipo de muestras.

Se trataría de muestras de músculo procedentes de animales (por ejemplo, en la vigilancia del medio natural) que no pueden examinarse directamente tras su recogida o que no pueden mantenerse a una temperatura refrigerada durante varios días, y deben conservarse en condiciones de congelación (-20 °C) hasta el momento de su ensayo.

La congelación matará a la mayoría de las especies y la mayoría de los genotipos de *Trichinella*, pero algunas especies y genotipos ofrecen una resistencia parcial o completa a la congelación (por ejemplo, *T. nativa*). Los resultados de los estudios experimentales muestran que las larvas muertas presentan un tiempo de sedimentación más prolongado debido a un cambio en su forma y densidad (pasando de una forma enroscada a larvas en forma de C).

Por lo tanto, el tiempo de sedimentación debería extenderse para las muestras musculares congeladas, sin olvidar que un tiempo de sedimentación más prolongado podría ocasionar una mayor cantidad de desechos en el sedimento.

El método de digestión artificial puede utilizarse sobre muestras congeladas realizando modificaciones en los siguientes puntos:

Se aumentará la masa de las muestras congeladas analizadas mediante digestión, para compensar la reducción en la sensibilidad del ensayo, dado que la congelación puede afectar a los resultados de la digestión.

Las especies que no son resistentes a la congelación morirán y por consiguiente pueden resultar destruidas durante el proceso de digestión.

También es alta la probabilidad de que las larvas de las especies de *Trichinella* susceptibles a la congelación hayan muerto. Dado que dichas larvas se desenroscan tras su liberación del tejido muscular, su velocidad de sedimentación se reduce. Por consiguiente, el tiempo de sedimentación en el decantador cónico de vidrio de las muestras musculares congeladas en las que pudieran encontrarse larvas muertas debe prolongarse hasta 60 min.

Las larvas muertas pueden tener una apariencia transparente y no enroscada; por lo tanto, su detección con el microscopio es difícil y debe prestarse una atención especial durante el examen del medio líquido de digestión de la placa de Petri.

Se produce una degradación rápida del ADN en las larvas muertas, lo cual podría impedir la identificación molecular de las larvas a nivel de especie y de genotipo.

Anexo 3.

Datos muestreo *Trichinella* por municipios

ANEXO 4: Fichero de datos por municipio del muestreo de zorros y otros mesocarnívoros en el estudio general sobre *Trichinella* spp.

PROVINCIA	MUNICIPIO	MUESTRAS MESOCARNÍVOROS XX CONGRESO SOCEPA	MUESTRAS TRIQUINA ZORROS XX CONGRESO SOCEPA	MUESTRAS TOTAL XX CONGRESO SOCEPA	CONTINUACION MUESTREO TRIQUINA Cyl MESOCARNÍVOROS	CONTINUACION MUESTREO TRIQUINA Cyl ZORROS	MUESTRAS TOTAL SEGUNDO MUESTREO	TOTAL MUESTREOS	TOTAL Triquina +	% PREVALENCIA EN EL ZORRO	% PREVALENCIA EN EL CONJUNTO DE ANIMALES MUESTREADOS	
ÁVILA	CABEZAS DEL VILLAR		9	9				9				
	CONSTANZANA		3	3				3				
	EL MIRÓN		2	2				2				
	FLORES DE ÁVILA		6	6	1		1	7				
	NARROS DEL CASTILLO		1	1				1				
	SALVADIOS		2	2				2				
	SAN MIGUEL DE SERREZUELA		1	1				1				
	ZAPARDIEL DE LA CAÑADA		8	8				8				
SALAMANCA	ABUSEJO		2	2				2				
	ALARAZ				3		3	3				
	ALBA DE TORMES		2	2				2				
	ALBA DE YELTES		5	5				5				
	ALBERGUERIA		4	4				4				
	ALDEARODRIGO		2	2				2				
	ALDEATEJADA		1	1				1				
	ALDEAVIEJA DE TORMES		1	1				1				
	ALDEHUELA DE YELTES		2	2				2				
	ARAPILES		2	2				2				
	ARMENTEROS		16	16				16				
	BAÑOBAREZ		9	9	1		1	10				
	BARBADILLO		1	1				1				
	BARCEO					1	2	3	3			
	BERROCAL DE SALVATIERRA		1	1				1				
	BERROCAL DE HUEBRA						1	1	1			
	BOADA			6	6			6				
	BOVEDA DEL RIO ALMAR		1	1				1				
	BUENAMADRE		3	3				3				
	BUENAVISTA		2	2		1		3				
	CABEZA FRAMONTANOS		3	3				3				
	CABRILLAS		8	8				8				
	CALVARRASA DE ARRIBA		2	2				2				
	CALZADA VANDULCIEL	1	1	2				2				
	CAMPILLO DE AZABA		11	11			1	12				
	CANILLAS		1	1				1				
	CARRASCAL DEL OBISPO		3	3				3				
	CASTILLEJO DE MARTIN VIEJO		4	4				4				
	CERRALBO					1		1	1			
	CESPEDOSA		7	7				7				
	CIUDAD RODRIGO		9	9	1		2	12				
	CUBO DE DON SANCHO	1	5	6	1			7				
	DOÑINOS DE LEDESMA	1	5	6				6				
	EL BODÓN		10	10			3	13				
	EL CABACO					1		1	1			
	EL GUIJO DE ÁVILA		2	2				2				
	EL MANZANO		1	1				1				
	EL MILANO		2	2				2				
	EL VILLAR DE PERALONSO	2	4	6				6				
	ENCINAS DE ARRIBA		2	2				2				
	ENCINASOLA DE LA ENCOMIENDA					1		1	1			
	ESPEJA		4	4			3	7				
	FRADES DE LA SIERRA		2	2				2				
	FRESNO ALHANDIGA		7	7		4		11				
	FUENTEGUINALDO	1	10	11	2		5	18	1		5,55%	
	FUENTES DE BEJAR						1	1	1			
	FUENTES DE OÑORO		3	3				3				
	FUENTES DE SAN ESTEBAN		7	7				7				
	GÁLINDUSTE		6	6	1		3	10				
	GALISANCHO		4	4			1	5				
	GALLEGOS DE ARGANÁN		11	11			1	12	1	8,33%	8,33%	
	GARCHERNADEZ		1	1				1				
	GARCIRREY		16	16				16				
	GEJUELO DEL BARRO	1	0	1				1				
	GOLPEJAS		2	2				2				
	GUADRAMIRO		11	11	5		5	16				
	GUIJUELO		8	8				8				
	HORCAJO MEDIANERO		2	2				2				
	IRUELOS		5	5				5				
	JUZBADO					2		2	2			
	LA ALAMEDILLA		1	1				1				
LA ENCINA		4	4				4					
LA MATA DE LEDESMA		1	1				1					
LA MAYA		1	1				1					
LARRODRIGO					1		1	1				
LAS VEGUILLAS		1	1				1					
LEDESMA	1	4	5	1			6					
LINARES DE RIOFRIO		5	5		4		9					
MACOTERA						1	1	1				
MALPARTIDA		1	1				1					
MARTIN DE YELTES		17	17				17					
MARTINAMOR		2	2	1			3					
MIRANDA DE CASTAÑAR		2	2			1	3	2	100%	100%		
MONLERAS		5	5		2		7					
MONTEJO DE SALVATIERRA		9	9			1	10					
MOZARET		4	4				4					
NARROS DE MATALAYEGUA						1	1					
NAVA DE SOTROBAL					1		1					
NAVALES		4	4				4					

ANEXO 4: Fichero de datos por municipio del muestreo de zorros y otros mesocarnívoros en el estudio general sobre *Trichinella* spp.

PROVINCIA	MUNICIPIO	MUESTRAS MESOCARNÍVOROS XX CONGRESO SOCEPA	MUESTRAS TRIQUINA ZORROS XX CONGRESO SOCEPA	MUESTRAS TOTAL XX CONGRESO SOCEPA	CONTINUACION MUESTREO TRIQUINA CyL MESOCARNÍVOROS	CONTINUACION MUESTREO TRIQUINA CyL ZORROS	MUESTRAS TOTAL SEGUNDO MUESTREO	TOTAL MUESTREOS	TOTAL Triquina +	% PREVALENCIA EN EL ZORRO	% PREVALENCIA EN EL CONJUNTO DE ANIMALES MUESTREADOS
SALAMANCA	PAIARES DE LA LAGUNA		1	1				1			
	PALACIOS DE ARZOBISPO		1	1				1			
	PEDROSILLO DE LOS AIRES		4	4				4			
	PELARRODRIGUEZ		14	14				14			
	PELAYOS		5	5			1	6			
	PEÑARANDA DE BTE					1		1			
	PEÑARANDILLA			1	1			1			
	PERALEJOS DE ARRIBA					1		1			
	PINO DE TORMES			2	2			2			
	PIZARRAL			2	2			2			
	PUEBLA DE AZABA			3	3		1	4			
	PUERTAS			4	4			4			
	RETORTILLO			2	2			2			
	RINCONADA DE LA SIERRA			1	1			1			
	ROBLEDA		1	4	5		1	6			
	ROBLIZA DE COJOS		1	0	1			1			
	ROLLAN			2	2			2			
	SAELICES EL CHICO			1	1			1			
	SAN PEDRO DE ROZADOS			6	6			6			
	SANCHON DE LA RIBERA						1	1			
	SANCTI SPIRITUS			20	20			20			
	SANDO			8	8			8			
	SANTIAGO DE LA PUEBLA		1	8	9	7	1	8			
	SANTIBAÑEZ DE LA SIERRA			3	3			3			
	SARDON DE LOS FRAILES			2	2			2			
	TALA			1	1			1			
	TENEBRON						1	1			
	TERRADILLOS			3	3	1		4			
	TOPAS		1	3	4	2		6			
	TREMEDAL DE TORMES			2	2			2			
	VALDECARROS						1	1			
	VALDELACASA			2	2			2			
	VALDELOSA			4	4			4			
	VALDEMIERQUE		1	7	8	5	4	17	4	36,36%	23,52%
VECINOS			1	1	1		2				
VILLAMAYOR			1	1			1				
VILLAR DE LA YEGUA			2	2		2	4				
VILLAR DEL CIERVO			8	8			8				
VILLARES DE YELTES			4	4			4				
VILLARMAYOR					1		1				
VILLASECO DE GAMITOS		1	2	3			3				
VILLASECO DE LOS REYES		3	28	31			31				
VILLAVIEJA DE YELTES			4	4			4				
VITIGUDINO		1	3	4	1		5				
YECLA DE YELTES			7	7	4		11				
ZAMAYON			2	2			2				
VALLADOLID	ALAEJOS		5	5			5				
	BOBADILLA DEL CAMPO		1	1			1				
	CAMPORREDONDO		1	1			1				
	CASTRONUÑO		8	8			8				
	LOMOVIEJO		1	1			1				
	MEDINA DEL CAMPO		7	7			7				
	MOTEALEGRE DE CAMPOS		9	9			9				
	RUEDA		2	2			2				
	SIETE IGLESIAS DE TRABANCOS		2	2			2				
	VILLAVERDE DE MEDINA		1	1			1				
ZAMORA	ALFARAZ DE SAYAGO	1	17	18			18				
	ALMEIDA DE SAYAGO		8	8		7	15				
	ARGANIL		5	5			5				
	ARGUJILLO		2	2			2				
	BERMILLO DE SAYAGO	1	13	14	1	1	2	16			
	CARBELLINO		1	1			1				
	CASTRILLO DE LA GUAREÑA		2	2			2				
	CORRALES DEL VINO		6	6			6				
	CUBO DE LA TIERRA DEL VINO		6	6		1	1	7			
	CUELGAMURES	1	2	3				3			
	FARIZA		12	12			1	13			
	FRESNO DE SAYAGO		4	4				4			
	GAMONES		9	9			14	23			
	LUELMO		15	15	4	15	19	34	1	2,94%	
	MAYALDE		10	10	2		2	12			
	MORAL DE SAYAGO		2	2	1	2	3	5			
	MORALEJA DE SAYAGO		7	7	1		1	8			
	MORALINA DE SAYAGO		3	3	1		1	4			
	OTERO DE BODAS						1	1			
	PEÑAUSENDE		1	1		1		2			
	PERERUELA		1	1			1	2			
	SALCE		3	3				3			
	TABARA				1	1	2	3			
	TORO		2	2				2			
	TORREGAMONES		8	8	1		1	9			
	VADILLO DE LA GUAREÑA	1	5	6				6			
	VENIALBO		3	3				3			
VILLAMOR DE LOS ESCUDEROS		10	10				10				
VILLANUEVA DE CAMPEAN		1	1				1				
VILLAR DEL BUUY		2	7	9	7	11	18	1	5,55%	3,70%	
TOTAL		24	712	736	81	93	174	910	10		

Anexo 4.

Tabla 22 sobre los procesos de digestión autorizados frente a *Trichinella* spp.

Tabla 22.- Principales diferencias entre el método de referencia para detección de triquinas recogido en el Anexo I del R de ejecución (UE) 2015/1375 y la sustitución por el nuevo método para la detección de triquinas mediante la norma ISO 18743:2015, establecido con la entrada en vigor del nuevo Reglamento (Reglamento (UE) 2020/1478). (Aspecto que se considera como punto crítico a controlar *)

Parámetro		
R 2015/1375	ISO 18743:2015	
Cantidad de muestra	<p>A) En canales enteras de cerdos domésticos Mínimo 1 g para pilar del diafragma. Se describen casos específicos que requieren muestras de tamaño mínimo de 2 g y 4 g B) en el caso de trozos de carne muestra de 5 g de músculo estriado C) En muestras congeladas mínimo 5g.</p>	<p>Definida por la autoridad competente basándose en el riesgo de infección por <i>Trichinella</i> en los animales objeto de investigación, en el conocimiento científico sobre la sensibilidad del método de análisis y los objetivos del ensayo (Anexo A de la Norma) Nunca menos de 1g/ canal.</p>
Procesado de la muestra	<p>La carne picada se transfiere al vaso de precipitados de 3 l que contiene el agua, pepsina, y ácido clorhídrico. El agitador magnético debe ajustarse para que mantenga una temperatura constante de 44 a 46 ° C durante toda la operación.</p>	<p>Para facilitar la homogeneización, una pequeña cantidad de líquido de digestión (o agua) se agrega a la carne en la licuadora. Destaca la importancia de la secuencia correcta de mezcla del líquido de digestión* La temperatura indicada para agitar es de 45 ° C ± 2 ° C.</p>
Sedimentación	<p>Tiempo de 30 minutos en embudo de decantación. Cuando las digestiones no se examinan dentro de los 30 minutos posteriores a la preparación, deben aclararse en el paso por la última probeta y una vez transcurridos los 10 minutos de decantación en esta probeta, retirando 30 ml del líquido sobrenadante, dejando un volumen de 10 ml que se completará hasta 40 ml con agua del grifo, dando un nuevo período de reposo de 10 minutos. El procedimiento puede ser repetido de 2 a 4 veces hasta que el líquido sea lo suficientemente claro para una lectura confiable.</p>	<p>El Anexo B indica incremento en tiempo de sedimentación para muestras congeladas, hasta 60 minutos. Se dan los criterios para evaluar la transparencia del líquido de digestión. Se indica un solo procedimiento de aclaración</p>
Visualización	<p>Análisis inmediato tras la digestión. Si pasan más de 30 minutos deben clarificarse (lavarse) las muestras de sedimento secundario antes de su visualización.</p>	<p>* Se indica el tiempo mínimo necesario para el examen microscópico. Análisis inmediato tras digestión, si se retrasa debe almacenarse refrigerada la placa petri con el sedimento secundario hasta el momento de análisis.</p>
Expresión de resultados	<p>Resultados positivos/ negativos Se detecta/ no se detecta</p>	<p>Presencia /Ausencia referido al peso de la muestra analizada.</p>

Anexo 5.

Imágenes con las peculiaridades del proceso digestión
enzimática 12, 13, 14, 15, 16

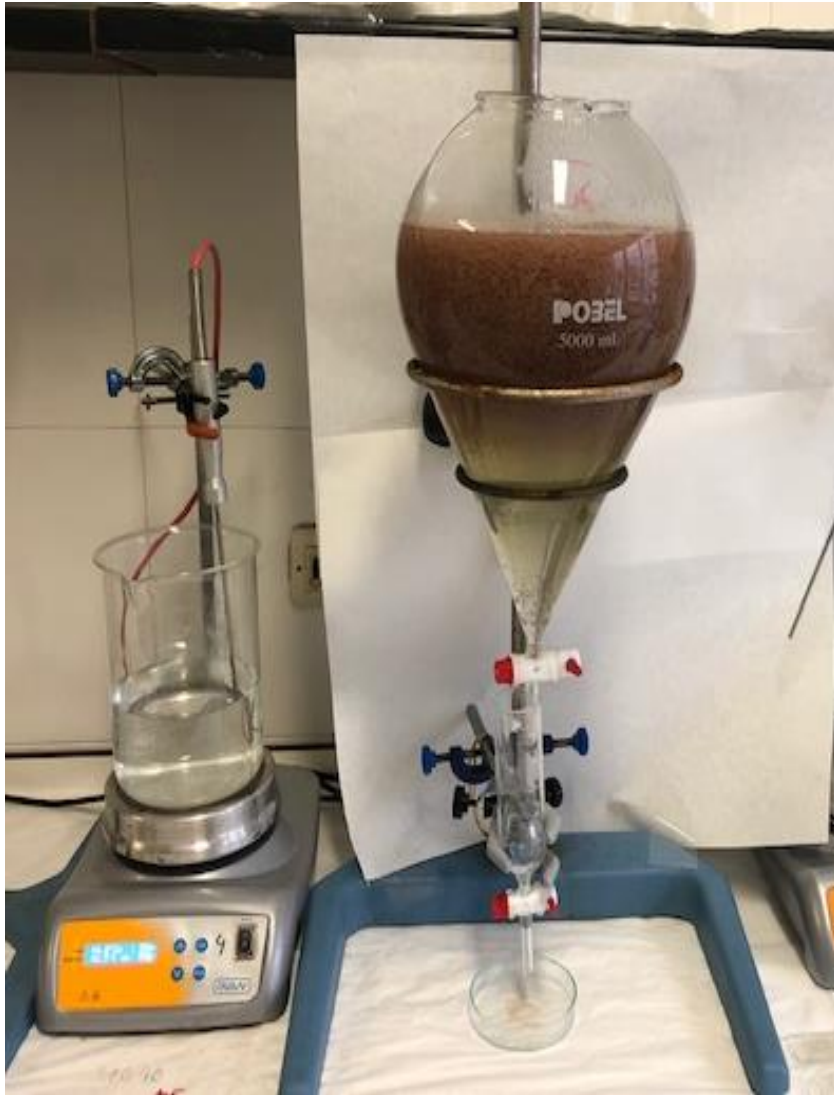


Imagen 12. Fase del proceso de digestión de decantación en embudo

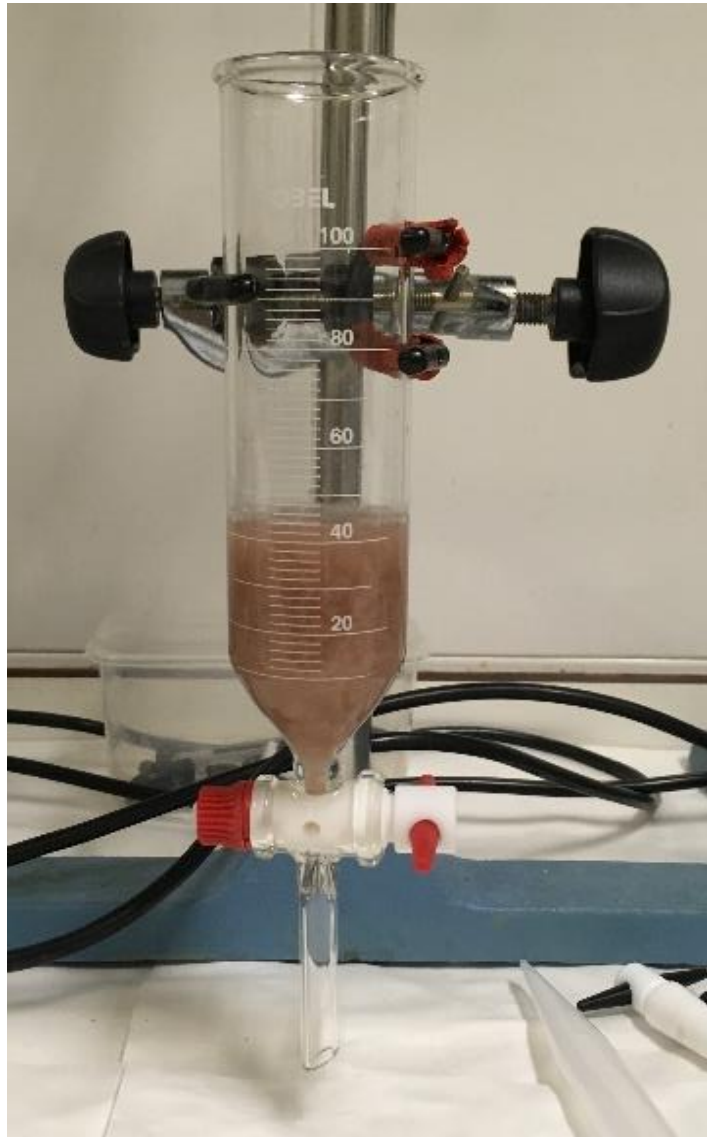


Imagen 13. Probeta inferior graduada, o tubo de centrifugación en el proceso de digestión

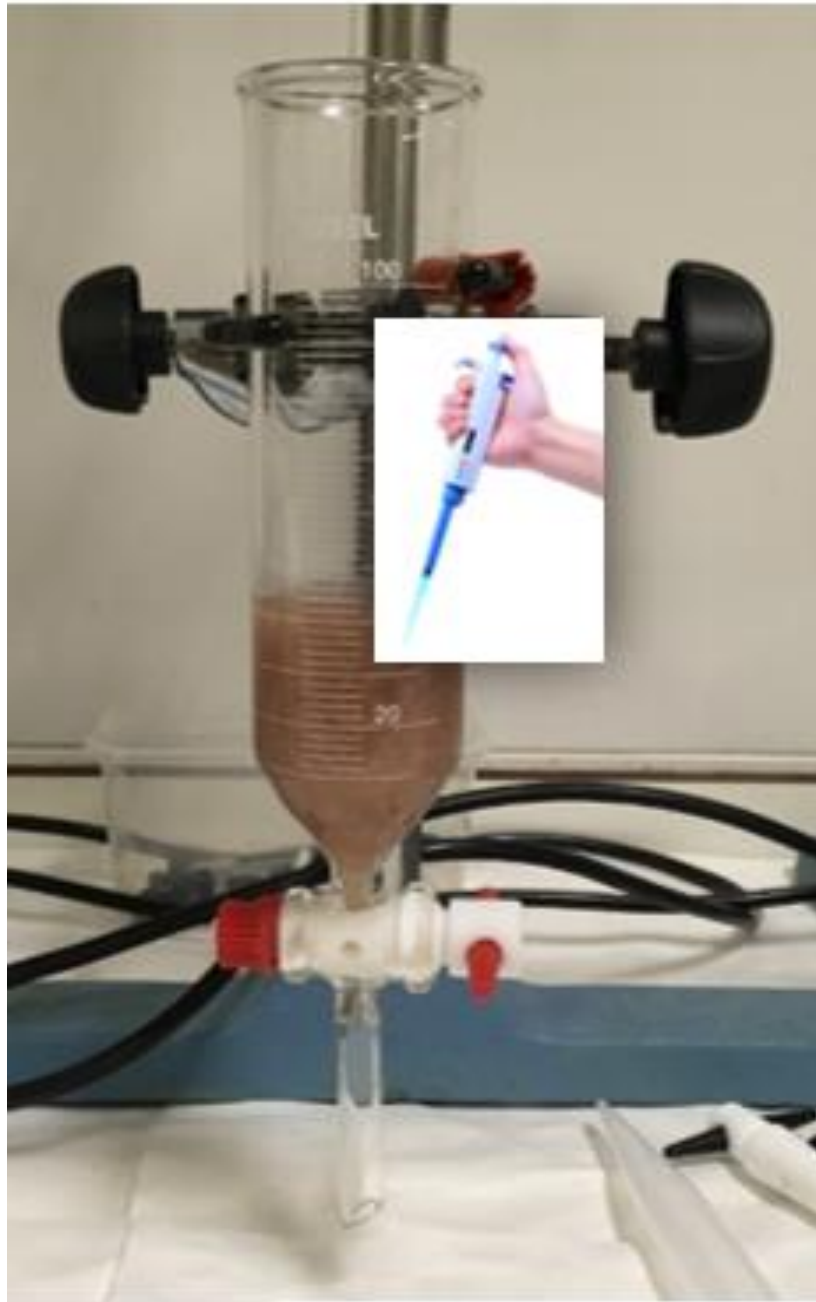


Imagen 14. Aspirado con una pipeta desde la parte superior de la probeta graduada, de 30 ml de contenido, una vez transcurridos 10 minutos de reposo en esta probeta.

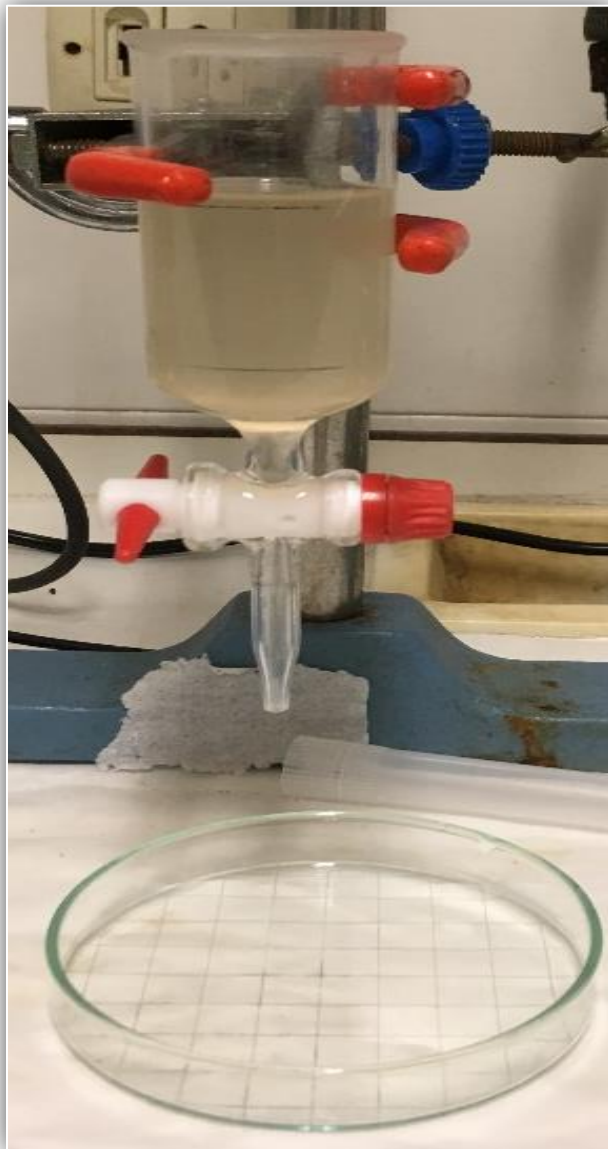


Imagen 15. Aclarado del líquido de la probeta inferior

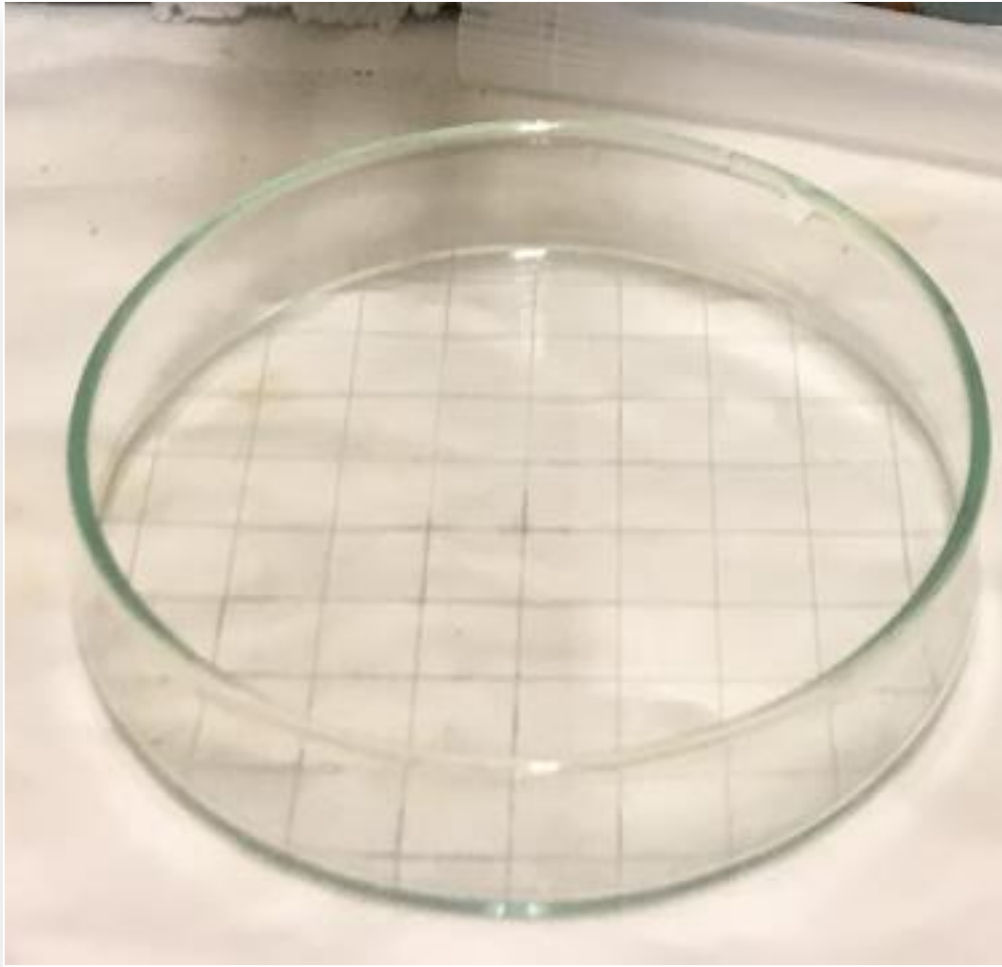


Imagen 16. Placa de petri con cuadrículas para visionado del líquido de digestión

Anexo 6.

Representación de la prevalencia *Spirocerca vulpis* por municipios en las provincias de Salamanca, Zamora y en las provincias muestreadas de Castilla y León

(Figura 10, 11, 12)

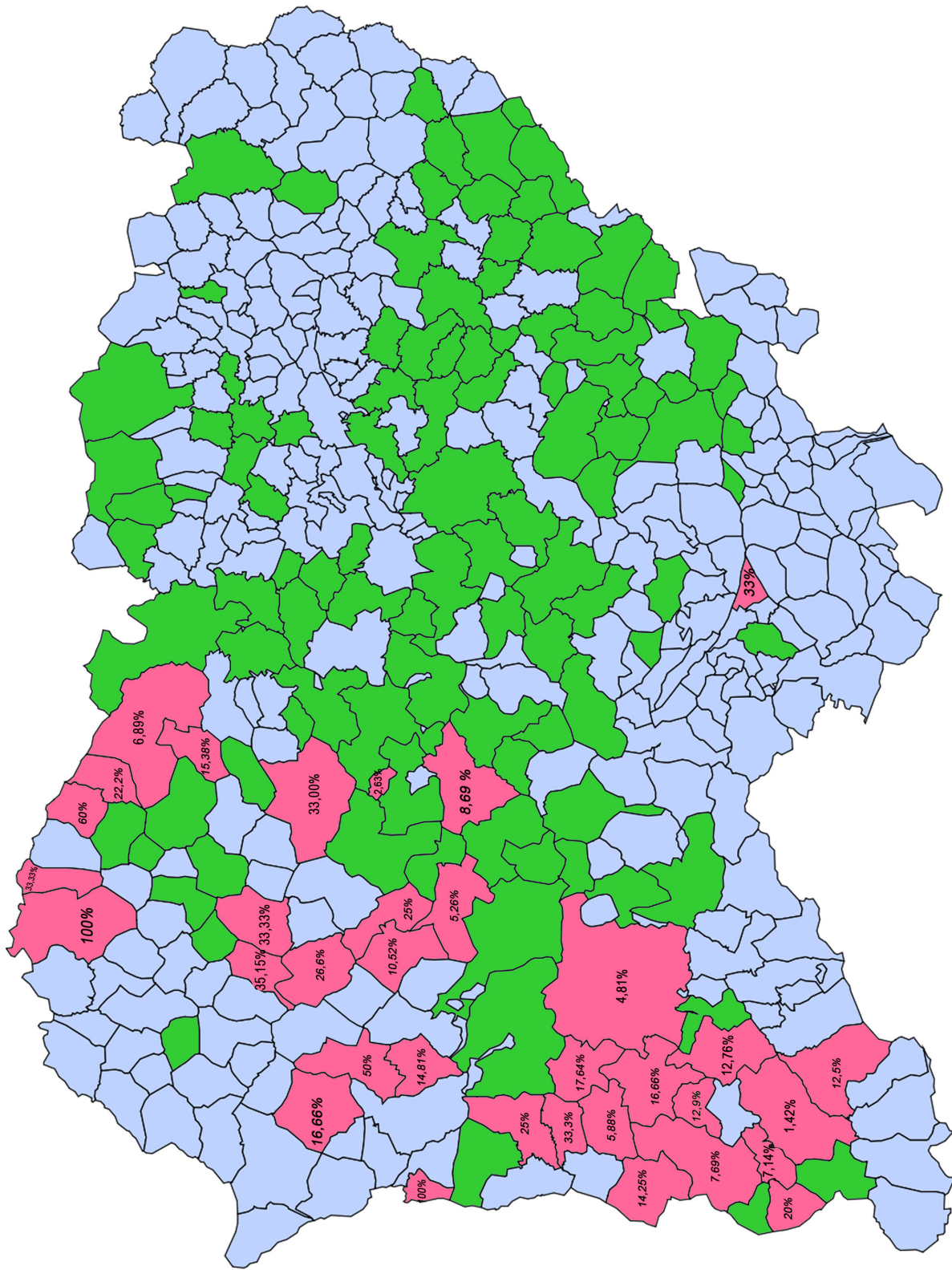


Figura 10.- Representación de la prevalencia de *Spirocerca vulpis* en zorro (*Vulpes vulpes*), en los municipios de la provincia de Salamanca según los datos del estudio de "ocurrencia, prevalencia y variables ambientales explicativas de la infestación por *Spirocerca vulpis* en los zorros del oeste de España".

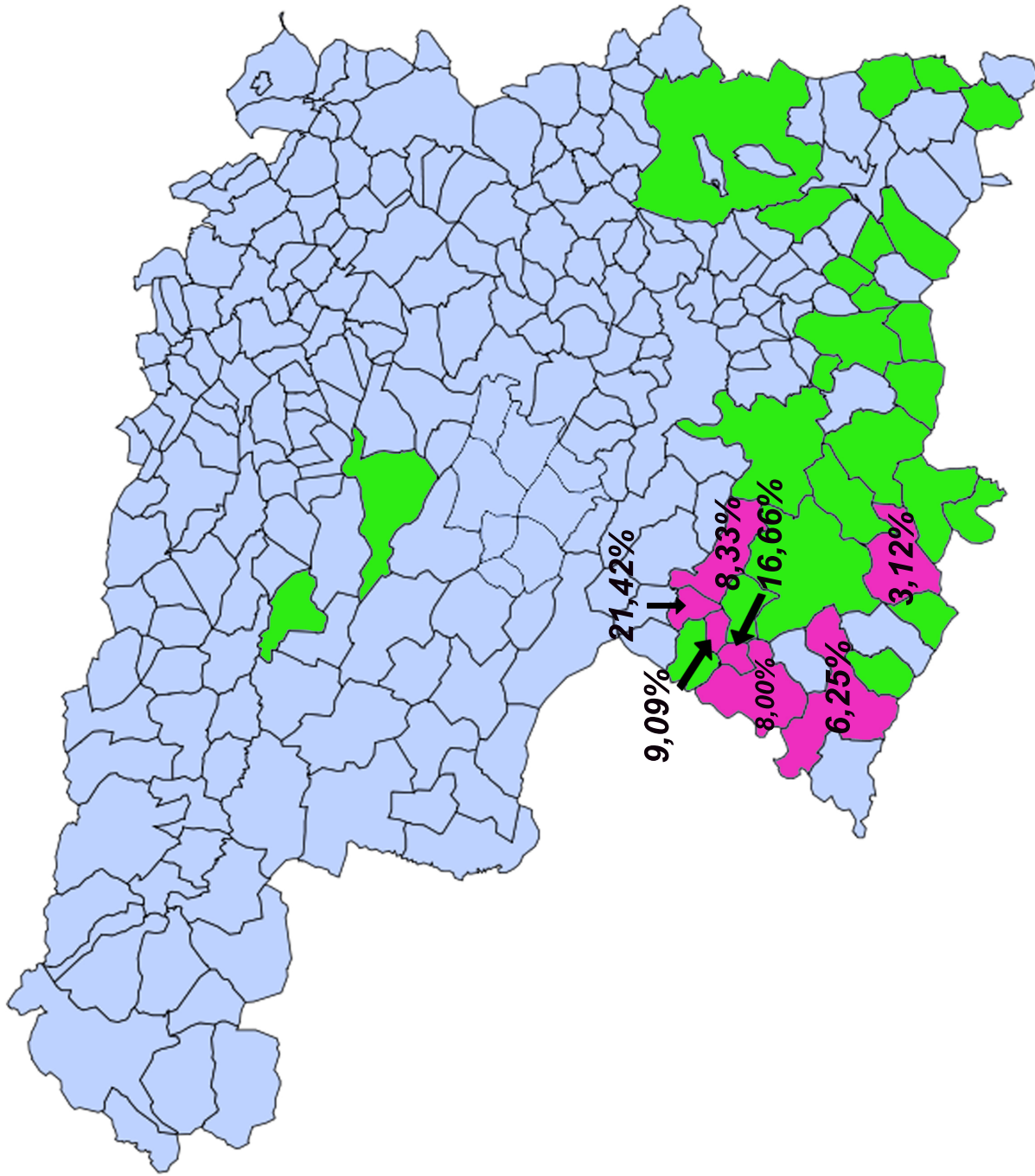


Figura 11.- Representación de la prevalencia de *Spirocerca vulpis* en zorro (*Vulpes vulpes*), en los municipios de la provincia de Zamora según los datos del estudio de "ocurrencia, prevalencia y variables ambientales explicativas de la infestación por *Spirocerca vulpis* en los zorros del oeste de España".

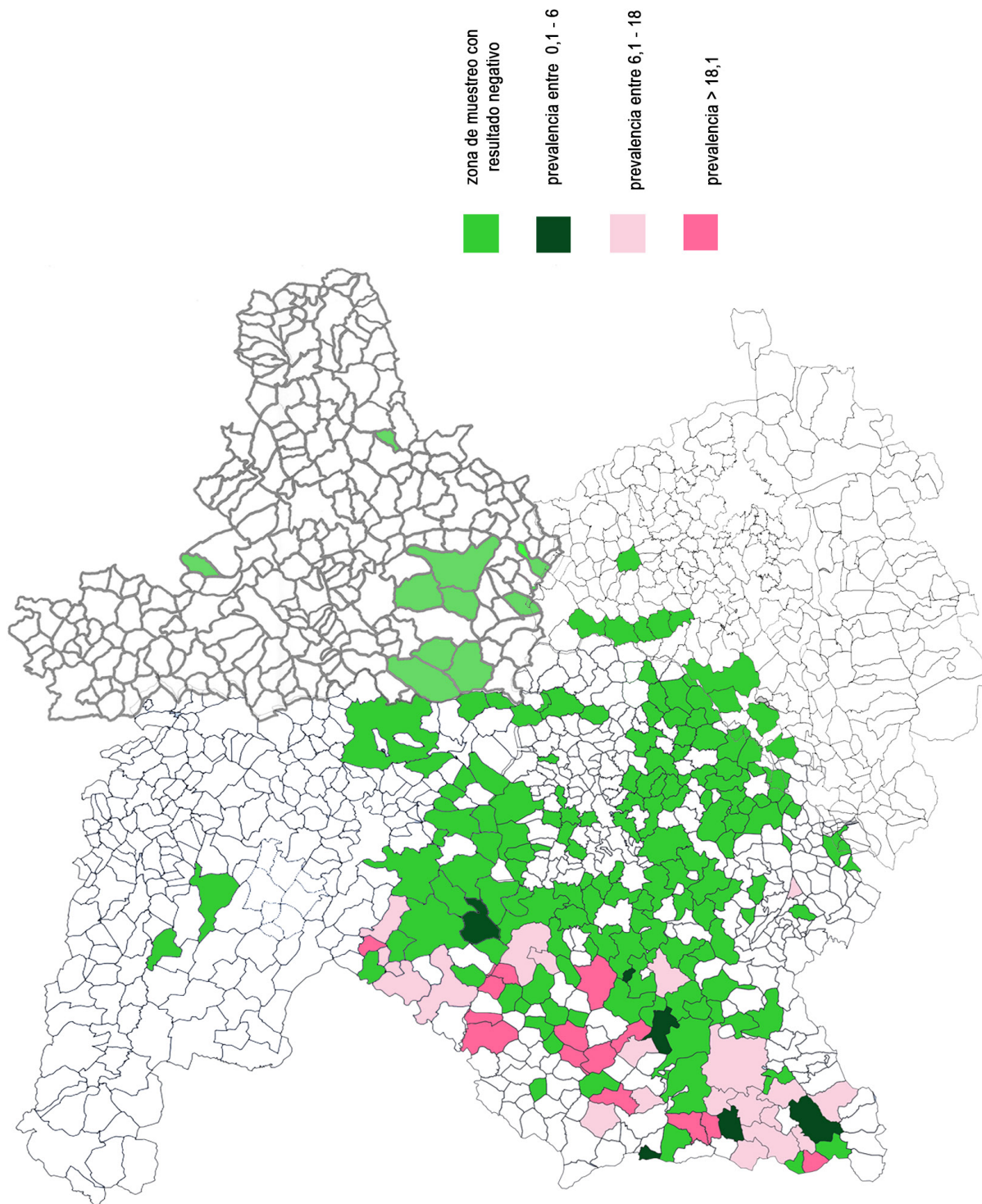


Figura 12.- Representación de la prevalencia de *Spirocerca vulpis* en zorro (*Vulpes vulpes*), por municipios en las provincias muestreadas de Castilla y León (Ávila, Salamanca, Valladolid, Zamora).

Anexo 7.

Autorizaciones de las revistas científicas para el uso de
los derechos de reproducción

SPRINGER NATURE LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Jan 25, 2022

This Agreement between Dr. Eva Frontera ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

License Number	5234860627715
License date	Jan 23, 2022
Licensed Content Publisher	Springer Nature
Licensed Content Publication	Parasitology Research
Licensed Content Title	Occurrence, prevalence, and explanatory environmental variables of <i>Spirocerca vulpis</i> infestation in the foxes of western Spain
Licensed Content Author	M. Martín-Pérez et al
Licensed Content Date	Jan 13, 2020
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	academic/university or research institute
Format	electronic
Portion	full article/chapter
Will you be translating?	no
Circulation/distribution	1 - 29
Author of this Springer Nature content	yes
Title	Thesis: El zorro rojo (<i>Vulpes vulpes</i>) como especie centinela en el monitoreo de zoonosis de ciclo directo (<i>Trichinella</i> spp) e indirecto (<i>Spirocerca</i> spp) y la interacción con el medio ambiente
Institution name	University of Extremadura
Expected presentation date	Mar 2022

for these rights.

4. Where permission has been granted **free of charge** for material in print, permission may also be granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to your work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version.
5. An alternative scope of licence may apply to signatories of the [STM Permissions Guidelines](#), as amended from time to time.

Duration of Licence

1. A licence for is valid from the date of purchase ('Licence Date') at the end of the relevant period in the below table:

Scope of Licence	Duration of Licence
Post on a website	12 months
Presentations	12 months
Books and journals	Lifetime of the edition in the language purchased

Acknowledgement

1. The Licensor's permission must be acknowledged next to the Licenced Material in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figures/tables/illustrations or abstract, and must be hyperlinked to the journal/book's homepage. Our required acknowledgement format is in the Appendix below.

Restrictions on use

1. Use of the Licensed Material may be permitted for incidental promotional use and minor editing privileges e.g. minor adaptations of single figures, changes of format, colour and/or style where the adaptation is credited as set out in Appendix 1 below. Any other changes including but not limited to, cropping, adapting, omitting material that affect the meaning, intention or moral rights of the author are strictly prohibited.
2. You must not use any Licensed Material as part of any design or trademark.
3. Licensed Material may be used in Open Access Publications (OAP) before publication by Springer Nature, but any Licensed Material must be removed from OAP sites prior to final publication.

Ownership of Rights

1. Licensed Material remains the property of either Licensor or the relevant third party and any rights not explicitly granted herein are expressly reserved.

Warranty

IN NO EVENT SHALL LICENSOR BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON

OR FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL OR INDIRECT DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL APPLY NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.

☒ Limitations

1. **BOOKS ONLY:** Where 'reuse in a dissertation/thesis' has been selected the following terms apply: Print rights of the final author's accepted manuscript (for clarity, NOT the published version) for up to 100 copies, electronic rights for use only on a personal website or institutional repository as defined by the Sherpa guideline (www.sherpa.ac.uk/romeo/).
2. For content reuse requests that qualify for permission under the [STM Permissions Guidelines](#), which may be updated from time to time, the STM Permissions Guidelines supersede the terms and conditions contained in this licence.

☒ Termination and Cancellation

1. Licences will expire after the period shown in Clause 3 (above).
2. Licensee reserves the right to terminate the Licence in the event that payment is not received in full or if there has been a breach of this agreement by you.

Appendix 1 — Acknowledgements:

For Journal Content:

Reprinted by permission from [the Licensor]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)]

For Advance Online Publication papers:

Reprinted by permission from [the Licensor]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication), advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].)]

For Adaptations/Translations:

Adapted/Translated by permission from [the Licensor]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)]

Note: For any republication from the British Journal of Cancer, the following credit line style applies:

Reprinted/adapted/translated by permission from [the Licensor]: on behalf of Cancer Research UK: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)]

For **Advance Online Publication** papers:

Reprinted by permission from The **[the Licensor]**: on behalf of Cancer Research UK: **[Journal Publisher]** (e.g. Nature/Springer/Palgrave) **[JOURNAL NAME]** **[REFERENCE CITATION]** (Article name, Author(s) Name), **[COPYRIGHT]** (year of publication), advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM])

For Book content:

Reprinted/adapted by permission from **[the Licensor]**: **[Book Publisher]** (e.g. Palgrave Macmillan, Springer etc) **[Book Title]** by **[Book author(s)]** **[COPYRIGHT]** (year of publication)

Other Conditions:

Version 1.3

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.



Debra Bourne <editor@wildlifedisease.org>	21 ene 2022, 15:13

Dear Eva,

Thank you for your enquiry regarding using your publication in the Journal of Wildlife Diseases as a chapter in Manuel's PhD Thesis.

We are happy to grant permission for inclusion of "Manuel Martín-Pérez, Luis Gómez-Gordo, Javier Galapero, Juan Enrique Pérez-Martín, Daniel Bravo-Barriga, Rafael Calero-Bernal, Eva Frontera. Characterization of lesions induced by *Spirocerca vulpis* (Spiruridae: spiroceridae) in red foxes (*Vulpes vulpes*). Journal of Wildlife Diseases 2021. 58(1), 137-147. DOI: 10.7589/JWD-D-20-00162" as part of Manuel Martín-Pérez's thesis.

Please note that no further rights are granted.

If there's anything more you need from me, please let me know.

Best wishes,

Debra

Dr Debra Bourne MA VetMB PhD MRCVS

Editor-in-Chief, Journal of Wildlife Diseases

she/her/Dr

Wildlife Disease Association

editor@wildlifedisease.org

+44(0)7702 892995

"The role of disease in wildlife conservation has probably been radically underestimated." - Aldo Leopold, 1933.

PAPER OF THE MONTH

Journal of Nematology is the official technical and scientific communication publication of the **Society of Nematologists** since 1969. The journal publishes original papers on all aspects of basic, applied, descriptive, theoretical or experimental nematology and adheres to strict peer-review policy. Other categories of papers include invited reviews, research notes, abstracts of papers presented at annual meetings, and special publications as appropriate.

From volume 2019 the journal is published in a [continuous format](#).

New Article Processing Charge (APC) Policy – Postponed until April 15, 2021

As of April 15, 2021, all articles submitted to the Journal of Nematology will be subject to an APC. Only accepted articles will be subject to the APC, which will be due prior to final publication of the article. APCs will be \$200 USD for Society of Nematologists members, and \$400 USD for non-members. Note, Society membership is \$60.00 for regular members and \$30.00 for students. You can join the Society at: <https://nematologists.org/join-us>

APC waivers may be granted to authors from underdeveloped countries as defined by the United Nations.

Back Issues

All past articles are available for download [here](#).

Open Access Policy

This journal provides immediate open access to its content under the **Creative Commons CC BY 4.0 license** on the principle that making research freely available to the public supports a greater global exchange of knowledge. Under the **Creative Commons CC BY 4.0 license** users are free to share (copy and redistribute the material in any medium or format) and adapt the work (remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially) if the contribution was properly attributed and all of the changes indicated.

BIBLIOGRAFÍA

- Abad, D., Chávez, A., Pinedo, R., Tantaleán, M., & Gonzáles-Viera, O. (2016).** Helmintofau-na gastrointestinal de importancia zoonótica y sus aspectos patológicos en roedores (*Rattus* spp) en tres medioambientes. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 27(4), 736-750.
- Acevedo, P., Escudero, M. A., Muñoz, R., & Gortázar, C. (2006).** Factors affecting wild boar abundance across an environmental gradient in Spain. *Acta Theriologica*, 51(3), 327-336.
- Adkins, C. A., & Stott, P. (1998).** Home ranges, movements and habitat associations of red foxes *Vulpes vulpes* in suburban Toronto, Ontario, Canada. *Journal of Zoology*, 244(3), 335-346.
- AEMA. (2010).** Agencia Europea de Medio Ambiente, Copenhague. (2010). El medio ambiente en Europa: Estado y perspectivas 2010 - síntesis. <https://www.miteco.gob.es/es/ceneam/recursos/quien-es-quien/aema.aspx>
- AENOR. (2016).** Versión española. Microbiología de la cadena alimentaria detección de *Trichinella* larvae en carne método físico por digestión artificial (ISO 18743:2015).
- AESAN. (2020).** Plan Nacional de Contingencia frente a Triquina. Protocolos de actuación tras la sospecha y /o identificación de triquina en animales domésticos y silvestres destinados al consumo humano o en personas. Actualización enero 2020. https://www.aesan.gob.es/AE-COSAN/web/home/aecosan_inicio.htm
- Aguado, M., Espinosa, P., Romero-Maté, A., Tardío, J. C., Córdoba, S., & Borbujo, J. (2013).** Brote de leishmaniasis cutánea en el municipio de Fuenlabrada. *Actas Dermo-Sifilográficas*, 104(4), 334-342.
- Aguirre, A. A. (2009).** Wild canids as sentinels of ecological health: a conservation medicine perspective. *Parasites & Vectors*, 2(1), 1-8.
- Alexander, A. B., Poirotte, C., Porton, I. J., Freeman, K. L., Rasambainarivo, F., Olson, K. G., & Deem, S. L. (2016).** Gastrointestinal parasites of captive and free-living lemurs and domestic carnivores in eastern Madagascar. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 47(1), 141-149.
- Alicata, J. (1935).** Early developmental stages of nematodes occurring in Swine, Technical Bulletin 489 Department of Agriculture. Editorial, Washington, DC, 1488-2016-124319.
- Allen, J. D., & Esquela-Kerscher, A. (2013).** *Gongylonema pulchrum* infection in a resident of Williamsburg, Virginia, verified by genetic analysis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 89(4), 755-757.
- Allen, J. E., & Maizels, R. M. (2011).** Diversity and dialogue in immunity to helminths. *Nature Reviews Immunology*, 11(6), 375-388.
- Al-Sabi, M. N. S., Hansen, M. S., Chriél, M., Holm, E., Larsen, G., & Enemark, H. L. (2014).** Genetically distinct isolates of *Spirocerca* spp, from a naturally infected red fox (*Vulpes vulpes*) from Denmark. *Veterinary Parasitology*, 205(1-2), 389-396.

- Amores, F. (1975).** Diet of the red fox (*Vulpes vulpes*) in the western Sierra Morena (south Spain). *Doñana, Acta Vertebrata*, 2(2), 221-229.
- Amundrud, S. L., & Srivastava, D. S. (2015).** Drought sensitivity predicts habitat size sensitivity in an aquatic ecosystem. *Ecology*, 96 (7), 1957–1965.
- Anantaraman, M., & Jayalakshmi, N. (1963).** On the life-history of *Spirocerca lupi* (Rudolphi, 1809), a nematode of dogs in India. In *Proceedings of the Indian Academy of Sciences-Section B*. Springer India, 58(3), 137-147.
- Anantaraman, M., & Sen, K. (1966).** Experimental spirocercosis in dogs with larvae from a paratenic host, *Calotes versicolor*, the common garden lizard in Madras. *Journal of Parasitology*, 52(5), 911-912.
- Anderson, R. C. (2000).** Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission. CABI publishing, Wallingford, Oxon, UK, 2^a edicion, 650.
- Angkasekwinai, P., Sodthawon, W., Jeerawattanawart, S., Hansakon, A., Pattanapanyasat, K., & Wang, Y. H. (2017).** ILC2s activated by IL-25 promote antigen-specific Th2 and Th9 functions that contribute to the control of *Trichinella spiralis* infection. *PLoS One*, 12(9).
- Appelberg, R. (2007).** Neutrophils and intracellular pathogens: beyond phagocytosis and killing. *Trends in Microbiology*, 15(2), 87-92.
- Appleton, J. A. (1991).** Consensus on *Trichinella spiralis* antigens and antibodies. *Parasitology Today*, 7, 190-192.
- Aranzamendi, C., Tefsen, B., Jansen, M., Chiumiento, L., Bruschi, F., Kortbeek, T., & Van Die, I. (2011).** Glycan microarray profiling of parasite infection sera identifies the LDNF glycan as a potential antigen for serodiagnosis of trichinellosis. *Experimental Parasitology*, 129(3), 221-226.
- Arellano, L., León-Cortés, J., & Ovaskainen, O. (2008).** Patterns of abundance and movement in relation to landscape structure: a study of a common scarab (*Canthon cyanellus cyanellus*) in Southern Mexico. *Landscape Ecology*, 23, 69– 78.
- Aroch, I., Markovics, A., Mazaki-Tovi, M., Kuzi, S., Harrus, S., Yas, E., & Lavy, E. (2015a).** Spirocercosis in dogs in Israel: a retrospective case-control study (2004–2009). *Veterinary Parasitology*, 211(3-4), 234-240.
- Aroch, I., Rojas, A., Slon, P., Lavy, E., Segev, G., & Baneth, G. (2015b).** Serological cross-reactivity of three commercial in-house immunoassays for detection of *Dirofilaria immitis* antigens with *Spirocerca lupi* in dogs with benign esophageal spirocercosis. *Veterinary Parasitology*, 211(3-4), 303-305.
- Aroch, I., Arogeti, I., Marcovics, A., Spiegel, Y., & Lavy, E. (2017).** In vitro lectin binding to the outer surface of *Spirocerca lupi* at different life-stages. *Veterinary Parasitology*, 235, 94-99.

- Arriaga, C., Yépez-Mulia, L., Viveros, N., Adame, L. A., Zarlenga, D. S., Lichtenfels, J. R., & Ortega-Pierres, M. G. (1995).** Detection of *Trichinella spiralis* muscle larvae in naturally infected horses. *The Journal of Parasitology*, 781-783.
- Arroyo, J. G. (2017).** Caracterización de la patología pulmonar en corderos de cebo del sur-oeste de Extremadura: factores de riesgo y parámetros de estrés asociados. Tesis Doctoral, Universidad de Extremadura (España).
- Artois, M. (1989).** Le renard roux (*Vulpes vulpes*, Linnaeus. 1758). In: Encyclopédie des Carnivores de France, Vol 3 (ediciones. M. Artois and P. Delattre), 1–89.
- Artois, M. (1997).** Managing problem wildlife in the 'Old World': a veterinary perspective. *Reproduction, Fertility and Development*, 9(1), 17-26.
- Atlas Climático Ibérico. (2011).** Elaborado por el Departamento de Producción de AEMET y por el Departamento de Meteorología y Clima del Instituto de Meteorología de Portugal. https://www.aemet.es/documentos/es/conocermas/recursos_en_linea/publicaciones_y_estudios/publicaciones/Atlas-climatologico/Atlas.pdf
- Austin, C. M., Kok, D. J., Crafford, D., & Schaper, R. (2013).** The efficacy of a topically applied imidacloprid 10%/moxidectin 2.5% formulation (Advocate®, Advantage® Multi, Bayer) against immature and adult *Spirocerca lupi* worms in experimentally infected dogs. *Parasitology Research*, 112(1), 91-108.
- Ayala, M. A., & Yench, M. W. (2012).** *Gongylonema*: a parasitic nematode of the oral cavity. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery*, 138(11), 1082-1084.
- Baidal, J. A. I. (2000).** Tourism and rural areas: concepts, philosophies and realities. *Investigaciones Geográficas*, (23), 59.
- Bailey, W. (1963a).** Parasites and cancer: sarcoma in dogs associated with *Spirocerca lupi*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 108(3), 890-923.
- Bailey, W., Cabrera, D., & Diamond, D. (1963b).** Beetles of the family Scarabaeidae as intermediate hosts for *Spirocerca lupi*. *The Journal of Parasitology*, 49(3), 485-488.
- Bailey, W. (1972).** *Spirocerca lupi*: a continuing inquiry. *Journal of Parasitology*, 58(1), 3-22.
- Baker, P., Robertson, C., Funk, S., & Harris, S. (1998).** Potential fitness benefits of group living in the red fox, *Vulpes vulpes*. *Animal Behaviour*, 56(6), 1411-1424.
- Baker, P., Funk, S., Harris, S., & White, P. (2000).** Flexible spatial organization of urban foxes, *Vulpes vulpes*, before and during an outbreak of sarcoptic mange. *Animal Behaviour*, 59(1), 127-146.
- Balestrieri, A., Remonti, L., & Prigioni, C. (2007).** The red fox-*Trichinella* relationship: a review of past and recent evidence. *Hystrix-the Italian Journal of Mammalogy*, 18(1).
- Ballesteros, T., & Degollada, A. (2002).** Dieta de la guineu (*Vulpes vulpes*) al Parc Natural de Sant Llorenç del Munt i l'Obac. V Trobada d'Estudiosos de de Sant Llorenç del Munt i l'Obac. *Monografies*, 35, 141-146.

- Ballesteros, H., & Aristizabal, G. (2007).** Información técnica sobre gases de efecto invernadero y el cambio climático. Bogotá DC: nota técnica del IDEAM.
- Ballesteros, T., Degollada, A., & Baquedano, L. (1998).** Estimación de la abundancia de zorros (*Vulpes vulpes*), garduñas (*Martes foina*) y gatos domésticos (*Felis catus*) en el P.N. de Sant Llorenç del Munt (Cataluña). Galemys: Boletín informativo de la Sociedad Española para la conservación y estudio de los mamíferos 10(1), 129-133.
- Barrull, J., & Mate, I. (2007).** Alimentación de los Mamíferos Carnívoros en el Parque Natural de la Sierra de Montsant. Parque Natural de la Sierra de Montsant. Departamento de Medio Ambiente y Vivienda. Generalidad de Cataluña. 63 pp.
- Basto, M., Santos-Reis, M., Simões, L., Grilo, C., Cardoso, L., Cortes, H., & Fernandes, C. (2016).** Assessing genetic structure in common but ecologically distinct carnivores: the stone marten and red fox. PloS One, 11(1), e0145165.
- Battistelli-Lux, C. (2013).** Buccal infection with *Gongylostrongylus pulchrum*: an indigenous case in France. In Annales de Dermatologie et de Vénérologie, 140(10), 623-627.
- Battisti, E., Zanet, S., Khalili, S., Triscioglio, A., Hertel, B., & Ferroglio, E. (2020).** Molecular survey on vector-borne pathogens in alpine wild carnivorans. Frontiers in Veterinary Science, 7, 1.
- Belghith, M., Bluestone, J., Barriot, S., Mégret, J., Bach, J., & Chatenoud, L. (2003).** TGF- β -dependent mechanisms mediate restoration of self-tolerance induced by antibodies to CD3 in overt autoimmune diabetes. Nature Medicine, 9(9), 1202-1208.
- Bengis, R., Kock, R., & Fischer, J. (2002).** Infectious animal diseases: the wildlife/livestock interface. Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties 21(1), 53-65.
- Bergman, D., Breck, S., & Bender, S. (2009).** Dogs gone wild: feral dog damage in the United States. In Proceedings of the 13th WDM conference, ediciones. J. Boulanger, New York: Saratoga Springs, 177-183.
- Bernard, J. (1963).** Etudes sur la faune parasitaire de Tunisie. I. Nématodes parasites des Muridae. Extrait des Archives de l'Institut Pasteur de Tunis, 40, 5-64.
- Berry, W. (2000).** *Spirocerca lupi* esophageal granulomas in 7 dogs: resolution after treatment with doramectin. Journal of Veterinary Internal Medicine, 14(6), 609-612.
- Beugnet, F., Crafford, D., de Vos, C., Kok, D., Larsen, D., & Fourie, J. (2016).** Evaluation of the efficacy of monthly oral administration of afoxolaner plus milbemycin oxime (NexGard Spectra®, Merial) in the prevention of adult *Spirocerca lupi* establishment in experimentally infected dogs. Veterinary Parasitology, 226, 150-161.
- Beutler, B. (2004).** Innate immunity: an overview. Molecular Immunology, 40(12), 845-859.
- Bieber, C., & Ruf, T. (2005).** Population dynamics in wild boar *Sus scrofa*: ecology, elasticity of growth rate and implications for the management of pulsed resource consumers. Journal of Applied Ecology, 42(6), 1203-1213.

- Bieñ, J. (2007).** The usefulness of ELISA test for early serological detection of *Trichinella* spp. infection in pigs. *Wiadomosci Parazytologiczne*, 53(2), 149-151.
- Bingle, L., Brown, N., & Lewis, C. (2002).** The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 196(3), 254-265.
- Biocca, E. (1959).** Prenatal Human Infection with *Spirocerca lupi*. *Parassitologia*, 1(2), 137-42.
- Blanco, J., Gamito-Santos, J.A., Calero-Bernal, R., Suárez-López, I., Serrano-Aguilera, F.J., & Pérez-Martín, J.E. (2009).** Situación epidemiológica de la trichinellosis en Extremadura (España) en la temporada 2008/2009: peculiaridades detectadas sobre casos de infecciones naturales. *Acta Parasitológica Portuguesa*, 16(1), 84-85.
- Blanco, J. C. (1988).** Estudio ecológico del zorro, *Vulpes vulpes*, en la Sierra de Guadarrama. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid (España).
- Blanco, J. C. (1990).** Tras las huellas del zorro común. *Quercus*, 47, 8-19.
- Blancou., & Albignac. (1976).** Note sur l'infestation des Lémuriens malgaches par *Spirocerca lupi* (Rudolphi, 1809). *La Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux.*, 29 (2), 127-130
- Blondel, J. (2006).** The 'design' of Mediterranean landscapes: a millennial story of humans and ecological systems during the historic period. *Human Ecology*, 34, 713–729.
- Blume, G., Reis Junior, J., Gardiner, C., Hoberg, E., Pilitt, P., Monteiro, R., & De Sant'Ana, F. (2014).** *Spirocerca lupi* granulomatous pneumonia in two free-ranging maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) from central Brazil. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 26(6), 815-817.
- Bolas-Fernandez, F., & Del Corral Bezara, L. (2006).** TSL-1 antigens of *Trichinella*: an overview of their potential role in parasite invasion, survival and serodiagnosis of trichinellosis. *Research in Veterinary Science*, 81(3), 297-303.
- Borah, N., Malik, M., Kanta, C., Chandra, P., Bhattacharjee, K., Rahman, T., Kalita, A., & Saikia, M. (2015).** A rare case of *Spirocerca lupi* infection in the anal mucosa of a dog and its surgical management. *International Journal of Recent Scientific Research*, 6, 6533–6535.
- Bowman, D., & Lynn, R. (1999).** *Georgis' Parasitology for Veterinarians*, 7th edicion., Saunders, Philadelphia.
- Bravo-Barriga, D., Martín-Pérez, M., Lobo, J. M., Parreira, R., Pérez-Martín, J. E., & Frontera, E. (2021).** First detection of *Gongylonema* species in *Geotrupes mutator* in Europe. *Journal of Nematology*, 53.
- Brenner, O. J., Botero-Anug, A. M., Rojas, A., Hahn, S., & Baneth, G. (2020).** Aberrant mesenteric migration of *Spirocerca lupi* larvae causing necrotizing eosinophilic arteritis, thrombosis, and intestinal infarction in dogs. *Veterinary Pathology*, 57(2), 281-285.

- Britov, V., & Boev, S. (1972).** Taxonomic rank of various strains of *Trichinella* and their circulation in nature. *Vestnik Akademii Naitk Kazakhskoi SSR*, 28(4), 27-32.
- Broderick, N., Raffa, K., Goodman, R., & Handelsman, J. (2004).** Census of the bacterial community of the gypsy moth larval midgut by using culturing and culture-independent methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(1), 293-300.
- Brodey, R., Thomson, R., Sayer, P., & Eugster, B. (1977).** *Spiroceca lupi* infection in dogs in Kenya. *Veterinary Parasitology*, 3(1), 49-59.
- Bruschi, F., Moretti, A., Wassom, D., & Fioretti, D. (2001).** The use of a synthetic antigen for the serological diagnosis of human trichinellosis. *Parasite*, 8, S141-S143.
- Bumby, M., Williams, M., Steyl, J., Harrison-White, R., Lutermann, H., Fosgate, G., & Clift, S. J. (2017).** Genotyping and comparative pathology of *Spirocerca* in black-backed jackals (*Canis mesomelas*) in South Africa. *BMC Veterinary Research*, 13(1), 245.
- Cabo, A. (1976).** Origen de las dehesas Salmantinas. *Anuario Centro Edafologico. Biología Aplicada. CSIC*, 3, 341-354.
- Cabrera, A. (1914).** Fauna Ibérica. Mamíferos. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid. 441 pp.
- Cabrero-Sañudo, F., Trotta-Moreu, N., Corra, M., & Bravo, Ó. (2008).** De la meseta central de la Península Ibérica. *Boletín Sociedad Entomológica Aragonesa*, 1(42), 305-315.
- Cain, D., Kondo, M., Chen, H., & Kelsoe, G. (2009).** Effects of acute and chronic inflammation on B-cell development and differentiation. *Journal of Investigative Dermatology*, 129(2), 266-277.
- Calero-Bernal, R., Gómez-Gordo, L., Corchado-Araujo, M., Cuesta-Gerveno, J.M., Blanco-Ciudad, J., & Pérez-Martín, J.E. (2011).** Prevalence of *Spirocerca lupi* in red foxes from Extremadura (Spain). XII Congreso Ibérico de Parasitología. 5-8 de Julio de 2011, Zaragoza.
- Caley, P., & Hone, J. (2004).** Disease transmission between and within species, and the implications for disease control. *Journal of Applied Ecology*, 41(1), 94-104.
- Camacho, N. (2015).** Evaluación sistema cánidos silvestres y su fauna parasitaria como centinela potencial de la salud ecosistémica en Querétaro. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Querétaro (Mexico).
- Campbell, W. (1983).** Epidemiology I modes of transmission. In *Trichinella* and trichinosis. Springer, Boston, MA, 425-444
- Cappucci D.T., Augsborg J.K., & Klinck P.C. (1982).** Gongylnemiasis. In: Steele SH, ediciones. Handbook series in zoonoses. Volume 2. Boca Raton, USA, CRC Press, 181-192.
- Carter, A., Luck, G. W., & McDonald, S. P. (2012).** Ecology of the red fox (*Vulpes vulpes*) in an agricultural landscape. 2. Home range and movements. *Australian Mammalogy*, 34(2), 175-187.

- Carvalho, J. C., & Gomes, P. (2004).** Feeding resource partitioning among four sympatric carnivores in the Peneda-Gerês National Park (Portugal). *Journal of Zoology*, 263(3), 275-283.
- Cavallini, P., & Lovari, S. (1994).** Home range, habitat selection and activity of the red fox in a Mediterranean coastal ecotone. *Acta Theriologica*, 39(3), 279-287.
- Cavallini, P. (1996).** Variation in the social system of the red fox. *Ethology Ecology & Evolution*, 8(4), 323-342.
- Chabaud, A.G. (1975).** Keys to genera of the order Spirurida. Part 2. Spiruroidea, Habronematoidea and Acuarioidea. In: Anderson, R.C., Chabaud, A.G. & Willmott S. (ediciones) CIH Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates. Commonwealth Institute of Helminthology, Farnham Royal, 3, 29–58.
- Chai, O., Yas, E., Brenner, O., Rojas, A., Konstantin, L., Klainbart, S., & Shamir, M. H. (2018).** Clinical characteristics of *Spirocerca lupi* migration in the spinal cord. *Veterinary Parasitology*, 253, 16-21.
- Chalkowski, K., Lepczyk, C. A., & Zohdy, S. (2018).** Parasite ecology of invasive species: conceptual framework and new hypotheses. *Trends in parasitology*, 34(8), 655-663.
- Chan, S. W., & Ko, R. C. (1992).** Specificity of affinity-purified *Trichinella spiralis* antigens. *Veterinary Parasitology*, 41(1-2), 109-120.
- Chandrasekharan, K. P., Sastry, G. A., & Menon, M. N. (1958).** Canine spirocercosis with special reference to the incidence and lesions. *British Veterinary Journal*, 114(10), 388-395.
- Cheever, A. W., Hoffmann, K. F., & Wynn, T. A. (2000).** Immunopathology of *Schistosoma mansoni* in mice and men. *Immunology Today*, 21(9), 465–466.
- Chhabra, R. C., & Singh, K. S. (1972).** On the life cycle of *Spirocerca lupi*: preinfective stages in the intermediate host. *Journal of Helminthology*, 46(2), 125-137.
- Chhabra, R. C., & Singh, K. S. (1977).** The life-history of *Spirocerca lupi*: Development and biology of infective juvenile [India]. *Indian Journal of Animal Sciences*, 47(4):178–84.
- Chieffi, P. P., Grispino, D. M. A., Mangini, A. C. S., Dias, R. M. S., Villanova, A., Guidugli, N. R., & Souza, A. D. (1980).** Helminths parasitizing the digestive tract of Muridae captured in Sao Paulo county, state of Sao Paulo, Brazil. Prevalence, parasitism intensity and importance to public health. *Revista do Instituto Adolfo Lutz (Brazil)*, 40, 35-42.
- Chikweto, A., Bhaiyat, M. I., Tiwari, K. P., De Allie, C., & Sharma, R. N. (2012).** Spirocerco-sis in owned and stray dogs in Grenada. *Veterinary Parasitology*, 190(3-4), 613-616.
- Chistiakov, D. A., Killingsworth, M. C., Myasoedova, V. A., Orekhov, A. N., & Bobryshev, Y. V. (2017).** CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. *Laboratory Investigation*, 97(1), 4-13.
- Chomel, B. B., Belotto, A., & Meslin, F. X. (2007).** Wildlife, exotic pets, and emerging zoonoses. *Emerging Infectious Diseases*, 13(1), 6.

- Chowdhury, N., & Pande, B. P. (1969).** The development of the infective larva of the canine oesophageal tumour worm *Spirocerca lupi* in rabbits and its histopathology. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 32(1), 1-10.
- Christie, J., Schwan, E. V., Bodenstein, L. L., Sommerville, J. E., & Van der Merwe, L. L. (2011).** The sensitivity of direct faecal examination, direct faecal flotation, modified centrifugal faecal flotation and centrifugal sedimentation/flotation in the diagnosis of canine spirocercosis. *Journal of the South African Veterinary Association*, 82(2), 71-75.
- Chu, P. G., & Arber, D. A. (2001).** CD79: a review. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 9(2), 97-106.
- Cleaveland, S., Laurenson, M. K., & Taylor, L. H. (2001).** Diseases of humans and their domestic mammals: pathogen characteristics, host range and the risk of emergence. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 356(1411), 991-999.
- Collado, V. M., Porras, R., Cutuli, M. T., & Gómez-Lucía, E. (2008).** El sistema inmune innato I: sus mecanismos. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 2(1), 1-16.
- Conder, G. A., & Loveless, R. M. (1978).** Parasites of the coyote (*Canis latrans*) in central Utah. *Journal of Wildlife Diseases*, 14(2), 247-249.
- Contesse, P., Hegglin, D., Gloor, S., Bontadina, F., & Deplazes, P. (2004).** The diet of urban foxes (*Vulpes vulpes*) and the availability of anthropogenic food in the city of Zurich, Switzerland. *Mammalian Biology*, 69(2), 81-95.
- Cooper, R. H. (1938).** Tumble-bugs. *The Canadian Entomologist*, 70(8), 155-157.
- Cordeiro, H. D. C., Melo, F. T. D. V., Giese, E. G., & Santos, J. N. Dos. (2018).** *Gongylonema* parasites of rodents: A key to species and new data on *Gongylonema neoplasticum*. *Journal of Parasitology* 104, 51–9.
- Cordero del Campillo, M. (1974).** Parasitic zoonoses in Spain. *International Journal Zoonoses*, 1(2), 43-57.
- Cordero del Campillo, M., & Rojo-Vázquez, F. A. (1999).** *Parasitología Veterinaria*. Ed. Mc Craw-Hill Interamericana, 968 pp.
- Cordero del Campillo, M., Castañón-Ordóñez, L., & Reguera-Feo, A. (1994).** Índice-Catálogo de zooparásitos ibéricos. Universidad de León. Secretariado de Publicaciones, León, 650 pp.
- Criado-Fornelio, A., Gutierrez-García, L., Rodríguez-Caabeiro, F., Reus-García, E., Roland-Soriano, M. A., & Díaz-Sánchez, M. A. (2000).** A parasitological survey of wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from the province of Guadalajara, Spain. *Veterinary Parasitology*, 92(4), 245-251.
- Crooks, K. R. (2002).** Relative sensitivities of mammalian carnivores to habitat fragmentation. *Conservation Biology*, 16(2), 488-502.

- Crum, J. M., Nettles, V. F., & Davidson, W. R. (1978).** Studies on endoparasites of the black bear (*Ursus americanus*) in the southeastern United States. *Journal of Wildlife Diseases*, 14(2), 178-186.
- Cui, J., Liu, R. D., Wang, L., Zhang, X., Jiang, P., Liu, M. Y., & Wang, Z. Q. (2013).** Proteomic analysis of surface proteins of *Trichinella spiralis* muscle larvae by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Parasites & Vectors*, 6(1), 1-9.
- Cvetkovic, J., Sofronic-Milosavljevic, L., Ilic, N., Gnjatovic, M., Nagano, I., & Gruden-Movsesijan, A. (2016).** Immunomodulatory potential of particular *Trichinella spiralis* muscle larvae excretory–secretory components. *International Journal for Parasitology*, 46(13-14), 833-842.
- Da Costa Cordeiro, H., de Vasconcelos Melo, F. T., Giese, E. G., & Santos, J. N. D. (2018).** *Gongylonema* parasites of rodents: A key to species and new data on *Gongylonema neoplasticum*. *The Journal of Parasitology*, 104(1), 51-59.
- Davidson, W. R., Nettles, V. F., Hayes, L. E., Howerth, E. W., & Couvillion, C. E. (1992a).** Diseases diagnosed in gray foxes (*Urocyon cinereoargenteus*) from the southeastern United States. *Journal of Wildlife Diseases*, 28(1), 28-33.
- Davidson, W. R., Appel, M. J., Doster, G. L., Baker, O. E., & Brown, J. F. (1992b).** Diseases and parasites of red foxes, gray foxes, and coyotes from commercial sources selling to fox-chasing enclosures. *Journal of Wildlife Diseases*, 28(4), 581-589.
- Davidson, R. K., Ørpetveit, I., Møller, L., & Kapel, C. M. (2009).** Serological detection of anti-*Trichinella* antibodies in wild foxes and experimentally infected farmed foxes in Norway. *Veterinary Parasitology*, 163(1-2), 93-100.
- Davis, A.L.V., & Scholtz, C.H. (2001).** Historical vs ecological factors influencing global patterns of scarabaeine dung beetle diversity. *Diversity and Distributions*, 7, 161– 174.
- De la Cruz-de Julián, I., Díaz-García, J.M., Álvarez-Lana, P., & García-Colmenero, C. (1994).** An outbreak of trichinosis in Huerta del Marquesado (the Cañete-Cuenca basic health area). December 1992 to January 1993. *Revista de Sanidad e Higiene Pública (Madrid)*, 68(4), 513-520.
- De Mendoza, M. L., Curtis, R. H. C., & Gowen, S. (1999).** Identification and characterization of excreted–secreted products and surface coat antigens of animal and plant-parasitic nematodes. *Parasitology*, 118(4), 397-405.
- De Oliveira, S., Rosowski, E. E., & Huttenlocher, A. (2016).** Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse. *Nature Reviews Immunology*, 16(6), 378-391.
- De Santo, C., Arscott, R., Booth, S., Karydis, I., Jones, M., Asher, R., & Cerundolo, V. (2010).** Invariant NKT cells modulate the suppressive activity of IL-10-secreting neutrophils differentiated with serum amyloid A. *Nature Immunology*, 11(11), 1039.

- De Waal, P. J., Gous, A., Clift, S. J., & Greeff, J. M. (2012).** High within-host genetic variation of the nematode *Spirocerca lupi* in a high-density urban dog population. *Veterinary Parasitology*, 187(1-2), 259-266.
- Dea-Ayuela, M. A., Romaris, F., Ubeira, F. M., Rama-Iniguez, S., Martinez-Fernandez, A. R., & Bolas, F. (2001).** Possible presence of common tyvelose-containing glycans in *Trichinella* L1 larvae and embryonated eggs of several nematodes. *Parasite*, 8, S120-S122.
- Dell'Arte, G. L., & Leonardi, G. (2005).** Effects of habitat composition on the use of resources by the red fox in a semi arid environment of North Africa. *Acta Oecologica*, 28(2), 77-85.
- Dell'Arte, G.L., Laaksonen, T., Norrdahl, K., & Korpimaki, E. (2007).** Variation in the diet composition of a generalist predator, the red fox, in relation to season and density of main prey. *Acta Oecologica*, 31, 276–281.
- Desportes, C., Chabaud, A. G., & Campana, Y. (1949).** Sur les *Gongylonemes* de Muridae et leurs formes larvaires. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 24(5-6), 447-459.
- Di Carlo, E., Forni, G., Lollini, P., Colombo, M. P., Modesti, A., & Musiani, P. (2001).** The intriguing role of polymorphonuclear neutrophils in antitumor reactions. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 97(2), 339-345.
- Diakou, A., Karamanavi, E., Eberhard, M., & Kaldrimidou, E. (2012).** First report of *Spirocerca lupi* infection in red fox *Vulpes vulpes* in Greece. *Wildlife Biology*, 18(3), 333-336.
- Díaz-Ruiz, F., Delibes-Mateos, M., García-Moreno, J. L., María López-Martín, J., Ferreira, C., & Ferreras, P. (2013).** Biogeographical patterns in the diet of an opportunistic predator: the red fox *Vulpes vulpes* in the Iberian Peninsula. *Mammal Review*, 43(1), 59-70.
- Dick, T. A., & Pozio, E. (2001).** *Trichinella* spp, and trichinellosis. *Parasitic Diseases of Wild Mammals*, 2, 380-396.
- Dixon, K. G., & McCue, J. F. (1967).** Further observations on the epidemiology of *Spirocerca lupi* in the southeastern United States. *Journal of Parasitology*, 53(5), 1074-1075.
- Dobrowski, S. Z., Abatzoglou, J. T., Greenberg, J. A., & Schladow, S. G. (2009).** How much influence does landscape-scale physiography have on air temperature in a mountain environment?. *Agricultural and Forest Meteorology*, 149(10), 1751-1758.
- Domínguez, G., & de la Torre, J. A. (2002).** Aportaciones al conocimiento de los endoparásitos del lobo ibérico (*Canis lupus signatus*, Cabrera 1907) en el Norte de Burgos. *Galemys*, 14(2), 49-58.
- Du Toit, C. A., Scholtz, C. H., & Hyman, W. B. (2008).** Prevalence of the dog nematode *Spirocerca lupi* in populations of its intermediate dung beetle host in the Tshwane (Pretoria) Metropole, South Africa. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 75(4), 315-321.
- Du Toit, C. A., Holter, P., Lutermann, H., & Scholtz, C. H. (2012).** Role of dung beetle feeding mechanisms in limiting the suitability of species as hosts for the nematode *Spirocerca lupi*. *Medical and Veterinary Entomology*, 26(4), 455-457.

- Dupouy-Camet, J., Soule, C. L., & Ancelle, T. (1994).** Recent news on trichinellosis: another outbreak due to horsemeat consumption in France in 1993. *Parasite*, 1(2), 99-103.
- Dvir, E., Kirberger, R. M., & Malleczek, D. (2001).** Radiographic and computed tomographic changes and clinical presentation of spirocercosis in the dog. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 42(2), 119-129.
- Dvir, E., Kirberger, R. M., Mukorera, V., Van der Merwe, L. L., & Clift, S. J. (2008).** Clinical differentiation between dogs with benign and malignant spirocercosis. *Veterinary Parasitology*, 155(1-2), 80-88.
- Dvir, E., Clift, S. J., & Williams, M. C. (2010).** Proposed histological progression of the *Spirocerca lupi*-induced oesophageal lesion in dogs. *Veterinary Parasitology*, 168(1-2), 71-77.
- Dvir, E., Schoeman, J. P., Clift, S. J., McNeilly, T. N., & Mellanby, R. J. (2011).** Immunohistochemical characterization of lymphocyte and myeloid cell infiltrates in spirocercosis-induced oesophageal nodules. *Parasite Immunology*, 33(10), 545-553.
- Eberhard, M. L., & Busillo, C. (1999).** Human *Gongylostrongylus* infection in a resident of New York City. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 61(1), 51-52.
- EFSA. (2011).** European Food Safety Authority. Submission of scientific peer-reviewed open literature for the approval of pesticide active substances under Regulation (EC) No 1107/2009. *EFSA Journal* (2011). 9(2), 2092.
- EFSA & ECDC. (2018).** **European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control.** The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSA Journal*, 16(12), e05500.
- Eira, C., Miquel, J., Vingada, J., & Torres, J. (2006a).** Natural infection of *Oryctolagus cuniculus* (Lagomorpha, Leporidae) by *Gongylostrongylus neoplasticum* (Nematoda, Gongylostrongylidae) in Portugal. *Acta Parasitologica*, 51(2), 119-122.
- Eira, C., Vingada, J., Torres, J., & Miquel, J. (2006b).** The helminth community of the red fox, *Vulpes vulpes*, in Dunas de Mira (Portugal) and its effect on host condition. *Wildlife Biology in Practice*, 2, 26-36.
- Elbroch, L.M., O'Malley, C., Peziol, M., & Quigley, H.B. (2017).** Vertebrate diversity benefiting from carrion provided by pumas and other subordinate, apex felids. *Biological Conservation*, 215, 123-131.
- Elias, F., Barros, R. M., Santos-Junior, H. L., Eloi, R. S. A., Silva, V., Freitas, F., & Alves, C. E. F. (2016).** Pathological alterations in dogs resulting from parasitism by *Spirocerca lupi*. *Acta Scientiae Veterinariae*, 44(1), 5.
- Enemark, H. L., Bjørn, H., Henriksen, S. A., & Nielsen, B. (2000).** Screening for infection of *Trichinella* in red fox (*Vulpes vulpes*) in Denmark. *Veterinary Parasitology*, 88(3-4), 229-237.

Engler, R., Randin, C. F., Thuiller, W., Dullinger, S., Zimmermann, N. E., Araújo, M. B., & Guisan, A. (2011). 21st century climate change threatens mountain flora unequally across Europe. *Global Change Biology*, 17(7), 2330-2341.

Escobar, F., & Valderrama, C. (1995). Comparación de la biodiversidad de artrópodos de bosque a través del gradiente altitudinal Tumaco-Volcán de Chiles (Nariño); evaluación del efecto de la deforestación Financiera Eléctrica Nacional (FEN). Fundación FES, Fundación McArthur, Informe final.

Esperón, F., Martín, M. P., Lopes, F., Orejas, P., Carrero, L., Muñoz, M. J., & Alonso, R. (2013). *Gongylonema* spp., infection in the scops owl (*Otus scops*). *Parasitology International*, 62(6), 502-504.

Essenwanger, O. M. (2001). Classification of Climates, World Survey of Climatology 1C, General Climatology. Amsterdam: Elsevier, 102 pp.

Esteban, J., Fuentes, M., Munoz-Antoli, C., Saez, S., & Trelis, M. (2004). First report of *Gongylonema pithyusensis* (Nematoda: Gongylonematidae) in continental Europe. *Helminthologia*, 41, 173.

European Commission. (2001). Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health on trichinellosis, epidemiology, methods of detection and *Trichinella*-free pig production. Adopted on 21-22 November 2001 in Brussels.

Euzéby, J. (1961). Les maladies vermineuses des animaux domestiques et leurs incidences sur la pathologie humaine. *Maladies dues aux Nematelminthes*. Vigot frères, Paris, France, 2(1), 473 pp.

Evans, L. B. (1983). Clinical diagnosis of *Spirocerca lupi* infestation in dogs. *Journal of the South African Veterinary Association*, 54(3), 189-191.

FAO/WHO/OIE. (2007). Guidelines for the surveillance, management, prevention and control of trichinellosis. Editors: In J. Dupouy-Camet J & K. D. Murrell. 108 pp.

Fataliev, G. G. (2011). Helminthofauna of wild canids in Azerbaijan and ways of its formation. *Parazitologija*, 45(2), 129-139.

Faust, E. C. (1928). The life cycle of *Spirocerca sanguinolenta*--A natural nematode parasite of the dog. *Science*, 68(1765), 407-409.

Fazendeiro, M. I., Alfonso-Roque, M. M., Meireles, J., Magalhaes, A., de Sousa, C. B., de Carvalho, L. M. M., & da Fonseca, I. M. P. (2004). The role of wild boar and carnivores in the epidemiology of trichinellosis in Portugal. *Galemys: Boletín informativo de la Sociedad Española para la conservación y estudio de los mamíferos*, 16(1), 207-210.

Fedriani J.M. (1996). Dieta anual del zorro (*Vulpes vulpes*) en dos hábitats del Parque Nacional de Doñana. *Doñana Acta Vertebrata*, 23, 143-152.

- Feliu, C., Mas-Coma, S., & Gállego, J. (1983).** Sobre las helmintofaunas de las especies del género *Rattus* Fischer, 1803 (Rodentia: Muridae) en la Península Ibérica. Circular Farmaceutíca, 279, 123-132.
- Fernández, J. M., & De Azúa, N. R. (2005).** Dieta y solapamiento trófico primaveral del zorro rojo "*Vulpes vulpes*" y de "*Martes spp.*", en simpatria en Alava (norte de España). Ecología, (19), 167-184.
- Fernández-De-Mera, I. G., Gortazar, C., Vicente, J., Höfle, U., & Fierro, Y. (2003).** Wild boar helminths: Risks in animal translocations. Veterinary Parasitology, 115, 335–341.
- Fernández, A. R. M., Ruiz, J. N., & Salamanca, F. F. (2005).** *Trichinella britovi* Pozio et al. 1992, la triquina endémica en los climas templados del viejo mundo. REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria, 6(5).
- Fernández, J. L. U. (2013).** El cambio climático: sus causas y efectos medioambientales. Anales de la Real Academia de Medicina y Cirugía de Valladolid, (50), 71-98.
- Ferrantelli, V., Riili, S., Vicari, D., Percipalle, M., Chetta, M., Monteverde, V., & Poglayen, G. (2010).** *Spirocerca lupi* isolated from gastric lesions in foxes (*Vulpes vulpes*) in Sicily (Italy). Polish journal of veterinary sciences, 13(3), 465.
- Ferrer Màrius Vicent, F., Teresa Galan-Puchades, M., Fuentes, M., Cerezuela, A., & Galan, M. (2000).** A helminthological survey of small mammals (Insectivores and Rodents) in the Serra Calderona mountains (Valencian Community, Spain). Research and Reviews in Parasitology 60(1/2), 25–35.
- Fincher, G. T., Stewart, T. B., & Davis, R. (1969).** Beetle intermediate hosts for swine spirurids in southern Georgia. The Journal of Parasitology, 55(2), 355-358.
- Fincher, G. T., Stewart, T. B., & Davis, R. (1970).** Attraction of coprophagous beetles to feces of various animals. The Journal of Parasitology, 66(2), 378-383.
- Finlay, C.M., Walsh, K.P., & Mills, K.H.G., (2014).** Induction of regulatory cells by helminth parasites: exploitation for the treatment of inflammatory diseases. Immunological Reviews, 259(1), 206–230.
- Fitzsimmons, W. M. (1960).** Observations on the incidence, pathology and aetiology of *Spirocerca lupi* infestation in Nyasaland. British Veterinary Journal, 116(8), 272-275.
- Flynn, R.J. (1973).** Parasites of Laboratory Animals: Nematodes. Illinois, US. The Iowa State University Press, 242-243.
- Fonseca-Salamanca, F., Nogal-Ruiz, J. J., García-Sánchez, R. N., Bolas-Fernandez, F., Jiménez, S., Alamo, R., & Martínez-Fernandez, A. R. (2009).** Prevalence of *Trichinella spp.*, in North Spain wild fauna and new variety of *Trichinella britovi* identification. Veterinary Parasitology, 159(3-4), 222-224.

- Forbes, L. B., Appleyard, G. D., & Gajadhar, A. A. (2004).** Comparison of synthetic tyvelose antigen with excretory–secretory antigen for the detection of trichinellosis in swine using enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Parasitology*, 90(4), 835-840.
- Fox, S. M., Burns, J., & Hawkins, J. (1988).** Spirocercosis in dogs. *The Compendium on continuing education for the practicing veterinarian (USA)*, 10, 807–822.
- Frank, K., Krell, F. T., Slade, E. M., Raine, E. H., Chiew, L. Y., Schmitt, T., & Blüthgen, N. (2018).** Global dung webs: high trophic generalism of dung beetles along the latitudinal diversity gradient. *Ecology Letters*, 21(8), 1229-1236.
- Fredriksson-Ahomaa, M. (2019).** Wild boar: a reservoir of foodborne zoonoses. *Foodborne Pathogens and Disease*, 16(3), 153-165.
- Fuglei, E., & Tarroux, A. (2019).** Arctic fox dispersal from Svalbard to Canada: one female's long run across sea ice. *Polar Research*, 38, 3512
- Gal, A., Kleinbart, S., Aizenberg, Z., & Baneth, G. (2005).** Aortic thromboembolism associated with *Spirocerca lupi* infection. *Veterinary Parasitology*, 130(3-4), 331-335.
- Galán-Puchades, M. T., Sanxis-Furió, J., Pascual, J., Bueno-Marí, R., Franco, S., Peracho, V., & Fuentes, M. V. (2018).** First survey on zoonotic helminthosis in urban brown rats (*Rattus norvegicus*) in Spain and associated public health considerations. *Veterinary Parasitology*, 259, 49-52.
- Galante, E., García-Román, M., Barrera, I., & Galindo, P. (1991).** Comparison of spatial distribution patterns of dung-feeding scarabs (Coleoptera: Scarabaeidae, Geotrupidae) in wooded and open pastureland in the Mediterranean “Dehesa” area of the Iberian Peninsula. *Environmental Entomology*, 20(1), 90-97.
- Galante, E., Mena, J., & Lumbreras, C. (1995).** Dung beetles (Coleoptera: Scarabaeidae, Geotrupidae) attracted to fresh cattle dung in wooded and open pasture. *Environmental Entomology*, 24(5), 1063-1068.
- Gallardo, M. T., Mateos, L., Artieda, J., Wesslen, L., Ruiz, C., García, M. A., & Garate, T. (2007).** Outbreak of trichinellosis in Spain and Sweden due to consumption of wild boar meat contaminated with *Trichinella britovi*. *Weekly Releases*, 12(11), 3154.
- Galov, A., Sindičić, M., Andreanszky, T., Čurković, S., Deždek, D., Slavica, A., & Krueger, B. (2014).** High genetic diversity and low population structure in red foxes (*Vulpes vulpes*) from Croatia. *Mammalian Biology*, 79(1), 77-80.
- Gálvez-Bravo, L. (2017).** Conejo – *Oryctolagus cuniculus*. En: Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. Salvador, A., Barja, I. (ediciones.). Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid. <http://www.vertebradosibericos.org/mamiferos/vulvul.html>.
- Gamble, H. R., Anderson, W. R., Graham, C. E., & Murrell, K. D. (1983).** Diagnosis of swine trichinosis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using an excretory-secretory antigen. *Veterinary Parasitology*, 13(4), 349-361.

Gamble, H. R., & Patrascu, I. V. (1996). Whole blood, serum, and tissue fluids in an enzyme immunoassay for swine trichinellosis. *Journal of Food Protection*, 59(11), 1213-1217.

Gamble, H. R., Wisnewski, N., & Wasson, D. L. (1997). Diagnosis of trichinellosis in swine by enzyme immunoassay, using a synthetic glycan antigen. *American Journal of Veterinary Research*, 58(12), 1417.

Gamble, H. R., Bessonov, A. S., Cuperlovic, K., Gajadhar, A. A., Van Knapen, F., Noeckler, K., & Zhu, X. (2000). International Commission on Trichinellosis: recommendations on methods for the control of *Trichinella* in domestic and wild animals intended for human consumption. *Veterinary Parasitology*, 93(3-4), 393-408.

Gamito-Santos, J. (2011). Estudio integral de la trichinellosis silvestre en Extremadura. Tesis Doctoral, Universidad de Extremadura (España).

García-González, R. (1979). Los consumidores domésticos de la dehesa salmantina. En: CSIC (ediciones). Estudio integrado y multidisciplinario de la dehesa salmantina 1. Estudio fisiográfico descriptivo. 3er fascículo Salamanca-Jaca, 263– 315.

García-Jiménez, W. L., Fernández-Llario, P., Gómez, L., Benítez-Medina, J. M., García-Sánchez, A., Martínez, R., & de Mendoza, J. H. (2012). Histological and immunohistochemical characterisation of *Mycobacterium bovis* induced granulomas in naturally infected Fallow deer (*Dama dama*). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 149(1-2), 66-75.

García-Jiménez, W.L., Salguero F.J., Fernández-Llario P., Martínez R., Risco D., Gough J., Ortiz-Peláez A., Hermoso-de-Mendoza, J., & Gómez, L. (2013). Immunopathology of granulomas produced by *Mycobacterium bovis* in naturally infected wild boar. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 156, 54–63.

García-Romero, C., Valcárcel, F., Corchero, J. M., Olmeda, A. S., & Pérez-Jiménez, J. M. (2000). A contribution to the study of parasites of red deer (*Cervus elaphus*) in the provinces of Toledo and Ciudad Real (Castille-La Mancha, Spain). *Ecología (Madrid)*, (14), 235-249.

Garg, U. K., Ghoshal, S. B., Richharia, V. S., & Misraulia, K. S. (1989). An unusual occurrence of *Spirocerca lupi* worms in the heart of a dog. *Indian Veterinary Journal*, 66(11), 1073-1073.

Garkavi, B. L. (1972). The species of *Trichinella* isolated from wild carnivores. *Veterinariia*, 10, 90-91.

Gehring, T. M., & Swihart, R. K. (2003). Body size, niche breadth, and ecologically scaled responses to habitat fragmentation: mammalian predators in an agricultural landscape. *Biological Conservation*, 109(2), 283-295.

Genchi, C., Rinaldi, L., Mortarino, M., Genchi, M., & Cringoli, G. (2009). Climate and *Dirofilaria* infection in Europe. *Veterinary Parasitology*, 163(4), 286-292.

Georgi, M. E., Han, H., & Hartrick, D. W. (1980). *Spirocerca lupi* (Rudolphi, 1809) nodule in the rectum of a dog from Connecticut. *The Cornell Veterinarian*, 70(1), 42-49.

- Githeko, A. K., Lindsay, S. W., Confalonieri, U. E., & Patz, J. A. (2000).** Climate change and vector-borne diseases: a regional analysis. *Bulletin of the World Health Organization*, 78, 1136-1147.
- Gloor, S. (2002).** The rise of urban foxes (*Vulpes vulpes*) in Switzerland and ecological and parasitological aspects of a fox population in the recently colonised city of Zurich. Doctoral Dissertation, Universität Zürich (Germany).
- Gómez-Gutiérrez, J. M., & Calabuig, L. (1992).** Producción de praderas y pastizales En: El Libro de las Dehesas Salmantinas. Gómez-Gutiérrez, JM (ediciones). Consejería de Medio Ambiente de Castilla y León. Salamanca, 489-513.
- Gómez-Laguna, J., Salguero, F.J., Barranco, I., Pallarés, F.J., Rodríguez- Gómez, IM., Bernabé, A., & Carrasco, L. (2010).** Cytokine Expression by Macrophages in the Lung of pigs infected with the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Journal of Comparative Pathology*, 142, 51-60.
- Gómez-Lucía, E., Blanco, M. D. M., & Doménech, A. (2007).** Manual de inmunología veterinaria. Ed. Pearson Prentice Hall, 728 pp.
- Gómez-Morales, M. A., Ludovisi, A., Amati, M., Cherchi, S., Pezzotti, P., & Pozio, E. (2008).** Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of human trichinellosis. *Clinical and Vaccine Immunology*, 15(11), 1723-1729.
- Gomez-Puerta, L. A., Carrasco, J., Lopez-Urbina, M. T., & Gonzalez, A. E. (2018).** Morphological and molecular identification of *Spirocerca lupi* (Nematoda: Spiruridae) found in the Andean fox (*Lycalopex culpaeus*). *Journal of Parasitic Diseases*, 42(3), 449-454.
- González, J., García-Marín, J.F., Muñoz, M., Martínez-Nistal, J.J., Pérez, V., & Ferreras, M. (2009).** Hallazgos anatomopatológicos en zorros (*Vulpes vulpes*) de Castilla y León. XXI Reunión de la SEAPV. Lugo 24-26 junio.
- González-Castro, J. (1944).** Contribución al estudio del parasitismo por helmintos en sus estadios larvales de varios múridos capturados en Granada. *Revista Iberoamericana de Parasitología*, 4(1), 38-60.
- Gordón, M. Á. R., Atlántico, J. B., & Ornos, C. (2002).** Polinizadores y biodiversidad. Asociación Española de Entomología, Jardín Botánico Atlántico y Centro Iberoamericano de la Biodiversidad Eds. Madrid, España, 160 pp.
- Gortázar, C. (1997).** Ecología y patología del zorro (*Vulpes vulpes*, L.) en el valle medio del Ebro. Tesis Doctoral, Universidad de Zaragoza (España).
- Gortázar, C., Villafuerte, R., Lucientes, J., & Fernández-de-Luco, D. (1998).** Habitat related differences in helminth parasites of red foxes in the Ebro valley. *Veterinary Parasitology*, 80(1), 75-81.
- Gortázar, C. (1999).** Ecología y patología del zorro (*Vulpes vulpes* L.) en el Valle del Ebro. Editorial Consejo de Protección de la Naturaleza de Aragón, 180-181.

- Gortázar, C. (2002).** *Vulpes vulpes* (Linnaeus, 1758). Atlas de los mamíferos terrestres de España. Dirección General de Conservación de la Naturaleza-SECEM-SECEMU, Madrid. Ediciones: Palomo y J. Gibert, 242-245.
- Gortázar, C., Ferroglio, E., Höfle, U., Frölich, K., & Vicente, J. (2007).** Diseases shared between wildlife and livestock: a European perspective. *European Journal of Wildlife Research*, 53(4), 241-256.
- Gottstein, B., Pozio, E., & Nöckler, K. (2009).** Epidemiology, diagnosis, treatment, and control of trichinellosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(1), 127-145.
- Gottlieb, Y., Markovics, A., Klement, E., Naor, S., Samish, M., Aroch, I., & Lavy, E. (2011).** Characterization of *Onthophagus sellatus* as the major intermediate host of the dog esophageal worm *Spirocerca lupi* in Israel. *Veterinary Parasitology*, 180(3-4), 378-382.
- Gottlieb, Y., Lavy, E., Kaufman, M., Markovics, A., Ghanim, M., & Aroch, I. (2012).** A novel bacterial symbiont in the nematode *Spirocerca lupi*. *BMC Microbiology*, 12(1), 133.
- Gottlieb, Y., Klement, E., Aroch, I., Lavy, E., Kaufman, M., Samish, M., & Markovics, A. (2014).** Temporal association of ambient temperature and relative humidity with *Spirocerca lupi* infection of *Onthophagus sellatus*: a 14-year longitudinal study. *Veterinary Parasitology*, 204(3-4), 238-242.
- Gortázar, C., Ruiz-Fons, J. F., & Höfle, U. (2016).** Infections shared with wildlife: an updated perspective. *European Journal of Wildlife Research*, 62(5), 511-525.
- Gould, S.E. (1970).** Clinical manifestations. In: *Trichinosis in man and animals* (ediciones, Thomas, C.C.). Springfield, Illinois, USA, 269-306.
- Graae, B. J., Vandvik, V., Armbruster, W. S., Eiserhardt, W. L., Svenning, J. C., Hylander, K., & Lenoir, J. (2018).** Stay or go—how topographic complexity influences alpine plant population and community responses to climate change. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 30, 41-50.
- Granado, A. M., Sánchez, E. M., Martínez, M. V., Serrano, L. S., Banegas, P. O., Frías, A. T., & Pezzi, G. H. (2012).** Vigilancia epidemiológica de brotes de triquinosis en España. Temporadas 1994/1995 a 2005/2006. *Boletín Epidemiológico semanal*, 15(4), 37-40.
- Greeff, J. M., Reid, K., Gagjee, J. R., Clift, S. J., & de Waal, P. J. (2018).** Population genetic structure of the parasitic nematode *Spirocerca lupi* in South Africa. *Veterinary Parasitology*, 258, 64-69.
- Guardone, L. (2013).** Study on the helminth fauna of red foxes and dogs in Liguria (north-west Italy): epidemiological and diagnostic aspects. Tesi di dottorato di ricerca. Università di Pisa (Italy).
- Guitian J., Bermejo T. (1989).** Nota dietas de carnívoros e índice de abundancia en una reserva de caza del norte de España. *Doñana Acta Vertebrata*, 16, 319–323.

- Gundlach, J. L., & Sadzikowski, A.B. (2004).** Parasitology and parasitosis of animals. Pan´stwo Wydawnictwo Rolnicze i Les´ne, Warszawa, Poland, 456 pp.
- Habela, M., Moreno, A., Peña, J., & Montes, G. (2006).** Parásitos asociados a tuberculosis en ciervos (*Cervus elaphus*) de Extremadura. SEOC, Zamora.
- Halajian, A., Eslami, A., Salehi, N., Ashrafi-Helan, J., & Sato, H. (2010).** Incidence and genetic characterization of *Gongylonema pulchrum* in cattle slaughtered in Mazandaran Province, northern Iran. Iranian Journal of Parasitology, 5(2), 10.
- Halffter, G., Favila, M.E., & Halffter, V. (1992).** A comparative study of the structure of the scarab guild in Mexican tropical rain forest and derived ecosystems. Folia Entomológica Mexicana, 84, 131-156.
- Hanski, I., & Cambefort, Y. (1991).** Dung Beetle Ecology. Princeton University Press, 1195.
- Harrenstien, L. A., Munson, L., Ramsay, E. C., Lucash, C. F., Kania, S. A., & Potgieter, L. N. (1997).** Antibody responses of red wolves to canine distemper virus and canine parvovirus vaccination. Journal of Wildlife Diseases, 33(3), 600-605.
- Harris, S. (1981).** The food of suburban foxes (*Vulpes vulpes*), with special reference to London. Mammal Review, 11(4), 151-168.
- Harris, S., & Trehwella, W. J. (1988).** An analysis of some of the factors affecting dispersal in an urban fox (*Vulpes vulpes*) population. Journal of Applied Ecology, 25(2), 409-422.
- Harris, S., & Baker, P. (2001).** Urban foxes. 2ª edicion. Libros Whittet, Suffolk, 152 pp.
- Harrus, S., Harmelin, A., Markovics, A., & Bark, H. (1996).** *Spirocerca lupi* infection in the dog: aberrant migration. Journal of the American Animal Hospital Association, 32(2), 125-130.
- Haruki, K., Furuya, H., Saito, S., Kamiya, S., & Kagei, N. (2005).** *Gongylonema* infection in man: a first case of gongylosomosis in Japan. Helminthologia, 42(2), 63.
- Hasegawa, H., Kobayashi, J., & Otsuru, M. (1994).** Helminth parasites collected from *Rattus rattus* on Lanyu, Taiwan. Journal of the Helminthological Society of Washington, 61(1), 95-102.
- Hassan, S. E., El-Moghazy, F. M., & Toaleb, N. I. (2010).** Comparison of two antigens for diagnosis of trichinellosis in pigs. World Applied Sciences Journal, 8(4), 457-461.
- Helldin, J.O., & Danielsson, A.V. (2007).** Changes in red fox *Vulpes vulpes* diet due to colonisation by *L. Lynx lynx*. Wildlife Biology, 13, 475-480.
- Henke, S. E., Pence, D. B., & Bryant, F. C. (2002).** Effect of short-term coyote removal on populations of coyote helminthes. Journal of Wildlife Disease, 38, 54-67.
- Henry, C., Pouille, M. L., & Roeder, J. J. (2005).** Effect of sex and female reproductive status on seasonal home range size and stability in rural red foxes (*Vulpes vulpes*). Ecoscience, 12(2), 202-209.

- Hernández, J. A. G., Bautista, V. M. H., & Huerta López, J. G. (2006).** Respuesta inmune a virus y parásitos. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas*, 15(3), 94-96.
- Hernandez-Rodríguez, S., & Gutiérrez-Palomino, P. N. (1992).** *Gongylonema (Progongylonema) pacoí* n. subgen. n. sp. (Spiruroidea: Gongylonematidae) parasite. *D'oiseaux Corvidae*, 67, 188–93.
- Herráez-García, J., León-García, L.A., Lanusse-Senderos, C., Cortés-Blanco, M., & García-Cabañas, A. (2003).** Outbreak of trichinellosis in the region of la Vera (Cáceres, Spain) caused by *Trichinella britovi*. *Anales de Medicina Interna*, 20(2), 63-66.
- Herrero-Martín, F., & Martín-Calama, A. (1961).** The problem of trichinosis in the province of Caceres (Results of a great campaign of rat eradication in rural areas). *Revista Sanidad e Higiene Pública (Madrid)*, 35, 10-31.
- Hewitson, J. P., Grainger, J. R., & Maizels, R. M. (2009).** Helminth immunoregulation: the role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 167(1), 1-11.
- Heydon, M. J., & Bulloh, P. (1997).** Mousedeer densities in a tropical rainforest: the impact of selective logging. *Journal of Applied Ecology*, 34(2), 484-496.
- Hill, D. E., Forbes, L., Gajadhar, A. A., & Gamble, H. R. (2007).** Viability and infectivity of *Trichinella spiralis* muscle larvae in frozen horse tissue. *Veterinary Parasitology*, 146(1-2), 102-106.
- Höfle, U., Vicente, J., Fernández de Mera, I. G., Villanúa, D., Acevedo., Ruiz-Fons., & Gortázar, C. (2004).** Health risks in game production: the wild boar. *Galemys*, 16, 197-206.
- Holter, P. (2000).** Particle feeding in Aphodius dung beetles (Scarabaeidae): old hypotheses and new experimental evidence. *Functional Ecology*, 631-637.
- Holter, P., Scholtz, C. H., & Wardhaugh, K. G. (2002).** Dung feeding in adult scarabaeines (tunnellers and endocoprids): even large dung beetles eat small particles. *Ecological Entomology*, 27(2), 169-176.
- Holter, P., & Scholtz, C. H. (2005).** Are ball-rolling (Scarabaeini, Gymnopleurini, Sisyphini) and tunnelling scarabaeine dung beetles equally choosy about the size of ingested dung particles.? *Ecological Entomology*, 30(6), 700-705.
- Hooper, D. U., Adair, E. C., Cardinale, B. J., Byrnes, J. E., Hungate, B. A., Matulich, K. L., & O'Connor, M. I. (2012).** A global synthesis reveals biodiversity loss as a major driver of ecosystem change. *Nature*, 486(7401), 105-108.
- Huang, Q., Wang, J., Yang, T., & Liu, Y. (2016).** Multiple *Gongylonema pulchrum* worms in a human esophagus. *Endoscopy*, 48(S 01), E24-E25.
- Huntley, B., Collingham, Y.C., Willis, S.G., & Green, R.E. (2008).** Potential impacts of climatic change on european breeding birds. *PLoS One*, 3, e1439.

International Commission on Trichinellosis (ICT.2012). “Quality Assurance in Digestion Testing Programs for *Trichinella*”. Recommendations and Guidelines. 2012.

Integrated Taxonomic Information System (ITIS). (2018). Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 24th December 2018. Digital resource at www.catalogueoflife.org/col. Species 2000: Naturalis, Leiden, the Netherlands. ISSN 2405-8858. <https://www.catalogueoflife.org>.

Intergovernmental Panel on Climate Change. (IPCC. 2013). The Physical Science Basis. Working Group I Contribution to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University press. <https://www.ipcc.ch/report/ar5/wg1/>.

IPCC (2007). Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the intergovernmental Panel on Climate Change (Solomon, S., D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K.B. Averyt, M. Tignor and H.L. Miller (Eds.)). Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 996 pp.

Isbell, F., Craven, D., Connolly, J., Loreau, M., Schmid, B., Beierkuhnlein, C., & Eisenhauer, N. (2015). Biodiversity increases the resistance of ecosystem productivity to climate extremes. *Nature*, 526(7574), 574-577.

ISO 7218:2007. (2007). Norma UNE-EN ISO 7218 EC. Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Requisitos generales y guía para el examen microbiológico. Ed. AENOR internacional, S.A.U, 74pp.

<https://www.une.org/encuentra-tu-norma/busca-tu-norma/norma?c=N0040646>

Isomursu, M., Salin, N., & Oksanen, A. (2010). Rare canine parasites survive in the wild fox population. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 52(1), 1-1.

Jado, I., Oteo, J. A., Aldámiz, M., Gil, H., Escudero, R., Ibarra, V., & Anda, P. (2007). *Rickettsia monacensis* and human disease, Spain. *Emerging Infectious Diseases*, 13(9), 1405.

Jelinek, T., & Löscher, T. (1994). Human infection with *Gongylonema pulchrum*. *Tropical Medicine and Parasitology*, 45(4), 329-330.

Jiménez-Jorge, S., Tobalina, M., Urarte, E., Arriola, L., Garate, T., Rodríguez, E., & Carril, F. (2008). Brote de triquinosis en la Montaña Alavesa. *Salud Pública*, 23(1), 1-14.

Jović, S., Đorđević, M., Kulišić, Z., Pavlović, S., & Radenković, B. (2001). Infectivity of *Trichinella spiralis* larvae in pork buried in the ground. *Parasite*, 8(2), S213-S215.

Jubb, K.V., Kennedy, P. C., & Palmer, N. (2015). Pathology of domestic animals. Academic Press, San Diego, 2nd edición, 2, California, 782 pp.

JyothiSree, C., & Hafeez, M. (2013). A study on prevalence of spirocercosis in dogs in certain parts of Andhra Pradesh, India. *International Journal of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine*, 1(3), 59-66.

Kamara, J. A. (1964). The incidence of canine spirocercosis in the Freetown area of Sierra Leone. *Bulletin of Epizootic Diseases of Africa*, 12(4), 465-469.

- Kapel, C. M. (2000).** Host diversity and biological characteristics of the *Trichinella* genotypes and their effect on transmission. *Veterinary Parasitology*, 93(3-4), 263-278.
- Kapel, C. M., Webster, P., & Gamble, H. R. (2005).** Muscle distribution of sylvatic and domestic *Trichinella* larvae in production animals and wildlife. *Veterinary Parasitology*, 132(1-2), 101-105.
- Karamon, J., Dąbrowska, J., Kochanowski, M., Samorek-Pieróg, M., Sroka, J., Różycki, M., & Cencek, T. (2018).** Prevalence of intestinal helminths of red foxes (*Vulpes vulpes*) in central Europe (Poland): a significant zoonotic threat. *Parasites & Vectors*, 11(1), 1-10.
- Kaschula, V. R., & Malherbe, W. D. (1954).** The incidence and diagnosis of spirocercosis in dogs in the Transvaal. *Journal of the South African Veterinary Association*, 25(1), 53-60.
- Kauhala, K., & Helle, P. (2000).** The interactions of predator and hare populations in Finland—a study based on wildlife monitoring counts. *Annales Zoologici Fennici*, 37, 151–160.
- Kelly, P. J., Fisher, M., Lucas, H., & Krecek, R. C. (2008).** Treatment of esophageal spirocercosis with milbemycin oxime. *Veterinary Parasitology*, 156(3-4), 358-360.
- Kidawa, D., & Kowalczyk, R. (2011).** The effects of sex, age, season and habitat on diet of the red fox *Vulpes vulpes* in northeastern Poland. *Acta Theriologica*, 56(3), 209-218.
- King, A. W., & Bohning, A.M. (1984).** The incidence of heartworm *Dirofilaria immitis* (Filaroidea) in the wild canids of Northeast Arkansas. *The Southwestern Naturalist*, 29(1), 89-92.
- Kinsella, J. M., Robles, M. R., & Preisser, W. C. (2016).** A review of *Gongyлонema* spp. (Nematoda: Gongyлонematidae) in North American rodents with description of a new species from the cotton rat, *Sigmodon hispidus* (Mammalia: Cricetidae). *Zootaxa*, 4107(2), 277-284.
- Kirberger, R. M., Dvir, E., & Van der Merwe, L. L. (2009).** The effect of positioning on the radiographic appearance of caudodorsal mediastinal masses in the dog. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 50(6), 630-634.
- Kirberger, R. M., Stander, N., Cassel, N., Pazzi, P., Mukorera, V., Christie, J., & Dvir, E. (2013).** Computed tomographic and radiographic characteristics of aortic lesions in 42 dogs with spirocercosis. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 54(3), 212-222.
- Kirkova, Z., Raychev, E., & Georgieva, D. (2011).** Studies on feeding habits and parasitological status of red fox, golden jackal, wild cat and stone marten in Sredna Gora, Bulgaria. *Journal of Life Sciences*, 5(4), 264-270.
- Kirkpatrick, C. E., Leiby, D. A., Abraham, D., & Duffy III, C. H. (1986).** *Gongyлонema pulchrum* Molin (Nematoda: Gongyлонematidae) in black bears (*Ursus americanus* Pallas) from Pennsylvania. *Journal of Wildlife Diseases*, 22(1), 119-121.
- Klein, B.C. (1989).** Effects of forest fragmentation on dung and carrion beetle communities in central Amazonia. *Ecology*, 70, 1715–1725.
- Kobayashi, Y. (2008).** The role of chemokines in neutrophil biology. *Frontiers in bioscience: a Journal and virtual library*, 13(1), 2400-7.

- Korhonen, P. K., Pozio, E., La Rosa, G., Chang, B. C., Koehler, A. V., Hoberg, E. P., & Sternberg, P. W. (2016).** Phylogenomic and biogeographic reconstruction of the *Trichinella* complex. *Nature Communications*, 7(1), 1-8.
- Kořínková, K., Kovařík, K., Pavlíčková, Z., Svoboda, M., & Koudela, B. (2008).** Serological detection of *Trichinella spiralis* in swine by ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) using an excretory–secretory (E/S) antigen. *Parasitology Research*, 102(6), 1317-1320.
- Kozar, Z. (1970).** Trichinosis in Europe. *Trichinosis in Man and Animals*, 423-436.
- Kraneveld, F. C., & Djaenoedin, R. (1952).** Index-catalogue of Medical and Veterinary Zoology. *Hemera. Zoa*, 59(1/2), 101-102.
- Krivokapich, S. J., Pozio, E., Gatti, G. M., Prous, C. L. G., Ribicich, M., Marucci, G., & Confalonieri, V. (2012).** *Trichinella patagoniensis* n. sp. (Nematoda), a new encapsulated species infecting carnivorous mammals in South America. *International Journal for Parasitology*, 42(10), 903-910.
- Kudo, N., Oyamada, T., Okutsu, M., & Kinoshita, M. (1996).** Intermediates Hosts of *Gongylonema pulchrum* Molin, 1857, in Aomori Prefecture, Japan. *Japanese Journal of Parasitology*, 45, 222-229.
- Laaksonen, S., Pusenius, J., Kumpula, J., Venäläinen, A., Kortet, R., Oksanen, A., & Hoberg, E. (2010).** Climate change promotes the emergence of serious disease outbreaks of filarioid nematodes. *EcoHealth*, 7(1), 7-13.
- Lafferty, K. D., Dobson, A. P., & Kuris, A. M. (2006).** Parasites dominate food web links. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(30), 11211-11216.
- Lafferty, K. D., Allesina, S., Arim, M., Briggs, C. J., De Leo, G., Dobson, A. P., & Thielges, D. W. (2008).** Parasites in food webs: the ultimate missing links. *Ecology Letters*, 11(6), 533-546.
- Larivière, S., & Pasitschniak-Arts, M. (1996).** *Vulpes vulpes*. *Mammalian Species*, (537), 1-11.
- Lavy, E., Harrus, S., Mazaki-Tovi, M., Bark, H., Markovics, A., Hagag, A., & Aroch, I. (2003).** *Spirocerca lupi* in dogs: prophylactic effect of doramectin. *Research in Veterinary Science*, 75(3), 217-222.
- Le Sueur, C., Bour, S., & Schaper, R. (2010).** Efficacy of a combination of imidacloprid 10%/moxidectin 2.5% spot-on (Advocate® for dogs) in the prevention of canine spirocercosis (*Spirocerca lupi*). *Parasitology Research*, 107(6), 1463-1469.
- Leoni, A., Masala, S., & Garippa, G. (1985).** Principali lesioni da *Spirocerca lupi* in *Vulpes vulpes*. *Atti Societaltaliana Scienze Veterinarie*, 39, 570-573.
- Lichtenfels, J. R. (1971).** Morphological variation in the gullet nematode, *Gongylonema pulchrum* Molin, 1857, from eight species of definitive hosts with a consideration of *Gongylonema* from *Macaca spp.* *The Journal of Parasitology*, 348-355.

- Liciardi, M., Marucci, G., Addis, G., Ludovisi, A., Morales, M. G., Deiana, B., & Pozio, E. (2009).** *Trichinella britovi* and *Trichinella spiralis* mixed infection in a horse from Poland. *Veterinary Parasitology*, 161(3-4), 345-348.
- Lind, P., Eriksen, L., Henriksen, S. A., Homan, W. L., van Knapen, F., Nansen, P., & Skov, P. S. (1991).** Diagnostic tests for *Trichinella spiralis* infection in pigs. A comparative study of ELISA for specific antibody and histamine release from blood cells in experimental infections. *Veterinary Parasitology*, 39(3-4), 241-252.
- Lindquist, A. W. (1933).** Amounts of dung buried and soil excavated by certain Coprini (Scarabaeidae). *Journal of the Kansas Entomological Society*, 6(4), 109-125.
- Lindquist, A. W. (1935).** Notes on the habits of certain coprophagous beetles and methods of rearing them. US Department of Agriculture, 351.
- Liu, M. Y., Wang, X. L., Fu, B. Q., Li, C. Y., Wu, X. P., Le Rhun, D., & Boireau, P. (2007).** Identification of stage-specifically expressed genes of *Trichinella spiralis* by suppression subtractive hybridization. *Parasitology*, 134(10), 1443-1455.
- Liu, G. H., Jia, Y. Q., Wang, Y. N., Zhao, G. H., & Zhu, X. Q. (2015).** The complete mitochondrial genome of the gullet worm *Gongylonema pulchrum*: gene content, arrangement, composition and phylogenetic implications. *Parasites & Vectors*, 8(1), 100.
- Lledó, L., Giménez-Pardo, C., Saz, J. V., & Serrano, J. L. (2015).** Wild red foxes (*Vulpes vulpes*) as sentinels of parasitic diseases in the province of Soria, northern Spain. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 15(12), 743-749.
- Lobetti, R. G. (2000).** Survey of the incidence, diagnosis, clinical manifestations and treatment of *Spirocerca lupi* in South Africa: research communication. *Journal of the South African Veterinary Association*, 71(1), 43-46.
- Lobetti, R. (2012).** Successful resolution of oesophageal spirocercosis in 20 dogs following daily treatment with oral doramectin. *The Veterinary Journal*, 193(1), 277-278.
- Lobetti, R. (2014).** Follow-up survey of the prevalence, diagnosis, clinical manifestations and treatment of *Spirocerca lupi* in South Africa. *Journal of the South African Veterinary Association*, 85(1), 1-7.
- Löbl, I., & Löbl, D. (2016).** Catalogue of Palaearctic Coleoptera Series. (Vol 3): Scarabaeoidea, Scirtoidea, Dascilloidea, Buprestoidea and Byrrhoidea. Ed. Apollo Books, 690 pp.
- Lobo, J. M., & Veiga, C. M. (1990).** Interés ecológico y económico de la fauna coprófaga en pastos de uso ganadero. *Ecología*, (4), 313-332.
- Lobo, J. M., Hortal, J., & Cabrero-Sañudo, F. J. (2006).** Regional and local influence of grazing activity on the diversity of a semi-arid dung beetle community. *Diversity and Distributions*, 12, 111– 123.

- Lopes, F., Esperón, F., Bravo-Barriga, D., Frontera, E., Cabrero-Sañudo, F. J., Gil-Tapeta-do, D., & Alonso, R. (2022).** Identification of the intermediate host of *Gongylonema* sp., the etiological agent of the necrotic oropharyngeal disease of the Scops owl (*Otus scops*). *Parasitology International*, 86, 102443.
- López-Hernández, B., Gea-Velázquez de Castro, M.T., Galicia-García, M.D., & Sabonet, J.C. (2001).** Outbreak of *Trichinella britovi* infection in Granada in the spring of 2000. *Revista española de Salud Pública*, 75(5), 467-473.
- López-López, P., Maiorano, L., Falcucci, A., Barba, E., & Boitani, L. (2011).** Hotspots of species richness, threat and endemism for terrestrial vertebrates in SW Europe. *Acta Oecologica*, 37, 399–412.
- López-Martín, J. M. (2017).** Zorro – *Vulpes vulpes*. En: Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. Salvador, A., Barja, I. (ediciones.). Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid. <http://www.vertebradosibericos.org/mamiferos/habitat/vulvulha.html>.
- López-Neyra, C. R. (1947).** Helminths of the Iberian Vertebrates. T. I, II e I. C.S.I.C., Granada, 1212 pp.
- López-Olvera, J. R., Vives, L., Serrano, E., Fernández-Sirera, L., Picart, L., Rossi, L., & Lavín, S. (2011).** *Trichinella* spp. in red foxes (*Vulpes vulpes*) from Catalonia, NE Spain. *Parasitology Research*, 108(6), 1589-1591.
- López-Sáez, J. A., López, P., López, L., Cerrillo, E., González, A., & Prada, A. (2007).** Origen Prehistórico de la Dehesa en Extremadura: una Perspectiva Paleoambiental. *Revista Estudiantes Extremeños*, 63, 493–510.
- Lozano, J., Moleón, M., & Virgós, E. (2006)** Biogeographical patterns in the diet of the wildcat, *Felis silvestris* Schreber in Eurasia: factors affecting the trophic diversity. *Journal of Biogeography*, 33, 1076–1085.
- Luna-Estrada, M., Mosqueda-Cabrera, M. Á., & Servín, J. (2017).** Nuevos registros de helminths in coyote *Canis latrans imavidus* (Carnivora: Canidae) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 88(1), 250-252.
- Lumaret, J. P. (1978).** Biogéographie et écologie des scarabéides coprophages du sud de la France i., méthodologie et modèles de répartition. *Vie et Milieu*, 28/29(1), 1-34.
- Lumaret, J. P., Kadiri, N., & Bertrand, M. (1992).** Changes in resources: consequences for the dynamics of dung beetle communities. *Journal of Applied Ecology*, 349-356.
- Luzón, M., Bohórquez, A., & Meana, A. (2009).** Datos preliminares sobre la presencia de *Trichinella* spp., en caballos en España. *Acta Parasitológica Portuguesa*, 6, 108-109.
- Macdonald, D. W. (1979).** Some observations and field experiments on the urine marking behaviour of the red fox, *Vulpes vulpes*, L. *Zeitschrift für Tierpsychologie*, 51(1), 1-22.
- Macdonald, D. W. (1980).** The red fox, *Vulpes vulpes*, as a predator upon earthworms, *Lumbricus terrestris*. *Zeitschrift für Tierpsychologie*, 52(2), 171-200.

- Macdonald, D. W. (1981).** Resource dispersion and the social organization of the red fox (*Vulpes vulpes*). In Worldwide Furbearer Conference Proceedings. University of Maryland Press, 2, 918-949.
- Macdonald, D. W. (1983).** The ecology of carnivore social behaviour. *Nature*, 301(5899), 379-384.
- Macdonald, D.W. (1987).** Running with the fox. Ed. Unwin-Hyman, London, 224 pp.
- Macdonald D.W., & Reynolds J.C. (2004).** Red fox. In (Eds. Sillero-Zubiri C, Hoffmann M, Macdonald D.W. (2004)). *Canids: Foxes, Wolves, Jackals and Dogs. Status Survey and Conservation Action Plan.* IUCN/SSC Canid Specialist Group. Gland, Switzerland and Cambridge, UK. 430 pp, 129–136.
- Macdonald, D.W., & Reynolds, J.C. (2008).** *Vulpes vulpes*. En: UICN 2013. *Lista Roja de Especies Amenazadas de la UICN. Versión 2013.1.* <http://www.iucnredlist.org/details/23062/0>
- Maclean, I. M., Mosedale, J. R., & Bennie, J. J. (2019).** Microclima: An r package for modelling meso-and microclimate. *Methods in Ecology and Evolution*, 10(2), 280-290.
- Magi, M., Macchioni, F., Dell’Omodarme, M., Prati, M. C., Calderini, P., Gabrielli, S., & Cancrini, G. (2009).** Endoparasites of red fox (*Vulpes vulpes*) in central Italy. *Journal of Wildlife Diseases*, 45(3), 881-885.
- Maizels, R. M., & Yazdanbakhsh, M. (2003).** Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nature Reviews Immunology*, 3(9), 733-744.
- Makouloutou, P., Setsuda, A., Yokoyama, M., Tsuji, T., Saita, E., Torii, H., & Hasegawa, H. (2013).** Genetic variation of *Gongylonema pulchrum* from wild animals and cattle in Japan based on ribosomal RNA and mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I genes. *Journal of Helminthology*, 87(3), 326.
- Mantovani A., & Santamaria A. (1990).** Los animales como hospedadores. Congreso de Zoonosis (Valencia, 1990). *Ciencias Veterinarias*. Nº 2. Consejo General de Colegios Veterinarios de España. Madrid.
- Markovics, A., & Medinski, B. (1996).** Improved diagnosis of low intensity *Spirocerca lupi* infection by the sugar flotation method. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 8(3), 400-401.
- Marks, C. A., & Bloomfield, T. E. (1999).** Distribution and density estimates for urban foxes (*Vulpes vulpes*) in Melbourne: implications for rabies control. *Wildlife Research*, 26(6), 763-775.
- Marquet, S., Abel, L., Hillaire, D., Dessein, H., Kalil, J., Feingold, J., & Dessein, A. J. (1996).** Genetic localization of a locus controlling the intensity of infection by *Schistosoma mansoni* on chromosome 5q31–q33. *Nature Genetics*, 14(2), 181-184.
- Martín-Piera, F., & Lobo, J.M. (1995).** Diversity and ecological role of dung beetles in Iberian grassland biomes. Ed. McCracken, D.I., E.M. Bignal and S.E. Wenlock. *Farming on the edge: the nature of traditional farmlands in Europe.* Joint Nature Conservation Committee, Peterborough, pp. 147-153.

- Martín-Piera, F., & Lobo, J. M. (1996).** A comparative discussion of trophic preferences in dung beetle communities. *Miscellània Zoològica*, 13-31.
- Martín, D., Rodríguez, H., Corte, M., & Soto, M. (2013).** Funciones efectoras de los linfocitos T. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 11(28), 1742-1751.
- Martín, M. (2008).** Caracterització de la dieta de la guineu (*Vulpes vulpes*) al Parc del Garraf. *V Trobada d'Estudiosos del Garraf*, 81-88.
- Martínez, F., Hernández, S., Calero, R., & Moreno, T. (1978).** Contribución al conocimiento de los parásitos del zorro (*Vulpes vulpes*). *Revista Ibérica de Parasitología*, 38, 207-211.
- Martínez-Pérez, R. (2011).** Estudio retrospectivo de la seroprevalencia de la trichinellosis y leishmaniosis en perros de rehala de Extremadura. Tesis de licenciatura, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura (España).
- Martín-Pérez, M., Lobo, J. M., Pérez-Martín, J. E., Bravo-Barriga, D., Galapero, J., & Frontera, E. (2020).** Occurrence, prevalence, and explanatory environmental variables of *Spirocerca vulpis* infestation in the foxes of western Spain. *Parasitology Research*, 119 (3), 973–983.
- Martín-Pérez, M., Gómez-Gordo, L., Galapero, J., Pérez-Martín, J. E., Bravo-Barriga, D., Calero-Bernal, R., & Frontera, E. (2022).** Characterization of lesions induced by *Spirocerca vulpis* (Spiruridae: spirocercidae) in red foxes (*Vulpes vulpes*). *The Journal of Wildlife Diseases*, 58(1), 137-147.
- Martín-Piera, F., & López-Colón, J. I. (2000).** "Coleoptera, Scarabaeoidea I. En: Fauna Ibérica", In Ramos, M. A. et al. Ediciones: Museo Nacional de Ciencias Naturales, 14. CSIC, Madrid, 526 pp.
- Mas-Coma, S. (1977).** *Gongylonema pithyusensis n. sp.* (Nematoda: Spiruridae), parasite œsophagien du Lérot *Eliomys quercinus ophiusae* Thomas, 1925 (Rodentia: Gliridae) à Formentera (Baléares). *Annales de parasitologie humaine et comparee*, 52(1), 13-18.
- Mason, D. Y., Cordell, J. L., Brown, M. H., Borst, J., Jones, M., Pulford, K., & Stein, H. (1995).** CD79a: a novel marker for B-cell neoplasms in routinely processed tissue samples. *Blood*, 86(4), 1453-1459.
- Mattarollo, S. R., & Smyth, M. J. (2010).** A novel axis of innate immunity in cancer. *Nature Immunology*, 11(11), 981-982.
- Mazaki-Tovi, M., Baneth, G., Aroch, I., Harrus, S., Kass, P. H., Ben-Ari, T., & Lavy, E. (2002).** Canine spirocercosis: clinical, diagnostic, pathologic, and epidemiologic characteristics. *Veterinary Parasitology*, 107(3), 235-250.
- McGeoch, M.A., Van Rensburg, B.J., & Botes, A. (2002).** The verification and application of bioindicators: a case study of dung beetles in a savanna ecosystem. *Journal of Applied Ecology*, 39, 661–672.

- Meia, J. S., & Weber, J. M. (1995).** Home ranges and movements of red foxes in central Europe: stability despite environmental changes. *Canadian Journal of Zoology*, 73(10), 1960-1966.
- Meléndez, R. D., & Suárez-Pellín, C. (2001).** *Spirocerca lupi* and dogs: the role of nematodes in carcinogenesis. *Trends in Parasitology*, 17(11), 516.
- Mense, M. G., Gardiner, C. H., Moeller, R. B., Partridge, H. L., & Wilson, S. (1992).** Chronic emesis caused by a nematode-induced gastric nodule in a cat. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 201(4), 597-598.
- Meshgi, B., Eslami, A., Bahonar, A. R., Kharrazian-Moghadam, M., & Gerami-Sadeghian, A. (2009).** Prevalence of parasitic infections in the red fox (*Vulpes vulpes*) and golden jackal (*Canis aureus*) in Iran. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 10(4), 387-391.
- Messenger, A. M., Barnes, A. N., & Gray, G. C. (2014).** Reverse zoonotic disease transmission (zooanthroponosis): a systematic review of seldom documented human biological threats to animals. *PloS One* 9(2), e89055.
- Milazzo, C., de Bellocq, J. G., Cagnin, M., Casanova, J. C., di Bella, C., Feliu, C., & Santalla, F. (2003).** Helminths and ectoparasites of *Rattus rattus* and *Mus musculus* from Sicily, Italy. *Comparative Parasitology*, 70(2), 199-204.
- Miller, A., Chi-Rodríguez, E., & Nichols, R. L. (1961).** The fate of helminth eggs and protozoan cysts in human feces ingested by dung beetles (Coleoptera: Scarabaeidae). *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 10(5), 748-754.
- Miller, R. S., Farnsworth, M. L., & Malmberg, J. L. (2013).** Diseases at the livestock-wildlife interface: status, challenges, and opportunities in the United States. *Preventive Veterinary Medicine*, 110(2), 119-132.
- Minnaar, W. N., & Krecek, R. C. (2001).** Helminths in dogs belonging to people in a resource-limited urban community in Gauteng, South Africa. *Veterinary Parasitology*, 107(4), 343.
- Minnaar, W. N., Krecek, R. C., & Fourie, L. J. (2002).** Helminths in dogs from a peri-urban resource-limited community in Free State Province, South Africa. *Veterinary Parasitology*, 107(4), 343-349.
- Molavi, G. H., Massoud, J., & Gutierrez, Y. (2006).** Human *Gongylonema* infection in Iran. *Journal of Helminthology*, 80(4), 425.
- Mönnig, H.O. (1938).** *Veterinary Helminthology and Entomology, the diseases of domesticated animals caused by helminth and arthropod parasites (2^a edition).* Bailliere, Tindall and Cox. 409 pp.
- Montero, G., & Serrada, R. (2013).** La situación de los bosques y el sector forestal en España - ISFE 2013. Editado por Sociedad Española de Ciencias Forestales, Lourizán (Pontevedra), 253 pp.

- Montoliu, I., Sánchez, S., Villa, M., Abreu-Acosta, N., Martín-Alonso, A., Fernández-Álvarez, Á., & Foronda, P. (2013).** On the biology of Spiruroidea parasites of murine rodents on El Hierro (Canary Islands, Spain) with molecular characterization of *Streptopharagus greenbergi* Wertheim, 1993. *Comptes Rendus Biologies*, 336(9), 440-448.
- Morandi, F., Angelico, G., Verin, R., & Gavaudan, S. (2014).** Fatal spirocercosis in a free-ranging red fox. *The Veterinary Record*, 174(9), 228.
- Morón M. A. (2003).** Atlas de los escarabajos de México. Coleoptera: Lamellicornia. Vol. II: Familias Scarabaeidae, Trogidae, Pasalidae y Lucanidae. Argania edición. Barcelona. 227 pp.
- Morón, M. A. (2004).** Escarabajos, 200 millones de años de evolución. Instituto de Ecología, AC y Sociedad Entomológica Aragonesa. Zaragoza, España, 204 pp.
- Morrison, E. E., & Gier, H. T. (1979).** Parasitic infection of *Filaroides osleri*, *Capillaria aerophila* and *Spirocera lupi* in coyotes from the southwestern United States. *Journal of Wildlife Diseases*, 15(4), 557-559.
- Morrison, M. L., Marcot, B.G., & Mannan, R.W. (1992).** Habitat from an ecological and evolutionary perspective. *Wildlife habitat relationships*. University of Wisconsin Press. Madison, Wisconsin, USA, 16-40.
- Mowlavi, G., Mikaeili, E., Mobedi, I., Kia, E., Masoomi, L., & Vatandoost, H. (2009).** A survey of dung beetles infected with larval nematodes with particular note on *Copris lunaris* beetles as a vector for *Gongylonema sp.* in Iran. *The Korean Journal of Parasitology*, 47(1), 13.
- Mukaratirwa, S., Pillay, E., & Munsammy, K. (2010).** Experimental infection of selected arthropods with spirurid nematodes *Spirocera lupi* Railliet & Henry, 1911 and *Gongylonema ingluvicola* Molin, 1857. *Journal of Helminthology*, 84(4), 369-374.
- Mukorera, V., Dvir, E., Van der Merwe, L. L., & Goddard, A. (2011).** Serum C-reactive protein concentration in benign and malignant canine spirocercosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25(4), 963-966.
- Mukorera, V., Kirberger, R. M., Mabeta, P., & Dvir, E. (2013).** Vascular endothelial growth factor concentrations in dogs with spirocercosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(6), 1642-1645.
- Murdock, C. C., Paaijmans, K. P., Cox-Foster, D., Read, A. F., & Thomas, M. B. (2012).** Rethinking vector immunology: the role of environmental temperature in shaping resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 10(12), 869-876.
- Murphy, K., Travers, P., & Walport, M. (2009).** *Inmunología de Janeway*. México. Editorial Mc Graw Hill, 913 pp.
- Murray, M., Campbell, M. H., & Jarrett, W. H. F. (1964).** *Spirocera lupi* in a cheetah. *African Journal of Ecology*, 2(1), 164-164.

- Murrell, K. D., & Pozio, E. (2000).** Trichinellosis: the zoonosis that won't go quietly. *International Journal for Parasitology*, 30(12-13), 1339-1349.
- Murrell, K. D., & Pozio, E. (2011).** Worldwide occurrence and impact of human trichinellosis, 1986–2009. *Emerging Infectious Diseases*, 17(12), 2194.
- Mylonakis, M. E., Koutinas, A. F., Liapi, M. V., Saridomichelakis, M. N., & Rallis, T. S. (2001).** A comparison of the prevalence of *Spirocerca lupi* in three groups of dogs with different life and hunting styles. *Journal of Helminthology*, 75(4), 359-361.
- Mylonakis, M. E., Rallis, T., Koutinas, A. F., Leontides, L. S., Patsikas, M., Florou, M., & Fytianou, A. (2006).** Clinical signs and clinicopathologic abnormalities in dogs with clinical spirocercosis: 39 cases (1996–2004). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 228(7), 1063-1067.
- Nafria García, D., Garrido del Pozo, N., Álvarez Arias, M. V., Cubero Jiménez, D., Fernández Sánchez, M., Villarino Barrera, I., & Abia Llera, I. (2013).** Atlas Agroclimático de Castilla y León. ITACYL, AEMET. http://www.aemet.es/es/conocermas/recursos_en_linea/publicaciones_y_estudios/publicaciones/detalles/Atlas_Agroclimatico_CyL2013_00.
- Nagano, I., Wu, Z., Matsuo, A., Pozio, E., & Takahashi, Y. (1999).** Identification of *Trichinella* isolates by polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism of the mitochondrial cytochrome c-oxidase subunit I gene. *International Journal for Parasitology*, 29(7), 1113-1120.
- National Research Council (NRC). (1982).** Nutrient Requirements of Mink and Foxes. In: Nutrient requirements of animals, 2ª edición. Washington, DC. The National Academies Press, 7.
- Navarrete, I., Reina, D., Serrano, F. J., Calero, R. (1991).** Programas de acciones contra la Triquinellosis. Cáceres: Universidad de Extremadura.
- Nazarova, N. S. (1963).** Experimental data on the re-infection of various animals with the larvae of *Spirocerca lupi*. *Gelmint. Cheloveka. Zhivot. i Rasten. i Borba Nimi*, 85, 238-240.
- Ndiritu, C. G., & Al-Sadi, H. I. (1976).** Pathogenesis & lesions of canine spirocercosis. *Modern Veterinary Practice*, 57(11), 924-930.
- Neveu-Lemaire (1936).** Traite d'Helminthologie, Medicale et Veterinaire. Paris. Editorial Vigot Freres, 1514 pp.
- Newsome, A. E. (1995).** Socio-ecological models for red fox populations subject to fertility control in Australia. In *Annales Zoologici Fennici*, 32, 99-110.
- Nichols, E., Spector, S., Louzada, J., Larsen, T., Amezcua, S., & Favila, M. E. (2008).** Ecological functions and ecosystem services provided by Scarabaeinae dung beetles. *Biological Conservation*, 141, 1461– 1474.
- Nichols, E., & Gomez, A. (2014).** Dung beetles and fecal helminth transmission: patterns, mechanisms and questions. *Parasitology*, 141(5), 614-623.

- Nichols, E., Alarcón, V., Forgie, S., Gomez-319 Puerta, L. A., & Jones, M. S. (2017).** Coprophagous insects and the ecology of infectious diseases of wildlife. *ILAR Journal*, 58, 336–342.
- Niskanen, A., Luoto, M., Väre, H., & Heikkinen, R. K. (2017).** Models of Arctic-alpine refugia highlight importance of climate and local topography. *Polar Biology*, 40(3), 489-502.
- Nivy, R., Caldin, M., Lavy, E., Shaabon, K., Segev, G., & Aroch, I. (2014).** Serum acute phase protein concentrations in dogs with spirocercosis and their association with esophageal neoplasia—a prospective cohort study. *Veterinary Parasitology*, 203(1-2), 153-159.
- Nöckler, K., & Voigt, W. P. (1998).** Experimental *Trichinella spiralis* infection in the silver fox (*Vulpes vulpes fulva*). In *Trichinellosis. Proceedings of the 9^a International Conference on Trichinellosis*. Germar Press. Nonoalco Tlateloco, México, 319-323.
- Nöckler, K., Pozio, E., Voigt, W. P., & Heidrich, J. (2000).** Detection of *Trichinella* infection in food animals. *Veterinary Parasitology*, 93(3-4), 335-350.
- Nöckler, K., Serrano, F. J., Boireau, P., Kapel, C. M., & Pozio, E. (2005).** Experimental studies in pigs on *Trichinella* detection in different diagnostic matrices. *Veterinary Parasitology*, 132(1-2), 85-90.
- Nöckler, K., Reckinger, S., Broglia, A., Mayer-Scholl, A., & Bahn, P. (2009).** Evaluation of a Western Blot and ELISA for the detection of anti-*Trichinella*-IgG in pig sera. *Veterinary Parasitology*, 163(4), 341-347.
- Nyamukondiwa, C., Chidawanyika, F., Machekano, H., Mutamiswa, R., Sands, B., Mgidiswa, N., & Wall, R. (2018).** Climate variability differentially impacts thermal fitness traits in three coprophagic beetle species. *PloS One*, 13(6).
- O’Hara, A. M., & Shanahan, F. (2006).** The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Reports*, 7(7), 688-693.
- OIE. (2012). World Organisation for Animal Health.** Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, 7^a Edición, 2012. (Vol.1), Chapter 2.1.16. Trichinellosis, 305-313.
- OIE. (2018). World Organisation for Animal Health.** Manual de pruebas de diagnóstico y vacunas para animales terrestres 8^a Edición, 2018. Capítulo 3.1.22. <https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-manual-online-access/>
- OIE. (2022). World Organisation for Animal Health.** Código Sanitario para los Animales Terrestres, (Vol. 2, Capítulos 8.17 (2022). Infección por *Trichinella* spp, París, Francia. <https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-code-online-access/>.
- Oliveira-Sequeira, T. C., Amarante, A. F., Ferrari, T. B., & Nunes, L. C. (2002).** Prevalence of intestinal parasites in dogs from Sao Paulo State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 103(1- 2), 19-27.

- O'Mahoney, D., Lambin, X., MacKinnon, J.L., & Coles, C.F. (1999).** Fox predation on cyclic field vole populations in Britain. *Ecography*, 22, 575–581.
- Orozco, J., & Pérez, M. (2008).** Escarabajos coprófagos (Coleoptera, Scarabaeoidea) del Parque Nacional Los Estoraques (Norte de Santander, Colombia). *Revista Brasileira de Entomologia*, 52(1), 36-40.
- Ortega-Pierres, M., Yopez-Mulia, L., Homan, W., Gamble, H., Lim, P., Takahashi, Y., & Appleton, J. (1996).** Workshop on a detailed characterization of *Trichinella spiralis* antigens: a platform for future studies on antigens and antibodies to this parasite. *Parasite Immunology*, 18(6), 273-284.
- Ortigoza, G., Hurtado, C., & Vásquez, G. (2009).** Relación de eosinofilia con parasitosis y alergias en niños. *Bioquímica*, 34 (SA), 78.
- Oryan, A., Sadjjadi, S. M., Mehrabani, D., & Kargar, M. (2008).** Spirocercosis and its complications in stray dogs in Shiraz, southern Iran. *Veterinary Medicine Czech*, 53(11), 617-624.
- Owen, I., Pozio, E., Tamburrini, A., Danaya, R., Bruschi, F., & Morales, M. (2001).** Focus of human trichinellosis in Papua New Guinea. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 65(5), 553-557.
- Owen, R. (1835).** Description of a microscopic Entozoon infesting the muscles of the human body. *The Transactions of the Zoological Society of London*, 1(4), 315-324.
- Padial, J., Avila, E., & Sanchez, J. (2002).** Feeding habits and overlap among red fox (*Vulpes vulpes*) and stone marten (*Martes foina*) in two Mediterranean mountain habitats. *Mammalian Biology*, 67(3), 137-146.
- Palomares, F., & Ruíz-Martínez, I. (1994).** Die Dichte des Rotfuchses und die Beute an Niederwild während der Periode der Jungenaufzucht im Südosten Spaniens. *Zeitschrift für Jagdwissenschaft*, 40(3), 145-155.
- Palomo, L., Gisbert, J., & Blanco, J. (2007).** Atlas y libro rojo de los mamíferos terrestres de España. Dirección General para la Biodiversidad-SECEM-SECEMU, Madrid, 588 pp.
- Pandey, V., Dakkak, A., & Elmamoune, M. (1987).** Parasites of stray dogs in the Rabat region, Morocco. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 81(1), 53-55.
- Panzacchi, M., Linnell, J. D., Melis, C., Odden, M., Odden, J., Gorini, L., & Andersen, R. (2010).** Effect of land-use on small mammal abundance and diversity in a forest–farmland mosaic landscape in south-eastern Norway. *Forest Ecology and Management*, 259(8), 1536-1545.
- Parshad, V. (1999).** Rodent control in India. *Integrated Pest Management Reviews*, 4(2), 97-126.
- Patsiou, T., Conti, E., Zimmermann, N., Theodoridis, S., & Randin, C. F. (2014).** Topo-climatic microrefugia explain the persistence of a rare endemic plant in the Alps during the last 21 millennia. *Global Change Biology*, 20(7), 2286-2300.

- Paterson, S., & Piertney, S. (2011).** Frontiers in host–parasite ecology and evolution. *Molecular Ecology*, 20(5), 869-871.
- Pavlovic, I., Kulisic, Z., & Milutinovic, M. (1997).** The role of foxes (*Vulpes vulpes*, L.) in the epizootiology and epidemiology of nematode parasitic zoonoses. *Acta Veterinaria-Beograd*, 47(2-3), 177-182.
- Peiró, I. G., Aymerich, F. R., & Selma, M. Á. E. (2009).** Abundancias y densidades relativas de zorro *Vulpes vulpes* (Linnaeus, 1758) en un humedal del sudeste ibérico: implicaciones para la conservación de sus poblaciones. In *Anales de Biología. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Murcia*, 31, 43-48.
- Pence, D. B., & Stone, J. E. (1978).** Visceral lesions in wild carnivores naturally infected with *Spirocerca lupi*. *Veterinary Pathology*, 15(3), 322-331.
- Pence, D. B., & Meinzer, W. P. (1979).** Helminth parasitism in the coyote, *Canis latrans*, from the Rolling Plains of Texas. *International Journal for Parasitology*, 9(4), 339-344.
- Pereira, H. M., Domingos, T., & Vicente, L. (2004).** Portugal Millennium Ecosystem Assessment: State of the Assessment Report. Centro de Biologia Ambiental, Portugal. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, 68.
- Perera, P. K., Rajapakse, R. P. V. J., & Rajakaruna, R. S. (2013).** Gastrointestinal parasites of dogs in Hantana area in the Kandy District. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*, 41(2).
- Pérez-Martín, J. E., Serrano, F. J., Reina, D., Mora, J. A., & Navarrete, I. (2000).** Sylvatic trichinellosis in southwestern Spain. *Journal of Wildlife Diseases*, 36(3), 531-534.
- Pérez-Martín, J. E., Robledo-Berrocal, J., González-Ruibal, L., Gamito-Santos, J. A., Calero-Bernal, R., Pariente-Palomino, J., & Serrano-Aguilera, F. J. (2007).** Evolución de la prevalencia de la trichinellosis en Extremadura: epidemiología de los ciclos doméstico y silvestre. X Congreso Ibérico de Parasitología. Madrid (España).
- Pérez-Pérez, A., Guimbao Bescós, J., Cebollada Gracia, A. D., Malo Aznar, C., Martínez Cuenca, S., Aznar Brieba, A., & Compés Dea, C. (2020).** Brotes epidémicos de triquinosis ocurridos en Aragón durante el periodo 1998-2017. *Revista Española de Salud Pública*, 93, e201902005.
- Peris, M., & Del Amo, R. (2003).** Estudi de la població de guineu (*Vulpes vulpes*) del Parc del Garraf. IV Trobada d'Estudiosos del Garraf. Monografies, 37, 155-158.
- Permin, A., Esmann, J. B., Hoj, C. H., Hove, T., & Mukaratirwa, S. (2002).** Ecto-, endo-and haemoparasites in free-range chickens in the Goromonzi District in Zimbabwe. *Preventive Veterinary Medicine*, 54(3), 213-224.
- Pesson, B., Hersant, C., Biehler, J. F., Abou-Bacar, A., Brunet, J., Pfaff, A., & Candolfi, E. (2013).** First case of human gongylonemosis in France. *Parasite*, 20, 5.

- Pham, X. D., Tran, C. L., & Hasegawa, H. (2001).** Helminths collected from *Rattus* spp., in Bac Ninh province, Vietnam. *Comparative Parasitology*, 68(2), 261-264.
- Pinto, J. M. L. (2012).** Dehesas y paisajes adehesados en Castilla y León. *Polígonos. Revista de Geografía*, 21, 179-203.
- Platto, S., Zhou, J., Wang, Y., Wang, H., & Carafoli, E. (2021).** Biodiversity loss and COVID-19 pandemic: The role of bats in the origin and the spreading of the disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 538, 2-13.
- Poinar, G. (1975).** Entomogenous nematodes: a manual and host list of insect-nematode associations. Ed. E.J. Brill, Leiden, Bélgica 317 pp.
- Popiołek, M., Szczęśna-Staśkiewicz, J., Bartoszewicz, M., Okarma, H., Smalec, B., & Zalewski, A. (2011).** Helminth parasites of an introduced invasive carnivore species, the raccoon (*Procyon lotor* L.), from the Warta Mouth National Park (Poland). *The Journal of Parasitology*, 97(2), 357-360.
- Porter, D. (1939).** Some new intermediate hosts of the swine stomach worms, *Ascarops strongylina* and *Physocephalus sexalatus*. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 6(2), 79-80.
- Portolés, E., Granel, P., & Esteban, J. (1996).** Helminthofaunistic analysis of *Crocidura russula* (Hermann, 1780) (Insectivora: Soricidae) from the Albufera natural Park (Valencia, Spain). *Research and Reviews in Parasitology*, 56, 203-211.
- Poulin, R., & Morand, S. (2000).** The diversity of parasites. *The quarterly review of biology*, 75(3), 277-293.
- Pozio, E., Cappelli, O., Marchesi, L., Valeri, P., & Rossi, P. (1988).** Third outbreak of trichinellosis caused by consumption of horse meat in Italy. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 63(1), 48-53.
- Pozio, E., La Rosa, G., Rossi, P., & Murrell, K. (1992a).** Biological characterization of *Trichinella* isolates from various host species and geographical regions. *Journal of Parasitology*, 78, 647-653.
- Pozio, E., La Rosa, G., Murrell, K., & Lichtenfels, J. (1992b).** Taxonomic revision of the genus *Trichinella*. *Journal of Parasitology*, 78, 654-659.
- Pozio, E., La Rosa, G., Serrano, F. J., Barrat, J., & Rossi, L. (1996).** Environmental and human influence on the ecology of *Trichinella spiralis* and *Trichinella britovi* in Western Europe. *Parasitology*, 113(6), 527-533.
- Pozio, E., Serrano, F. J., La Rosa, G., Reina, D., Perez-Martin, E., & Navarrete, I. (1997a).** Evidence of potential gene flow in *Trichinella spiralis* and in *Trichinella britovi* in nature. *The Journal of Parasitology*, 83(1), 163-166.

- Pozio, E., Tamburrini, A., Sacchi, L., Morales, M. G., Corona, S., Goffredo, E., & La Rosa, G. (1997b).** Detection of *Trichinella spiralis* in a horse during routine examination in Italy. *International Journal for Parasitology*, 27(12), 1613-1621.
- Pozio, E. (1998).** Trichinellosis in the European Union: epidemiology, ecology and economic impact. *Parasitology Today*, 14(1), 35-38.
- Pozio, E., Miller, I., Järvis, T., Kapel, C., & La Rosa, G. (1998).** Distribution of sylvatic species of *Trichinella* in Estonia according to climate zones. *The Journal of Parasitology*, 84(1), 193-195.
- Pozio, E., Owen, I., La Rosa, G., Sacchi, L., Rossi, P., & Corona, S. (1999).** *Trichinella papuae* n. sp. (Nematoda), a new non-encapsulated species from domestic and sylvatic swine of Papua New Guinea. *International Journal for Parasitology*, 29(11), 1825-1839.
- Pozio, E. (2001).** New patterns of *Trichinella* infection. *Veterinary Parasitology*, 98(1-3), 133-148.
- Pozio, E., Zarlenga, D. S., & La Rosa, G. (2001).** The detection of encapsulated and non-encapsulated species of *Trichinella* suggests the existence of two evolutive lines in the genus. *Parasite*, 8, S27-S29.
- Pozio, E., Sofronic-Milosavljevic, L., Morales, M., Boireau, P., & Nöckler, K. (2002a).** Evaluation of ELISA and Western Blot Analysis using three antigens to detect anti-*Trichinella* IgG in horses. *Veterinary Parasitology*, 108(2), 163-178.
- Pozio, E., Foggin, C., Marucci, G., La Rosa, G., Sacchi, L., Corona, S.,... & Mukaratirwa, S. (2002b).** *Trichinella zimbabwensis* n. sp. (Nematoda), a new non-encapsulated species from crocodiles (*Crocodylus niloticus*) in Zimbabwe also infecting mammals. *International Journal for Parasitology*, 32(14), 1787-1799.
- Pozio, E., & La Rosa, G. (2003).** PCR-derived methods for the identification of *Trichinella* parasites from animal and human samples. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 216, 299-309.
- Pozio E., Serrano F., Dubinsky P., Cabaj W., Blaga R., Dida I., Christensson D., Nöeckler K., Marucci G., & La Rosa G. (2004).** Relationships between *Trichinella* and host species in Europe. 11^a International Conference on trichinellosis. International Commission on Trichinellosis. Abstract book, 27 pp.
- Pozio, E. (2005).** The broad spectrum of *Trichinella* hosts: from cold-to warm-blooded animals. *Veterinary Parasitology*, 132(1-2), 3-11.
- Pozio, E., & Zarlenga, D. (2005).** Recent advances on the taxonomy, systematics, and epidemiology of *Trichinella*. *International Journal for Parasitology*, 35(11-12), 1191-1204.
- Pozio, E., & Murrell, K. (2006).** Systematics and epidemiology of *Trichinella*. *Advances in Parasitology*, 63, 367-439.

- Pozio, E., Kapel, C. M. O., Gajadhar, A. A., Boireau, P., Dupouy-Camet, J., & Gamble, H. R. (2006).** *Trichinella* in pork: current knowledge on the suitability of freezing as a public health measure. *Weekly Releases (1997–2007)*, 11(46), 3079.
- Pozio, E. (2007a).** Taxonomy, biology and epidemiology of *Trichinella* parasites. FAO/WHO/OIE Guidelines for the Surveillance, Management, Prevention and Control of Trichinellosis. OIE Publisher, Paris, France, 1-35.
- Pozio, E. (2007b).** World distribution of *Trichinella* spp., infections in animals and humans. *Veterinary Parasitology*, 149(1-2), 3-21.
- Pozio, E., Hoberg, E., La Rosa, G., & Zarlenga, D. S. (2009a).** Molecular taxonomy, phylogeny and biogeography of nematodes belonging to the *Trichinella* genus. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(4), 606-616.
- Pozio, E., Rinaldi, L., Marucci, G., Musella, V., Galati, F., Cringoli, G., & La Rosa, G. (2009b).** Hosts and habitats of *Trichinella spiralis* and *Trichinella britovi* in Europe. *International Journal for Parasitology*, 39(1), 71-79.
- Pozio, E., Alban, L., Boes, J., Boireau, P., Boué, F., Claes, M., & Zimmer, I. A. (2010).** Development of harmonised schemes for the monitoring and reporting of *Trichinella* in animals and foodstuffs in the European Union. *EFSA Supporting Publications*, 7(1), 35E.
- Pozio, E., & Zarlenga, D. S. (2013).** New pieces of the *Trichinella* puzzle. *International Journal for Parasitology*, 43(12-13), 983-997.
- Pozio, E. (2015).** *Trichinella* spp., imported with live animals and meat. *Veterinary Parasitology*, 213(1-2), 46-55.
- Pozio, E. (2020).** How globalization and climate change could affect foodborne parasites. *Experimental Parasitology*, 208, 107807.
- Prokopic, J. (1960).** The helminthofauna of wild and reared foxes in Czechoslovakia. *Zoology Listy*, 9, 239-244.
- Prugh, L., Stoner, C., Epps, C., Bean, W., Ripple, W., Laliberte, A., & Brashares, J. (2009).** The rise of the mesopredator. *Bioscience*, 59(9), 779-791.
- Pruniaux, O., & Guignard, A. (1991).** Dog helminthiasis in La Réunion Island: Results from the departmental veterinary lab 1987-1990. (France), *Revue de Medecine Veterinaire*, 142(10), 757-760
- Psáder, R., Balogh, M., Pápa, K., Sterczer, Á., Lukács, Z., & Harnos, A. (2017).** Occurrence of *Spirocerca lupi* infection in Hungarian dogs referred for gastroscopy. *Parasitology Research*, 116(1), 99-108.
- Quentin, J., & Seureau, C. (1978).** Identification et biologie du Gongylonème parasite du Macroscélide en Tunisie. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 53(6), 631-640.

- Quentin, J., & Gunn, T. (1981).** Morphologie et biologie larvaires de *Gongylonema soricis* Fain, 1955. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 56(2), 167-172.
- Quintana Díez, G. (2013).** Utilización del zorro como bioindicador de la contaminación medioambiental: metales pesados. Tesis Doctoral, Universidad de Santiago de Compostela (España).
- Railliet, A. (1895).** *Traité de zoologie médicale et agricole*. Paris: Asselin et Houzeau, 868 pp.
- Ramachandran, P. V., Shakir, S. A., & Ramakrishnan, R. (1984).** Spirocercosis in canines, a necropsy survey. *Cheiron Tamil Nadu Journal of Veterinary Science and Animal Husbandry*, 13, 132-135.
- Ramírez Valenzuela M. (1981).** Epidemiología de la Trichinellosis. *Ciencia Veterinaria*, 3, 1-58.
- Ramos, S. (2016).** Comparación de metodologías para estimar la densidad de zorro común (*Vulpes vulpes*). Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid (España).
- Ranen, E., Lavy, E., Aizenberg, I., Perl, S., & Harrus, S. (2004).** Spirocercosis-associated esophageal sarcomas in dogs: a retrospective study of 17 cases (1997–2003). *Veterinary Parasitology*, 119(2-3), 209-221.
- Rau, J., Delibes, M., & Beltrán, J. (1987).** Estudio comparado de la dieta de los zorros mediterráneos (Carnivora, Canidae). In *Anales del Museo de Historia Natural de Valparaíso*, 18, 163-168.
- Rau, J. (1988).** Ecología del zorro, *Vulpes vulpes*, en la Reserva Biológica de Doñana, Huelva, SO de España. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla (España).
- Ravindran, R., Aparna, M., Johns, J., Mithin, U. C., Varghese, S., Jyothimol, G., & AjithKumar, K. G. (2014).** Application of seminested PCR for detection of larval stages of *Spirocerca lupi* in garden lizards (*Calotes versicolor*). *Veterinarski Arhiv*, 84(3), 305-310.
- Reig, S., Jędrzejewski, W. (1988).** Winter and early spring food of some carnivores in the Białowieża National Park, eastern Poland. *Acta Theriologica*, 33, 57–65.
- Reina, D., Habela, M., Navarrete, I., Martínez-Gómez, F. (1987).** Triquinelosis experimental canina. Evolución de los niveles de anticuerpos según el método ELISA. V Congreso Nacional Parasitología, Salamanca, 279-280.
- Reina, D., Breña, M., Habela, M., & Navarrete, I. (1991).** Parasitofauna de rumiantes menores en Cáceres. *Mundo Ganadero*, 7, 34-44.
- Reina, D., Carrascoso, J., Perez Martin, E., Navarrete, I., Gijon Botella, H., & Roman, L. (1994).** Spirocercosis ganglionar. Localización ectópica en cánidos de la provincia de Cáceres. *Acta Veterinaria*, 8(8), 13-19.
- Reisen, W. (2009).** Epidemiology of vector borne diseases. In: Mullens, G.R., Durden, L.A. (Editorial), *Medical and Veterinary Entomology*. San Diego, CA, USA: Elsevier/ Academic Press, 19–34.

Rhyan, J., & Spraker, T. (2007). Emergence of diseases from wildlife reservoirs. *Veterinary Pathology*, 47(1), 34-39.

Ribicich, M., Gamble, R. H., Santillan, S., Miguez, M., Molina, V., Guanera, E., & Franco, A. (2000). Evaluation of ELISA test for the diagnosis of porcine Trichinellosis. *Pig Journal*, 46, 24-34.

Richards, D., Harris, S., & Lewis, J. (1995). Epidemiological studies on intestinal helminth parasites of rural and urban red foxes (*Vulpes vulpes*) in the United Kingdom. *Veterinary Parasitology*, 59(1), 39-51.

Richomme, C., Lacour, S. A., Ducrot, C., Gilot-Fromont, E., Casabianca, F., Maestrini, O., & Boireau, P. (2010). Epidemiological survey of trichinellosis in wild boar (*Sus scrofa*) and fox (*Vulpes vulpes*) in a French insular region, Corsica. *Veterinary Parasitology*, 172(1-2), 150-154.

Rinas, M., Nesnek, R., Kinsella, J., & DeMatteo, K. (2009). Fatal aortic aneurysm and rupture in a neotropical bush dog (*Speothos venaticus*) caused by *Spirocerca lupi*. *Veterinary Parasitology*, 164(2-4), 347-349.

Ritcher, P. (1945). Coprinae of Eastern North America: With descriptions of larvae and keys to genera and species (Coleoptera: Scarabaeidae). *Bulletin-Kentucky*, Editado por Kentucky Agricultural Experiment Station, University of Kentucky (USA), 23 pp.

Ritcher, P. (1966). White grubs and their allies. Oregon State Univ. Press, Corvallis, Oregon, 219 pp.

Rivas Martínez, S. (1987). Memoria del mapa de series de vegetación de España. Publicaciones del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid. https://www.miteco.gob.es/es/biodiversidad/servicios/banco-datos-naturaleza/informacion-disponible/memoria_mapa_series_veg.aspx.

Rodríguez, E., Olmedo, J., Ubeira, F., Blanco, C., & Gárate, T. (2008). Mixed infection, *Trichinella spiralis* and *Trichinella britovi*, in a wild boar hunted in the Province of Cáceres (Spain). *Experimental parasitology*, 119(3), 430-432.

Rodríguez, M. E. R. (2015). Estudio de la triquinelosis en la fauna silvestre del noroeste español. Tesis Doctoral, Universidade de Santiago de Compostela (España).

Rodríguez-Osorio, M., Abad, J., De Haro, T., Villa-Real, R., & Gómez-García, V. (1999). Human trichinellosis in Southern Spain: serologic and epidemiologic study. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 61(5), 834-837.

Rodríguez-Osorio, M., Gómez-García, V., Benito, R., & Gil, J. (2003). *Trichinella britovi* human infection in Spain: antibody response to surface, excretory/secretory and somatic antigens. *Parasite*, 10(2), 159-164.

Rodríguez-Pérez, J., Gómez-Morales, M., Illescas-Gómez, P., Rodríguez-Osorio, M., & Gómez-García V. (1989). Trichinellosis in the province of Granada (Spain). In: *Trichinellosis* (Eds. Tanner, C.E.; Martínez-Fernández, A.R. & Bolás-Fernández, F.). C.S.I.C. Press, Madrid, Spain, 400-404.

- Rojas, A., Freedberg, N., Markovics, A., Gottlieb, Y., & Baneth, G. (2017).** Influence of physical and chemical factors on the embryonation, hatching and infectivity of *Spirocerca lupi*. *Veterinary Parasitology*, 242, 71-78.
- Rojas, A., Segev, G., Markovics, A., Aroch, I., & Baneth, G. (2017).** Detection and quantification of *Spirocerca lupi* by HRM qPCR in fecal samples from dogs with spirocercosis. *Parasites & Vectors*, 10(1), 435.
- Rojas, A., Sanchis-Monsonís, G., Alić, A., Hodžić, A., Otranto, D., Yasur-Landau, D., & Baneth, G. (2018a).** *Spirocerca vulpis* sp. nov. (Spiruridae: Spirocercidae): description of a new nematode species of the red fox, *Vulpes vulpes* (Carnivora: Canidae). *Parasitology*, 145(14), 1917-1928.
- Rojas, A., Dvir, E., Farkas, R., Sarma, K., Borthakur, S., Jabbar, A., & Baneth, G. (2018b).** Phylogenetic analysis of *Spirocerca lupi* and *Spirocerca vulpis* reveal high genetic diversity and intra-individual variation. *Parasites & Vectors*, 11(1), 639.
- Rojas, A., Dvir, E., & Baneth, G. (2019).** Insights on *Spirocerca lupi*, the Carcinogenic Dog Nematode. *Trends in Parasitology*, 36(1), 52-63.
- Rosell, C., Fernández-Llario, P., & Herrero, J. (2001).** El jabalí (*Sus scrofa* Linnaeus, 1758). *Galemys*, 13(2), 1-25.
- Rosell, C., & Carretero, M. (2002).** Evolució demogràfica del senglar (*Sus scrofa*) al Montseny. V Trobada d'Estudiosos del Montseny. *Monografies*, 33.
- Roslin, T., & Koivunen, A. (2001).** Distribution and abundance of dung beetles in fragmented landscapes. *Oecologia*, 127, 69– 77.
- Rothenberg, M., & Hogan, S. (2006).** The eosinophil. *Annual review of immunology*, 6(24), 147-174.
- Rothmann, W., & de Waal, P. (2017).** Diversity of *Spirocerca lupi* in domestic dogs and black-backed jackals (*Canis mesomelas*) from South Africa. *Veterinary Parasitology*, 244, 59-63.
- Ryan, S., Brashares, J., Walsh, C., Milbers, K., Kilroy, C., & Chapman, C. (2012).** A survey of gastrointestinal parasites of olive baboons (*Papio anubis*) in human settlement areas of Mole National Park, Ghana. *Journal of Parasitology*, 98(4), 885-888.
- Saenz de Buruaga, M., Lucio, A., & Purroy, F. (1991).** Reconocimiento de sexo y edad en especies cinegéticas. *Gobierno Vasco, Vitoria*, 127 pp.
- Sainsbury, A., Bennett, P., Cunningham, A., & Kirkwood, J. (2001).** Estado de la vigilancia de la salud de la vida silvestre en el Reino Unido. *Registro Veterinario*, 148(18), 558-563.
- Šálek, M., Drahníková, L., & Tkadlec, E. (2015).** Changes in home range sizes and population densities of carnivore species along the natural to urban habitat gradient. *Mammal Review*, 45(1), 1-14.

- San Miguel, A. (1994).** La dehesa española. Origen, tipología, características y gestión. Fundación Conde del Valle de Salazar. Madrid, España, 96 pp.
- San Miguel, J., Álvarez, G., & Luzón, M. (2001).** Procesos parasitarios detectados en ciervos (*Cervus elaphus*) abatidos en la provincia de Toledo. *Galemys*, 13, 11-24.
- Sánchez Vicente, S. (2013).** Contribución al conocimiento de la parasitofauna (Helmintos y Artrópodos) de mamíferos no lagomorfos de Canarias. Tesis Doctoral, Universidad de Barcelona (España).
- Sanchis-Monsonís, G. (2015).** Parasitofauna del zorro rojo (*Vulpes vulpes*) en la Comunidad Valenciana. Tesis Doctoral, Universidad de Murcia (España).
- Sanchis-Monsonís, G., Fanelli, A., Tizzani, P., & Martínez-Carrasco, C. (2019).** First epidemiological data on *Spirocerca vulpis* in the red fox: a parasite of clustered geographical distribution. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 18, 100338.
- Sandel, B., Arge, L., Dalsgaard, B., Davies, R., Gaston, K. J., Sutherland, W., & Svenning, J. (2011).** The influence of Late Quaternary climate-change velocity on species endemism. *Science*, 334(6056), 660-664.
- Santos, M., Pinto, B., & Santos-Reis, M. (2007).** Trophic niche partitioning between two native and two exotic carnivores in SW Portugal. *Web Ecology*, 7(1), 53-62.
- Sarmiento, P., Cruz, J., Eira, C., & Fonseca, C. (2009).** Evaluation of camera trapping for estimating red fox abundance. *The Journal of Wildlife Management*, 73(7), 1207-1212.
- Sasani, F., Javanbakht, J., Javaheri, A., Hassan, M. M., & Bashiri, S. (2012).** The evaluation of retrospective pathological lesions on spirocercosis (*Spirocerca lupi*) in dogs. *Journal of Parasitic Diseases*, 38(2), 170-173.
- Sato, H. (2009).** Biology and transmission of the gullet worm (*Gongylonema pulchrum* Molin, 1857). *Yamaguchi Journal of Veterinary Medicine*, (36), 31-54.
- Scandrett, B., Konecni, K., Lalonde, L., Boireau, P., & Vallée, I. (2018).** Detection of natural *Trichinella murrelli* and *Trichinella spiralis* infections in horses by routine post-slaughter food safety testing. *Food and Waterborne Parasitology*, 11, 1-5.
- Scholtz, C. H., Davis, A. L. V., & Kryger, U. (2009).** Evolutionary biology and conservation of dung beetles, ↑Pensoft Publishers, Sofia-Moscow, 567 pp.
- Schroter, D., Cramer, W., Leemans, R., Prentice, I.C., Araujo, M., Arnell, N., Bondeau,... & Zierl, B. (2005).** Ecosystem service supply and vulnerability to global change in Europe. *Science*, 310, 1333-1337.
- Segovia, J., Miquel, J., Feliu, C., & Torres, J. (2001).** Morphological and morphometric study of *Spirocerca lupi*. *Helminthologia*, 38(3), 115-122.
- Segovia, J., Torres, J., & Miquel, J. (2004).** Helminth parasites of the red fox (*Vulpes vulpes*, L. 1758) in the Iberian Peninsula: an ecological study. *Acta Parasitology*, 49, 67-79.

- Seibold, H., Bailey, W., Hoerlein, B., Jordan, E., & Schwabe, C. (1955).** Observations on the possible relation of malignant esophageal tumors and *Spirocerca lupi* lesions in the dog. American journal of veterinary research, 18(58), 5-14.
- Selva, N., Jędrzejewska, B., Jędrzejewski, W., & Wajrak, A. (2005).** Factors affecting carcass use by a guild of scavengers in European temperate woodland. Canadian Journal of Zoology, 83, 1590-1601.
- Sen, K., & Anantaraman, M. (1971).** Some observations on the development of *Spirocerca lupi* in its intermediate and definitive hosts. Journal of Helminthology, 45(2-3), 123-132.
- Serrano, F. J., Pérez-Martín, J. E., Reina, D., Navarrete, I., & Kapel, C. M. O. (1999).** Influence of infection intensity on predilection sites in swine trichinellosis. Journal of Helminthology, 73(3), 251-254.
- Serrano, J. L. (2004).** Estudio de la población vulpina de la provincia de Soria como bioindicador sanitario. Tesis Doctoral. Departamento de especialidades médicas, Universidad de Alcalá de Henares, Madrid (España).
- Setsuda, A., Da, N., Hasegawa, H., Behnke, J., Rana, H., Dhakal, I., & Sato, H. (2016).** Intraspecific and interspecific genetic variation of *Gongyлонema pulchrum* and two rodent *Gongyлонema* spp., (*G. aegypti* and *G. neoplasticum*), with the proposal of *G. nepalensis* n. sp. for the isolate in water buffaloes from Nepal. Parasitology Research, 115(2), 787-795.
- Setsuda, A., Ribas, A., Chaisiri, K., Morand, S., Chou, M., Malbas, F., Muchammad Y., & Sato, H. (2018).** Molecular genetic diversity of *Gongyлонema neoplasticum* from rodents in Southeast Asia. Systematic Parasitology 95, 235–47.
- Seurat, L. (1916).** Sur les Oxyures des mammiferes. Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie et de ses Filiales, 79, 64–68.
- Shimalov, V. V., & Shimalov, V. T. (2000).** Helminth fauna of the wolf (*Canis lupus*, Linnaeus 1758) in Belorussian Polesie. Parasitology Research, 86, 163–164.
- Shimalov, V. V., & Shimalov, V. T. (2002).** Helminth fauna of the European polecat (*Mustela putorius* Linnaeus, 1758) in Belorussian Polesie. Parasitology research, 88(3), 259-260.
- Sidorovich, V., Sidorovich, A., & Izotova, I. (2006).** Variations in the diet and population density of the red fox *Vulpes vulpes* in the mixed woodlands of northern Belarus. Mammalian Biology, 71, 74–89.
- Sillero-Zubiri, C., Hoffmann, M., & Macdonald, D. (2004).** Canids: foxes, wolves, jackals and dogs: status survey and conservation action plan Canids: foxes, wolves, jackals, and dogs: status survey and conservation action plan (Vol. 95). Gland, Switzerland: IUCN, 430pp.
- Simón Vicente, F. (1975).** Helmintofauna parasitaria de *Vulpes vulpes* y *Genetta genetta* en áreas del Oeste de la meseta norte de España. In XII Congresso da União Internacional de Biologia da Caça, 6, 279-282.

- Singh, B., Juyal, P., Sobti, V., & Singh, B. (1999).** *Spirocerca lupi* in a subcutaneous nodule in a dog in India. *Journal of Veterinary Parasitology*, 13, 59-60.
- Sivy, K., Pozzanghera, C., Grace, J., & Prugh, L. (2017).** Fatal attraction? Intraguild facilitation and suppression among predators. *The American Naturalist*, 190, 663-679.
- Skrjabin, K. (1971).** Spirurata of animals and man and the diseases caused by them, part 4: Thelazioidea. Editorial Israel Program for Scientific Translations, Jerusalem, 610 pp.
- Smith, B. P. (2010).** *Medicina interna de grandes animales*. Elsevier 4ª edición, España, 1868 pp.
- Sofronic-Milosavljevic, L., Ilic, N., Pinelli, E., & Gruden-Movsesijan, A. (2015).** Secretory products of *Trichinella spiralis* muscle larvae and immunomodulation: implication for autoimmune diseases, allergies, and malignancies. *Journal of Immunology Research*, 2015, 1-14.
- Soulsby, E. (1965).** *Textbook of veterinary clinical parasitology*. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 88-910.
- Soulsby, E. (1987).** *Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos*; Orden: Spirurida. Martínez A; Rojo Vázquez F. 7ª edición. Distrito Federal, México. Nueva Editorial Interamericana, 292-295.
- Steelman, H., Henke, S., & Moore, G. (1998).** Gray fox response to baits and attractants for oral rabies vaccination. *Journal of Wildlife Diseases*, 34(4), 764-770.
- Steelman, H., Henke, S., & Moore, G. (2000).** Bait delivery for oral rabies vaccine to gray foxes. *Journal of Wildlife Diseases*, 36(4), 744-751.
- Stephens, L., Gleiser, C., & Jardine, J. (1983).** Primary pulmonary fibrosarcoma associated with *Spirocerca lupi* infection in a dog with hypertrophic pulmonary osteoarthropathy. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 182(5), 496-498.
- Stettner, N., Ranen, E., Dank, G., Lavy, E., Aroch, I., Harrus, S., & Harmelin, A. (2005).** Murine xenograft model of *Spirocerca lupi*-associated sarcoma. *Comparative Medicine*, 55(6), 510-514.
- Studel, B., Hector, A., Friedl, T., Löffke, C., Lorenz, M., Wesche, M., & Kessler, M. (2012).** Biodiversity effects on ecosystem functioning change along environmental stress gradients. *Ecology Letters*, 15(12), 1397-1405.
- Stewart, T., & Kent, K. (1963).** Beetles serving as intermediate hosts' of swine nematodes in southern Georgia. *Journal of Parasitology*, 49(1), 158-159.
- Stojcevic, D., Mihaljevic, Z., & Marinculic, A. (2004).** Parasitological survey of rats in rural regions of Croatia. *Veterinarni Medicina*, 49(3), 70.
- Sunquist, M. E., & Sunquist, F. (2001).** *Changing landscapes: consequences for carnivores*. *En Conservation Biology* 5. *Carnivore Conservation*. Cambridge University Press. The Zoological Society of London, 399-418.

- Szczęсна, J., & Popiołek, M. (2007).** The first record of *Spirocerca lupi* (Rudolphi, 1809), (Spiroceridae, Nematoda) from Poland based on faecal analysis of wolf (*Canis lupus* L.). *Helminthologia*, 44(4), 230-232.
- Takumi, K., Franssen, F., Fonville, M., Grasset, A., Vallée, I., Boireau, P., & van der Giessen, J. (2010).** Within-host dynamics of *Trichinella spiralis* predict persistent parasite transmission in rat populations. *International Journal for Parasitology*, 40(11), 1317-1324.
- Taylor, M., Coop, R., & Wall, R. (2007).** Parásitos de ovejas y cabras. En: *Parasitología Veterinaria*. 4ª edición. Oxford, Reino Unido: Blackwell Publishing, 436-523.
- Teichert, M. (1955).** Biologie und Brutfürsorgemassnahmen von *Geotrupes mutator* Marsh, und *Geotrupes stercorarius* L. (Col. Scarab.). *Wissenschaftliche Zeitschrift Martin Luther-University Halle-Wittenburg*, 5, 187-218.
- Teunis, P., Koningsstein, M., Takumi, K., & Van Der Giessen, J. (2012).** Human beings are highly susceptible to low doses of *Trichinella* spp. *Epidemiology & Infection*, 140(2), 210-218.
- Thanikachalam, M., Sundararaj, A., & Ramakrishnan, R. (1984).** Cystitis associated with a nematode in a dog. *Cheiron Tamil Nadu Journal of Veterinary Science and Animal Husbandry*, 13, 220–222.
- Thuiller, W., Lavorel, S., Araújo, M., Sykes, M., & Prentice, I. (2005).** Climate change threatens plant diversity in Europe. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 8245-8250.
- Tizard, I. R. (2009).** Introducción a la inmunología veterinaria. 8ª edición, España: Elsevier Health Sciences, 592 pp.
- Tompkins, D., Dunn, A., Smith, M., & Telfer, S. (2011).** Wildlife diseases: from individuals to ecosystems. *Journal of Animal Ecology*, 80(1), 19-38.
- Torres, J., Pérez, M., Segovia, J., & Miquel, J. (2001).** Utilidad de la coprología parasitaria en la detección de helmintos parásitos en los cánidos silvestres ibéricos. *Galemys*, 13, 75-83.
- Torres, T., Trelis, M., Espert, A., Ribas, A., Toledo, R., Casanova, J. C., & Feliú, C. (2003).** Helminth fauna of small mammals (insectivores and rodents) in Doñana (southeastern Iberian Peninsula). *Revista Ibérica de Parasitología*, 63(1-2), 23-29.
- Travaini, A., Aldama, J., Laffitte, R., & Delibes, M. (1993).** Home range and activity patterns of red fox *Vulpes vulpes* breeding females. *Acta Theriologica*, 38, 427-434.
- Traversa, D., Costanzo, F., Iorio, R., Aroch, I., & Lavy, E. (2007).** Mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 (cox1) gene sequence of *Spirocerca lupi* (Nematoda, Spirurida): avenues for potential implications. *Veterinary Parasitology*, 146(3-4), 263-270.
- Traversa, D., Avolio, S., Modrý, D., Otranto, D., Iorio, R., Aroch, I., & Lavy, E. (2008).** Co-promicroscopic and molecular assays for the detection of cancer-causing parasitic nematode *Spirocerca lupi*. *Veterinary Parasitology*, 157(1-2), 108-116.

- Trewhella, W., Harris, S., & McAllister, F. (1988).** Dispersal distance, home-range size and population density in the red fox (*Vulpes vulpes*): a quantitative analysis. *Journal of Applied Ecology*, 25(2), 423-434.
- Trilla, A. (2020).** Un mundo, una salud: la epidemia por el nuevo coronavirus COVID-19. *Medicina Clínica*, 154(5), 175.
- Tung, K., Hsiao, F., Yang, C., Chou, C., Lee, W., Wang, K., & Lai, C. (2009).** Surveillance of endoparasitic infections and the first report of *Physaloptera* spp, and *Sarcocystis* spp., in farm rodents and shrews in central Taiwan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 71(1), 43-47.
- Ulrichs, T., Kosmiadi, G., Trusov, V., Jörg, S., Pradi, L., Titukhina, M., & Kaufmann, S. (2004).** Human tuberculous granulomas induce peripheral lymphoid follicle-like structures to orchestrate local host defence in the lung. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 204(2), 217-228.
- Urch, T., Albrecht, B., Büttner, D., & Tannich, E. (2005).** Humane Infektion mit *Gongylonema pulchrum*. *DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 130(45), 2566-2568.
- Urios, V., & Plou, J. (1986).** Estudio de la densidad y alimentación del zorro común (*Vulpes vulpes*) en la provincia de Valencia. *Consellería de Agricultura, Generalitat Valenciana*. Valencia.
- Urios, V. (1990).** Consideraciones sobre la ecología del zorro (*Vulpes vulpes*). *Medicina Natural*, 2, 129-142.
- Urquhart, G., Armour, J., Duncan, J., Dunn, A., & Jennings, F. (1996).** *Veterinary parasitology*, 2ª edición, Black Well Science. The University of Glaskow, Scotland, UK, 181-188.
- Valcárcel, F., González, J., Aguilar, A., Sánchez, M., González, M. G., Suárez, R., & Olmeda, A. S. (2018).** Spirocercosis in red fox (*Vulpes vulpes*) in a natural reserve located in a meso-Mediterranean area. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 13, 115-119.
- Valentín, L. (1935).** Aspectos sanitarios: triquinosis. *La Semana Veterinaria*, 990.
- Van der Giessen, J., Rombout, Y., Franchimont, H., La Rosa, G., & Pozio, E. (1998).** *Trichinella britovi* in foxes in The Netherlands. *The Journal of Parasitology*, 84(5), 1065-1068.
- Van Der Giessen, J., Rombout, Y., Van der Veen, A., & Pozio, E. (2001).** Diagnosis and epidemiology of *Trichinella* infections in wildlife in The Netherlands. *Parasite*, 8, S103-S105.
- Van der Merwe, L., Kirberger, R., Clift, S., Williams, M., Keller, N., & Naidoo, V. (2008).** *Spirocerca lupi* infection in the dog: a review. *The Veterinary Journal*, 176(3), 294-309.
- Van der Merwe, L., Christie, J., Clift, S., & Dvir, E. (2012).** Salivary gland enlargement and sialorrhoea in dogs with spirocercosis: a retrospective and prospective study of 298 cases. *Journal of the South African Veterinary Association*, 83(1), 1-7.
- Van Die, I., & Cummings, R. (2010).** Glycan gimmickry by parasitic helminths: a strategy for modulating the host immune response?. *Glycobiology*, 20(1), 2-12.

- Van Huis, A., Van Itterbeeck, J., Klunder, H., Mertens, E., Halloran, A., Muir, G., & Vantomme, P. (2013).** Edible insects: future prospects for food and feed security. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 171.
- Van Knapen, F. (1998).** European proposal for alternative *Trichinella* control in domestic pigs. *Fleischwirtschaft* (Germany), 3, 19-20.
- Van Velzer, H. (1991).** Prioridades para la conservación de los Andes colombianos. Seminario sobre ecosistemas de montañas tropicales- IUBS. Memorias Universidad Cauca, Colombia, 58 pp.
- Varcasia, A., Scala, A., Zidda, A., Cabras, P. A., Gaglio, G., Tamponi, C., & Sato, H. (2017).** First record of *Gongylonema nepalensis* in domestic and wild ruminants in Europe. *Veterinary Parasitology*, 246, 11-18.
- Varejão-Silva, M. (2006).** Climatologia e meteorologia. Recife: INMET. Versão Digital 2, 133-155. [http://solarimetria.fca.unesp.br/downloads/Varej%C3%A3o-Silva\(2006\).pdf](http://solarimetria.fca.unesp.br/downloads/Varej%C3%A3o-Silva(2006).pdf)
- Varodi, E., Malega, A., Kuzmin, Y., & Korniyushin, V. (2017).** Helminths of wild predatory mammals of Ukraine. *Nematodes. Vestnik Zoologii*, 51(3), 187.
- Vennervald, B., & Polman, K. (2009).** Helminths and malignancy. *Parasite Immunology*, 31(11), 686-696.
- Venturiello, S. M., & Gentilini, M. V. (2011).** *Trichinella spiralis*: relación de la infección con el sistema inmune de mucosas. *Instituto Nacional Salud, Bogotá*, 31(3), 313-315.
- Verdú, J.R., Crespo, M.B., & Galante, E. (2000).** Conservation strategy of a nature reserve in Mediterranean ecosystems: the effects of protection from grazing on biodiversity. *Biodiversity and Conservation*, 9, 1707– 1721.
- Verdú, J.R., Moreno, C.E., Sánchez-Rojas, G., Numa, C., Galante, E., & Halffter, G. (2007).** Grazing promotes dung beetle diversity in the xeric landscape of a Mexican biosphere reserve. *Biological Conservation*, 140, 308– 317.
- Vogeler, J. C., & Cohen, W. B. (2016).** A review of the role of active remote sensing and data fusion for characterizing forest in wildlife habitat models. *Revista de Teledetección*, 45, 1-14.
- Voigt, D. R., & Macdonald, D. W. (1984).** Variation in the spatial and social behaviour of the red fox. *Acta Zoologica Fennica*, 171, 261-265.
- Voigt, D.R., (1987).** Red fox. In: M. Novak, J.A. Baker, M.E. Obbard and B. Malloch (Editors), *Wild furbearer management and conservation in North America*. Canada: Ministry of Natural Resources, Ontario, 378-392.
- Vos, H., & Meekes, H., (1999).** Trends in European cultural landscape development: perspectives for a sustainable future. *Landscape Urban Plan*, 46, 3–14.
- Wacker, K., Rodríguez, E., Garate, T., Geue, L., Tackmann, K., Selhorst, T., & Conraths, F. J. (1999).** Epidemiological analysis of *Trichinella spiralis* infections of foxes in Brandenburg, Germany. *Epidemiology & Infection*, 123(1), 139-147.

- Walton, Z., Samelius, G., Odden, M., & Willebrand, T. (2018).** Long-distance dispersal in red foxes *Vulpes vulpes* revealed by GPS tracking. *European Journal of Wildlife Research*, 64(6), 1-6.
- Wandera, J. G. (1976).** Further observations on canine spirocercosis in Kenya. *The Veterinary Record*, 99(18), 348-351.
- Wang, C. H., & Bell, R. G. (1988).** Antibody-mediated in-vivo cytotoxicity to *Trichinella spiralis* newborn larvae in immune rats. *Parasite Immunology*, 10(3), 293-308.
- Wang, L., Cui, J., Hu, D. D., Liu, R. D., & Wang, Z. Q. (2014).** Identification of early diagnostic antigens from major excretory-secretory proteins of *Trichinella spiralis* muscle larvae using immunoproteomics. *Parasites & Vectors*, 7(1), 1-8.
- Webbon, C. C., Baker, P. J., & Harris, S. (2004).** Faecal density counts for monitoring changes in red fox numbers in rural Britain. *Journal of Applied Ecology*, 41(4), 768-779.
- Webbon, C.C., Baker, P.J., Cole N.C., & Harris, S. (2006).** Macroscopic prey remains in the winter diet of foxes *Vulpes vulpes* in rural Britain. *Mammal Review*, 36, 85–97.
- Webster, P., Monrad, J., Kapel, C. M., Kristensen, A. T., Jensen, A., & Thamsborg, S. (2017).** The effect of host age and inoculation dose on infection dynamics of *Angiostrongylus vasorum* in red foxes (*Vulpes vulpes*). *Parasites & Vectors*, 10(1), 1-11.
- Whiteside, T. L. (1996).** Isolation of human NK cells and generation of LAK activity. *Current Protocols in Immunology*, 7, 7-7.
- Whiteside, T. L. (2000).** Measurement of cytotoxic activity of NK/LAK cells. *Current Protocols in Immunology*, 35(1), 7-18.
- Wiethoelter, A. K., Beltrán-Alcrudo, D., Kock, R., & Mor, S. M. (2015).** Global trends in infectious diseases at the wildlife–livestock interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(31), 9662-9667.
- Wijekoon, H. S., Munasinghe, D. M. S., Wijayawardhane, K. A. N., Ariyaratna, H. M. H. S., Horadagoda, N., Rajapakse, J., & De Silva, D. N. (2018).** Postmortem detection and histopathological features of canine spirocercosis-induced putative esophageal chondrosarcoma. *Veterinary World*, 11(10), 1376.
- Williams, P. H., Humphries, C., Araújo, M. B., Lampinen, R., Hagemeyer, W., Gasc, J. P., & Mitchell-Jones, T. (2000).** Endemism and important areas for representing European biodiversity: A preliminary exploration of atlas data for plants and terrestrial vertebrates. *Belgian Journal of Entomology*, 2, 21-46.
- Wilmers, C. C., Crabtree, R. L., Smith, D. W., Murphy, K. M., & Getz, W. M. (2003).** Trophic facilitation by introduced top predators: grey wolf subsidies to scavengers in Yellowstone National Park. *Journal of Animal Ecology*, 72, 909-916.

- Wilson, M. E., Lorente, C. A., Allen, J. E., & Eberhard, M. L. (2001).** *Gongylonema* infection of the mouth in a resident of Cambridge, Massachusetts. *Clinical Infectious Diseases*, 32(9), 1378-1380.
- Wright, I., Stafford, K., & Coles, G. (2016).** The prevalence of intestinal nematodes in cats and dogs from Lancashire, north-west England. *Journal of Small Animal Practice*, 57(8), 393-395.
- Xiaodan, L., Zhensheng, W., Ying, H., Hongwei, L., Jianqiu, J., Peiru, Z., & Zhimin, Y. (2018).** *Gongylonema pulchrum* infection in the human oral cavity: A case report and literature review. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 125(3), e49-e53.
- Yale, G., Bhanurekha, V., & Ganesan, I. (2013).** Anthropogenic factors responsible for emerging and re-emerging infectious diseases. *Current Science*, 105(7), 940- 946.
- Yang, Y., Cai, Y. N., Tong, M. W., Sun, N., Xuan, Y. H., Kang, Y. J., & Liu, M. Y. (2016).** Serological tools for detection of *Trichinella* infection in animals and humans. *One Health*, 2, 25-30.
- Yazdanbakhsh, M., van den Biggelaar, A., & Maizels, R. M. (2001).** Th2 responses without atopy: immunoregulation in chronic helminth infections and reduced allergic disease. *Trends in Immunology*, 22(7), 372-377.
- Ye, Z. W., Yuan, S., Yuen, K. S., Fung, S. Y., Chan, C. P., & Jin, D. Y. (2020).** Zoonotic origins of human coronaviruses. *International Journal of Biological Sciences*, 16(10), 1686-1697.
- Yera, H., Andiva, S., Perret, C., Limonne, D., Boireau, P., & Dupouy-Camet, J. (2003).** Development and evaluation of a Western blot kit for diagnosis of human trichinellosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 10(5), 793-796.
- Yogeshpriya, S. (2016).** A complete overview on spirocercosis in dogs. *International Journal of Food, Agriculture and Veterinary Sciences*. 6(3), 16–20.
- Yom-Tov, Y., Yom-Tov, S., Barreiro, J., & Blanco, J. C. (2007).** Body size of the red fox *Vulpes vulpes* in Spain: the effect of agriculture. *Biological Journal of the Linnean society*, 90(4), 729-734.
- Zain, S. N. M., Behnke, J. M., & Lewis, J. W. (2012).** Helminth communities from two urban rat populations in Kuala Lumpur, Malaysia. *Parasites & Vectors*, 5(1), 1-23.
- Zamora, M. J., Alvarez, M., Olmedo, J., Blanco, M. C., & Pozio, E. (2015).** *Trichinella pseudospiralis* in the Iberian Peninsula. *Veterinary Parasitology*, 210(3-4), 255-259.
- Zapata, S. C., Travaini, A., & Delibes, M. (1997).** Reproduction of the red fox *Vulpes vulpes* in Doñana, Southern Spain. *Mammalia*, 62(1), 139-142.
- Zarlenga, D. S., Rosenthal, B., La Rosa, G., Pozio, E., & Hoberg, E. P. (2006).** An old genus learns new tricks: late tertiary colonization and speciation of *Trichinella* nematodes among eutheria. USA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 7354-7359.

Zhang, T., Wu, Q., & Zhang, Z. (2020). Probable pangolin origin of SARS-CoV-2 associated with the COVID-19 outbreak. *Current Biology*, 1346-1351.e2.

Zheng, J. (2020). SARS-CoV-2: an emerging coronavirus that causes a global threat. *International Journal of Biological Sciences*, 16(10), 1678-1685.

Zinsstag, J., Crump, L., Schelling, E., Hattendorf, J., Maidane, Y. O., Ali, K. O., & Abdikadir, M. I. (2018). Climate change and one health. *FEMS Microbiology Letters*, 365(11), fny085.

Zinter, D. E., & Migaki, G. (1970). *Gongylonema pulchrum* in tongues of slaughtered pigs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 157(3), 301-303.

