

Universidad CEU Cardenal Herrera

**Departamento de Producción y Sanidad Animal, Salud Pública Veterinaria y Ciencia y Tecnología
de los Alimentos**



**OPTIMIZACIÓN DE TÉCNICAS
COPROLÓGICAS PARA EL DIAGNÓSTICO
PARASITARIO EN EL MONO VERVET
(*Chlorocebus pygerythrus*)**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Dña. Ana Navarro Serra

Dirigida por:

Dra. Dña. María Magdalena

Garijo Toledo

Dr. D. Jesús Cardells Peris

Valencia
2017

Memoria presentada por Dña. Ana Navarro Serra
para optar al grado de Doctor en Veterinaria por la
Universidad CEU Cardenal Herrera.

A mis alumnos.

“Sólo comprendemos aquellas preguntas que podemos responder.”

Friedrich Nietzsche.

Agradecimientos

Algunos de los agradecimientos están escritos en plural, no se trata de un error. No concibo esta tesis sin Héctor y sé que estará de acuerdo en todos los agradecimientos en los que le incluyo. Todos y cada uno de los que estáis aquí nos habéis ayudado. No está permitido realizar una tesis con varios autores, así que con cada uno de estos agradecimientos os entrego una parte de este trabajo. Al fin y al cabo, sin vosotros esto no hubiera sido posible.

Para convertirse en un buen investigador creo que es importante saber trabajar con otras personas y compartir ideas. Empecé este proyecto con la imagen utópica de lo bonito de la investigación, pero a lo largo de estos años he visto que no es oro todo lo que reluce. Estoy convencida que la elección del tema de tesis y de los directores es de vital importancia para llegar a buen puerto. En mi caso, tuve que cambiar de rumbo, naufragar y volver a empezar. Ha sido un camino lleno de dudas y convicciones, de errores y aciertos, de risas y llantos hasta llegar a este momento, donde presento mi tesis.

Y, por ello a las primeras personas que quiero agradecer no haber naufragado de nuevo es a Jesús y Marilena, por aceptar dirigir estas tesis, por ayudarnos a saltar todas las tempestades y hacer que todo fuera tan sencillo. Gracias de corazón por haber sido la luz del faro y habernos guiado en todo momento.

A Ángel García, por los sabios consejos (desde que fuimos tus alumnos hasta hoy mismo). Me hiciste ver lo bonito de la elaboración de una tesis y lo importante de su utilidad para nuestra vida profesional. Hemos disfrutado muchísimo reestudiando parasitología, buscando en la literatura soluciones a los parasitismos que hay en los santuarios. Todo ello hace parte de nuestro trabajo diario. Gracias, por enseñarme a unirlo.

A Carlos Garcés, a Carmen López, a Mariola y a Christelle por vuestra eterna sonrisa que es tan valiosa en tantos momentos.

A todo el personal de la biblioteca que nos ha aguantado estos años, en especial a Luisa, por su paciencia infinita y su constante alegría.

A todos los amigos que he hecho desde que se empezó a cuajar “hacer el doctorado”. Gracias a los que nos habéis hecho la estancia más fácil cuando estábamos lejos de casa. En especial a Marie, Dalia y Laia. A mis compis de doctorado Clara y Alba, espero que después de la tesis podáis disfrutar de vuestro trabajo como investigadoras.

A Ester, mi compañera de despacho y mi amiga. Podría llenar páginas agradeciéndote todo lo que me has ayudado y enseñado en estos años, pero prefiero decírtelo día a día en el campo. Gracias por llenarme la cabeza de “pajaretas”. Estoy convencida que tu motivación hará que tiendas a elegir la conducta adecuada para guiar tu camino y disfrutarlo como te mereces. Seguro que todo esto ha valido la pena. Gracias por preocuparte por mí.

A mis alumnos, por retarme todos los días con vuestras preguntas y por confiar en mí.

A Paloma, por haber aceptado el trabajo y habernos quitado tantas horas de trabajo en la clínica. Gracias por recordarnos lo bonito de nuestra profesión.

A Belén, por toda la ayuda estadísticamente significativa de estos años.

A Ana, por sacarnos de más de un apuro.

A nuestra familia de amigos, por ayudarnos a conseguir el material necesario... incluso por llorar cuando nos íbamos al pensar que quizás no volveríamos. En especial a Ederne, Paloma y mis “amnésicas”, por preocuparos siempre por cómo estábamos y por preguntarnos sin cesar si las acabábamos de una vez por todas. Gracias por seguir estando ahí.

A mi familia sanguínea por escucharnos siempre. Gracias por vuestra paciencia, por haber cuidado de Yago, Neo y Tigre cuando nos teníamos que ir a África o a todos los sitios donde nos han llevado estas tesis o nuestro trabajo.

A Amparo, que siempre está dispuesta a ayudarnos. Por enseñarme qué es la electricidad con una simple colonia, por compartir tantas noches hablando de la historia de Valencia o entrenando patinaje artístico y, por hacerme reír hasta en los peores momentos.

Gracias por “cuidarme” siempre, desde que te conocí despertaste mi instinto de supervivencia.

A mis amigos doctores, en especial a Nacho y a Jaime que tanto han vivido estas tesis. Nacho, una de las pocas personas realmente buenas y altruistas que conozco. Gracias, por estar dispuesto a ayudarnos de todas las maneras que te lo hemos pedido. Jaime, gracias por enseñarme que la eficacia no es sinónimo de eficiencia y con esto, lo he dicho todo...tú ya me entiendes.

A todos los integrantes de VMF, tanto humanos como no humanos. Especialmente a Josie y Dave, por abrirnos las puertas de su proyecto de vida y acogernos con tanto cariño. Gracias, por confiar en nuestro juicio veterinario en cualquier situación.

A HELP CONGO, el punto de partida de hacer una tesis. En especial a Bosco que ya no está con nosotros y a Aliette, por luchar día tras día por proteger ese pedacito de selva. A ver si el año que viene, podemos ir a veros. Ahora ya no será la tesis quien nos lo impida...espero.

A John y Margaret, por ser el ejemplo a seguir.

A Héctor, por tener ese punto de impulsividad que tanto me falta, por haberme convencido de emprender este camino juntos. Gracias por poder contar siempre contigo, sobre todo estos últimos años donde nuestro camino se ha llenado de obstáculos. Afortunadamente, parece que los vamos superando y las tesis también se acaban ¡Qué agonía la extinción del plan! Este escrito es la cabeza del iceberg de muchas horas de trabajo que me has ayudado a disfrutar. Gracias por estar siempre a mi lado... bueno casi siempre que aún me acuerdo del elefante.

Resumen

La mayoría de primates silvestres ocupan países económicamente desfavorecidos, pero aquellos que viven en cautividad se distribuyen por todo el mundo (Ferrie *et al.*, 2014). Los parques zoológicos, los centros de investigación y los santuarios son las principales instituciones que los albergan por diversos motivos. En el caso de los parques zoológicos y de los centros de investigación uno de sus principales objetivos es la investigación. Por el contrario, los santuarios surgen en su mayoría en el país de origen del primate, con el fin de rehabilitar y/o preparar los animales para una posible reintroducción en la naturaleza (Leendertz *et al.*, 2006). Los primates en cautividad viven en espacios restringidos donde la reinfección parasitaria es sencilla sin un buen control de los parásitos existentes. Por tanto, para un mantenimiento óptimo, es vital conocer los parásitos presentes, su forma de diagnóstico y las medidas sanitarias de tratamiento y profilaxis. El conocimiento de las líneas base de parasitismos de los primates, permite evaluar el estado sanitario de sus poblaciones y mejorar la profilaxis de las enfermedades en ellas tanto de los primates cautivos como de los silvestres (Gillespie, 2006).

La diversidad parasitaria es diferente dependiendo del área de distribución del primate, no se dispone de estudios que correlacionen las características de un primate con la diversidad de parásitos que alberga y se ha demostrado que cuanto más se estudia una especie, mayor diversidad de parásitos se describen en ella, por ello, resulta imprescindible aplicar técnicas de diagnóstico de forma rutinaria para diagnosticar los parásitos gastrointestinales (Nunn *et al.*, 2003).

Desde la primera técnica de coprología parasitaria, se han desarrollado un sinnúmero de métodos y estos han ido sufriendo modificaciones para mejorarlos o adaptarlos. Por ejemplo, algunas de las técnicas cualitativas se han convertido en cuantitativas (Cringoli, 2006; Becker *et al.*, 2011). Conscientes de las limitaciones de equipamiento en ciertas condiciones de investigación, se han rediseñado técnicas de diagnóstico coprológico que no requieren de material laboratorio especializado para simplificar su utilización y ampliar sus posibilidades de uso en el campo o en zonas económicamente desfavorecidas (Knopp *et al.*, 2009), aunque se siguen necesitando estudios sobre técnicas copoparasitarias que ofrezcan

mayor sensibilidad y espectro de diagnóstico sin tener que depender del uso de equipos caros o inaccesibles (Barda *et al.*, 2013).

Ninguna de las técnicas descritas ha sido estandarizada como la “gold standard” para la identificación de todos los parásitos de primates. En la actualidad existe una controversia sobre la idoneidad de las técnicas coprológicas. En la última década se han realizado comparativas para evaluar la sensibilidad de diferentes técnicas para la detección de ciertas formas parasitarias, pero existe escasa bibliografía que compare la sensibilidad de las técnicas o expongan los inconvenientes y las ventajas de las mismas para las diferentes situaciones de trabajo (Christie *et al.*, 2011).

Este estudio ha realizado una revisión bibliográfica sobre las técnicas coproparasitarias utilizadas en primates que ha permitido escoger alguno de los métodos de diagnóstico descrito y compararlos entre sí. La finalidad de esta evaluación ha sido obtener información de la diversidad de parásitos presentes en el santuario *Vervet Monkey Foundation* y conocer el (los) método(s) de mayor eficacia para su diagnóstico. Por último, se ha estudiado como ciertos factores pueden influir tanto en el diseño del protocolo como en la eficacia del diagnóstico.

Para ello se eligieron métodos de examen directo, de flotación y de sedimentación que fueron los más encontrados en la literatura. Durante la fase experimental se compararon dos procedimientos de homogenización y filtrado, así como distintos métodos de recuperación de formas parasitarias tanto en condiciones de laboratorio como de campo.

Los resultados obtenidos apoyan los estudios que combinan flotación y sedimentación para determinar la prevalencia de un parásito (Katagiri y Oliveira-Sequeira, 2010; Pomajbíková *et al.*, 2013) y exponen algunos de los factores a tener en cuenta a la hora de elegir una técnica, así como los riesgos de generalizar los resultados obtenidos por un autor con una técnica determinada. La utilización de distintos protocolos hace que sea imposible comparar los datos obtenidos por los autores y se recomienda intentar aunar los esfuerzos para estandarizar las técnicas utilizadas (Ashford y Reid, 2000; Gillespie, 2006; Ballweber *et al.*, 2014).

Summary

Most of the wild primates live in developing countries, meanwhile captive primates are kept all around the world (Ferrie *et al.*, 2014). Zoos, research facilities and sanctuaries are the main institutions that lodge these animals. Research is the main objective of research centres and one of the most important functions of zoos. On the contrary, sanctuaries are located mainly in the countries where primates live with the goal of rehabilitate back into the wild (Leendertz *et al.*, 2006). Primates in captivity live in enclosures that parasite reinfection is promoted without an adequate parasite control. So, knowledge about existent parasites in the collection and how to diagnose, prevent and treat them is essential for an optimal keeping. Knowing the parasite baseline of primates allows researchers to evaluate the parasite level and improve the knowledge about these diseases which affect captive and wild primates (Gillespie, 2006).

Parasite diversity depends on the distribution where the primate lives ; there are no evidences if there is a correlation between the characteristics of each primate and the parasites that affects it. It is also demonstrated that as most a primate species is studied more parasite are described on it, because of that, is essential to perform routinely coprological techniques to diagnose gastrointestinal parasites in primates (Nunn *et al.*, 2003).

Since the first coprological technique was described, several methods based on old techniques have been developed. For example, some qualitative techniques have become quantitative (Cringoli, 2006; Becker *et al.*, 2011). Aware of the well-known limitations of different research situations, some coprological techniques have been modified to avoid the mandatory use of specific laboratory equipment affording their use in the field and developing countries (Knopp *et al.*, 2009). Even though, studies to develop more sensitive techniques that do not need the difficult access or expensive equipment must be performed (Barda *et al.*, 2013).

No one of the primate coprological techniques described in the literature has been categorised as the gold standard. Nowadays a controversy exists about this issue. During the

last decade, comparative studies of coprological techniques have been performed, but, there is little information about several species and about the advantages and disadvantages of these techniques on the different application situations (Christie *et al.*, 2011).

In this study a literature review was performed to know which are the most used coprological techniques in primates to compare them. The goals of this study are to know the parasite diversity in Vervet Monkey Foundation vervet sanctuary and to elucidate which are the most appropriated techniques to diagnose these parasites. Finally, we also considered how different factors can modify the results.

For this, a direct smear, flotation and sedimentation techniques were chosen from the literature to do the comparison. During the experimental phase two methods of homogenization and filtration were compared, as well as different recovery techniques of parasitic forms in the field and laboratory situation.

Our results are supported by the studies that combine flotation and sedimentation techniques to determinate a parasite prevalence (Katagiri and Oliveira-Sequeira, 2010 ; Pomajbíková *et al.*, 2013). Also, our results show different factors to take into account to choose the techniques, as well as, the inappropriateness of comparing results from different authors and obtained with different techniques. The large variability between the techniques used in the literature make it impossible to compare results among studies; and is recommended to standardize the techniques in the future to avoid this problem (Ashford and Reid, 2000; Gillespie, 2006; Ballweber *et al.*, 2014).

Índice

Página

1. Introducción.....	25
1.1. El mono vervet.....	26
1.1.1. Taxonomía	27
1.1.2. Características morfológicas y etológicas	29
1.1.3. Distribución geográfica y hábitat	36
1.1.4. El mono vervet en cautividad	41
1.1.4.1. Centros de investigación	41
1.1.4.2. Parques zoológicos.....	43
1.1.4.3. Santuarios o centros de rehabilitación de fauna silvestre.....	44
1.1.5. El mono vervet en Sudáfrica y en la región de Limpopo en particular	47
1.2. Principales parásitos gastrointestinales en el mono vervet	51
1.2.1. Protozoos.....	51
1.2.1.1. <i>Entamoeba coli</i>	52
1.2.1.2. <i>Entamoeba histolytica/dispar</i>	52
1.2.1.3. <i>G. duodenalis</i>	54
1.2.1.4. <i>Isospora</i> spp.....	56
1.2.1.5. <i>Troglodytella abressarti</i>	57
1.2.1.6. <i>Balantidium coli</i>	58
1.2.1.7. <i>Chilomastix mesnili</i>	60
1.2.2. Helmintos.....	60
1.2.2.1. <i>Strongyloides</i> spp.....	61
1.2.2.2. <i>Protopirura</i> sp.	62
1.2.2.3. <i>Oesophagostomum</i> spp.	63
1.2.2.4. <i>Schistosoma mansoni</i>	65
1.2.2.5. <i>Ascaris lumbricoides/suum</i>	67
1.2.2.6. <i>Trichuris trichiura</i>	67
1.3. Técnicas de diagnóstico de parásitos gastrointestinales	69
1.3.1. Técnicas macroscópicas directas.....	69
1.3.2. Técnicas microscópicas directas.....	74
1.3.3. Métodos por flotación	76
1.3.4. Métodos por sedimentación	83
1.3.4.1. Sedimentación de etil-acetato-formalina o formalina-etilacetato.....	84
1.3.4.2. Sedimentación de Telemann.....	86
1.3.4.3. Kits comerciales de sedimentación.....	86

1.3.4.4. Técnica de Baermann	86
1.3.5. Otros métodos	87
1.3.5.1. Cultivo de heces	87
1.3.5.2. Obtención de elementos parasitarios en la necropsia	87
1.3.4.2.1. Método de decantación (Hendrix, 1999)	88
1.3.4.2.2. Método de filtrado (Gimard, 2001)	88
1.3.5.3. Métodos de diagnóstico molecular	89
2. Objetivos	91
3. Material y Métodos	95
3.1. Análisis bibliométrico.....	98
3.1.1. Acotación de la búsqueda	98
3.1.1.1. Delimitación del área de estudio	98
3.1.1.2. Delimitación del periodo de estudio.....	98
3.1.1.3. Elección del buscador y bases de datos	98
3.1.1.4. Delimitación de la naturaleza de las publicaciones	99
3.1.1.4. Delimitación de los parámetros para la búsqueda	99
3.1.2. Selección de la muestra	100
3.1.3. Recopilación, procesado de la muestra y análisis de los resultados	100
3.1.3.1. Recopilación de la muestra	100
3.1.3.2. Tratamiento de los datos y análisis de los resultados	101
3.2. Fase experimental	102
3.2.1. Materiales necesarios para la obtención y procesado de las muestras	102
3.2.1.1. Elementos de protección	102
3.2.1.2. Equipos y materiales fungibles.....	102
3.2.1.3. Soluciones y reactivos	104
3.2.2. Selección de la muestra	106
3.2.2.1. Lugar y especies.....	106
3.2.2.2. Instalaciones	107
3.2.2.3. Animales	108
3.2.2.4. Muestra de heces	109
3.2.3. Elección del método de toma de muestras de heces	109
3.2.4. Recogida de las muestras fecales.....	110
3.2.5. Tiempo de conservación de las muestras de heces	112
3.2.6. Hoja de registro	112
3.2.7. Procesado de las muestras para la contaminación experimental	114
3.2.7.1. Preparación de las muestras fecales colectivas.....	114
3.2.7.2. Origen del material contaminante	114

3.2.7.3. Preparación de las soluciones contaminantes	115
3.2.7.4. Infección experimental de las muestras fecales colectivas	116
3.2.8. Métodos de homogenización y filtrado de las heces.....	117
3.2.8.1. Método con mortero y gasas	118
3.2.8.2. Método con Fill-flotac®	118
3.2.9. Métodos de recuperación de formas parasitarias en heces	119
3.2.9.1. Examen directo con y sin lugol.....	119
3.2.9.2. Concentración por flotación con tubo de ensayo (Gillespie, 2006).....	120
3.2.9.3. Concentración por flotación con cilindro de Ovatecor® modificada	121
3.2.9.4. Concentración por flotación con Mini-flotac® (Barda et al., 2013).....	122
3.2.9.5. Concentración por sedimentación de etil-acetato-formalina (Ash y Oriel, 1991)	123
3.2.9.6. Sedimentación por gravedad (Gillespie, 2006).....	124
3.2.9.7. Sedimentación con el kit comercial Uranotest copro®	125
3.2.10. Procesado de las muestras	126
3.2.10.1. Etapa 1. Comparación de dos procedimientos de homogenización y filtrado	126
3.2.10.2. Etapa 2. Evaluación de métodos de recuperación de formas parasitarias con heces contaminadas experimentalmente.....	127
3.2.10.3. Etapa 3. Evaluación de métodos de recuperación de formas parasitarias en una situación real de campo	128
3.2.11. Análisis de los resultados.....	129
3.2.12. Bioseguridad	130
3.2.13. Bienestar animal	131
4. Resultados.....	133
4.1 Revisión bibliográfica.....	135
4.1.1. Distribución de primeros autores en función de la cantidad de artículos publicados	135
4.1.2. Revistas con publicaciones seleccionadas.....	136
4.1.3. Evolución de los artículos a lo largo del periodo de estudio.	137
4.1.4. Publicaciones sobre técnicas coproparasitarias.....	138
4.1.5. Publicaciones acerca de las familias de PNH.....	140
4.1.6. Resultado de parásitos identificados	140
4.1.7. Publicaciones acerca del modo de alojamiento de los PNH.....	142
4.2. Fase experimental	143
4.2.1. Puesta a punto de las técnicas de homogenización y filtrado a partir de heces inoculadas experimentalmente	143
4.2.2. Puesta a punto de las técnicas de recuperación de formas parasitarias a partir de heces inoculadas experimentalmente	152
4.2.2.1 Recuperación de las formas parasitarias y muestras positivas de formas parasitarias	152

4.2.2.2. Evaluación de recuperación de huevos de <i>P. muricola</i> a diferentes concentraciones	157
4.2.2.3. Evaluación de soluciones de flotación a partir de heces inoculadas experimentalmente	158
4.2.2.4 Evaluación de los distintos recipientes de flotación a partir de heces inoculadas experimentalmente	159
4.2.3. Técnicas de recuperación de formas parasitarias en un estudio de campo	160
4.2.3.1. Formas parasitarias encontradas	160
4.2.3.2. Evaluación de soluciones de flotación a partir de heces de mono vervet.	166
4.2.3.3. Evaluación de los distintos recipientes de flotación a partir de heces de mono vervet	166
4.2.3.4. Comparación Uranotest copro® realizado en los días 0, 10 y 20	167
5. Discusión	169
5.1. Homogenización y filtrado.....	174
5.2. Examen directo	177
5.3. Flotación	179
5.3.1. Soluciones de flotación.....	179
5.3.2. Recipientes de flotación	183
5.4. Sedimentación	185
5.5. Diagnóstico coproparasitario en mono vervet	187
6. Conclusiones	193
7. Bibliografía	197
8. Comunicaciones a congresos	223

Índice de figuras

	Página
Figura 1. Clasificación actual de <i>C. pygerythrus</i>	28
Figura 2. Cráneo de <i>C. pygerythrus</i>	31
Figura 3. Dentición de <i>C. pygerythrus</i> con un año y cuatro meses y con ocho años de edad.....	31
Figura 4. Detalle de la región genital de un macho de <i>C. pygerythrus</i>	33
Figura 5. Patrones de coloración de la cara.	34
Figura 6. Principales depredadores del mono vervet: águila marcial, leopardo, Pitón de seba.	36
Figura 7. Distribución de algunas especies del género <i>Chlorocebus</i> en África (IUCN, 2016).	38
Figura 8. Mapa de Sudáfrica y países fronterizos (Universidad de Texas, 2016).....	48
Figura 9. Esquema representativo de <i>Entamoeba coli</i> (Flynn, 2007).	52
Figura 10. Esquema representativo de <i>Entamoeba histolytica</i> (Flynn, 2007).	53
Figura 11. Esquema representativo de <i>G. duodenalis</i> (Bogitsh et al., 2013).	55
Figura 12. Esquema representativo de ooquiste esporulado de <i>Isospora arctopithecii</i>	56
Figura 13. Esquema representativo del trofozoíto de <i>Troglodytella abressarti</i> (Kudo, 1966).	57
Figura 14. Esquema representativo de la morfología del trofozoíto y del quiste de <i>B. coli</i>	58
Figura 15. Huevo de <i>Strongyloides fülleborni</i> (Flynn, 2007).....	61
Figura 16. Huevo de <i>P. muricola</i>	63
Figura 17. Huevo de <i>Oesophagostomum</i> sp. (Flynn, 2007).	64
Figura 18. Morfología y tamaño de huevo de <i>Schistosoma mansoni</i> (Flynn, 2007).....	66
Figura 19. Huevo de <i>Ascaris lumbricoides</i> (Taylor et al., 2016).	67
Figura 20. Kit de flotación Ovatecor®	82
Figura 21. Sedimentación con etil-acetato.	85
Figura 22. Mascarilla y gafas de seguridad.	102
Figura 23. Detalle del microscopio.....	102
Figura 24. Detalle de la centrífuga utilizada.	103
Figura 25. Detalle Ovatecor® y de la cámara de Mini-flotac®	103
Figura 26. Mangabey de coronilla blanca y cercopiteco de brazza.....	106
Figura 27. Imagen de una jaula satélite y parte de una instalación central de <i>Vervet Monkey Foundation</i>	107
Figura 28. Hoja de registro.	113
Figura 29. Distribución de los autores en función de los artículos publicados.	135
Figura 30. Porcentaje de los artículos por revistas.	137
Figura 31. Número de artículos publicados entre 1974-2015.	137
Figura 32. Frecuencia de las familias estudiadas.	140
Figura 33. Proporción de alojamientos de PNH encontrados.	142
Figura 34. Recuperación de <i>B. coli</i> para mangabey de coronilla blanca y para cercopiteco de brazza.....	147
Figura 35. Recuperación de <i>G. duodenalis</i> para mangabey y cercopiteco.	148
Figura 36. Recuperación de <i>P. muricola</i> para mangabey y para cercopiteco.	149
Figura 37. Recuperación de las formas parasitarias para mangabey y para cercopiteco.....	150
Figura 38. Porcentaje de muestras positivas a helmintos con las distintas técnicas empleadas.	153
Figura 39. Porcentaje de recuperación de formas parasitarias de helmintos con las distintas técnicas empleadas.	153
Figura 40. Porcentaje de muestras positivas y porcentaje de recuperación de formas parasitarias de protozoos.	155
Figura 41. Porcentaje de muestras positivas para cada parásito por técnicas y por parásitos.	162

Índice de tablas

	Página
Tabla 1. Escala de Bristol adaptada a las heces de <i>C. pygerythrus</i>	71
Tabla 2. Tipos de coloración del almidón en presencia de lugol.....	75
Tabla 3. Distribución de los vervets por instalación y sexo.	111
Tabla 4. Carga parasitaria por gramo de heces.	116
Tabla 5. Exámenes coprológicos realizados.....	127
Tabla 6. Resumen de los exámenes coprológicos realizados.....	128
Tabla 7. Resumen de los exámenes coprológicos realizados.....	129
Tabla 8. Procedimientos de primeros auxilios.....	131
Tabla 9. Revistas y artículos publicados.....	136
Tabla 10. Métodos diagnósticos encontrados.....	138
Tabla 11. Procedimientos citados.....	139
Tabla 12. Porcentaje de familias de helmintos estudiadas.....	141
Tabla 13. Porcentaje de familias de protozoos estudiadas.....	142
Tabla 14. Resultados de recuperación de <i>B. coli</i> a partir de heces de mangabey.....	144
Tabla 15. Resultados de recuperación de <i>B. coli</i> a partir de heces de cercopiteco.....	144
Tabla 16. Resultados de recuperación de <i>G. duodenalis</i> a partir de heces de magabey.....	145
Tabla 17. Resultados de recuperación de <i>G. duodenalis</i> a partir de heces de cercopiteco.....	145
Tabla 18. Resultados de recuperación de <i>P. muricola</i> a partir de heces de mangabey.....	146
Tabla 19. Resultados de recuperación de <i>P. muricola</i> a partir de heces de cercopiteco.....	146
Tabla 20. Comparación de Fill-flotac® y mortero y gasas utilizando los p-valores de los tests de Wilcoxon y Mc Nemar.....	151
Tabla 21. Comparación de la recuperación de <i>Ancylostoma</i> spp. con las distintas técnicas empleadas, utilizando los p-valores obtenidos del análisis estadístico.....	152
Tabla 22. Comparación de la recuperación de <i>B. coli</i> utilizando los p-valores obtenidos del análisis estadístico.....	156
Tabla 23. Comparación de la recuperación de <i>G. duodenalis</i> utilizando los p-valores obtenidos con el análisis estadístico.....	157
Tabla 24. Porcentaje de muestras positivas y de recuperación de huevos de <i>P. muricola</i>	158
Tabla 25. Comparación de soluciones de flotación para cada parásito.....	159
Tabla 26. Comparación de tres recipientes de flotación utilizando el p-valor del análisis estadístico.....	160
Tabla 27. Número y porcentaje de muestras positivas a cada parásito.....	161
Tabla 28. Parásitos identificados por examen directo con y sin lugol.....	163
Tabla 29. Parásitos identificados por flotación con cloruro sódico.....	164
Tabla 30. Parásitos identificados por flotación con sulfato de zinc.....	165
Tabla 31. Parásitos identificados por sedimentación.....	166
Tabla 32. Comparación de soluciones de flotación.....	166
Tabla 33. Comparación de dos recipientes de flotación.....	167
Tabla 34. Resultados del grado de concordancia obtenido por Uranotest copro® sin conservación y con 10 y 20 días de conservación.....	168

Símbolos y abreviaturas

%	Porcentaje
<	Inferior
>	Superior
®	Marca registrada
µm	Micrómetro
µL	Microlitro
AAZPA	Asociación americana de parques zoológicos y acuarios
ADN	Ácido desoxirribonucleico
APE	Primates pertenecientes a la superfamilia Hominoidea
CITES	Convención sobre el comercio internacional de especies amenazadas de fauna y flora silvestre
cm	Centímetro
et al.,	Et alii (y otros)
etc	Etcétera
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
g	Gramo
hpg	Huevos por gramo
IFI	Inmunofluorescencia directa
IUCN	Unión internacional para la conservación de la naturaleza
kg	Kilogramo
km ²	Kilómetro cuadrado
mL	Mililitro
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PNH	Primate No Humano
qpg	Quistes por gramo
rpm	Revoluciones por minuto
SG	Gravedad específica
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SIV	Virus de Inmunodeficiencia en Simios
sp	Especie
spp	Especies
SSP	Programa de Supervivencia de Especies Específicas
VMF	<i>Vervet Monkey Foundation</i>
Vs	<i>Versus</i>
X	Aumentos

1. Introducción

1.1. El mono vervet

Este apartado trata las generalidades de esta especie. En primer lugar, se explican los cambios que ha sufrido en su nomenclatura hasta llegar a la actual. A continuación, se detallan algunas de sus peculiaridades morfológicas y etológicas más características que le han permitido adaptarse a diferentes hábitats en los que se encuentra. Por último, se exponen los distintos centros que suelen albergar esta especie y cuál es la finalidad de mantenerla en cautividad.

1.1.1. Taxonomía

El origen de la denominación del orden Primates se remonta a la ordenación taxonómica realizada por Linneo en 1758. Se basó en la semejanza con el ser humano para clasificar los mamíferos en varios grupos. Los más semejantes al hombre se denominaron Primates, a continuación, se encontraban los Secundates y por último los Terciates.

Se cree que los primeros primates pudieron existir hace 65 millones de años a finales del Cretácico, divergiendo en catarrinos (monos del viejo mundo) y platirrininos (monos del nuevo mundo) hace unos 35 millones de años (Dunbar y Barrett, 2000; Williams *et al.*, 2010). Actualmente el infraorden Catarrhini forma parte del suborden Haplorrhini y se compone, entre otras, de la familia Cercopithecidae que divergió de la Hominidae hace 23 millones de años (Goodman *et al.*, 1998). Esta familia se clasifica en distintas subfamilias como la Cercopithecinae formada por numerosas especies con distinto estado de conservación (Hacker *et al.*, 1998) como los babuinos (género *Papio*), los macacos (género *Macaca*) y los cercopitecos (género *Cercopithecus*) (Dunbar y Barrett, 2000).

El género *Cercopithecus* engloba la mayor parte de los primates autóctonos de África subsahariana (Grubb *et al.*, 2003). En 1966, la especie *Cercopithecus aethiops*, se incluía dentro de este género junto con otras 66 especies. Ésta, a su vez, se dividía en distintas subespecies dependiendo de la localización geográfica (Rowell, 1970), siendo *Cercopithecus aethiops pygerythrus* la subespecie distribuida por Sudáfrica.

Diversos cambios en la ordenación taxonómica hacen que, en 1981, se encuentre catalogada como la especie *Cercopithecus pygerythrus*, estando aún incluida dentro del mismo género (Fincham y Seier, 1981). En 1993, del género *Cercopithecus* se escinden cinco de las 66 especies para constituir el nuevo género *Chlorocebus*. Formando este género encontramos la especie *Cercopithecus pygerythrus* que pasa a denominarse *Chlorocebus pygerythrus* (Groves, 2001; Wilson y Reeder, 2005).

Existe un consenso creciente acerca de que *Chlorocebus* constituya un género independiente de *Cercopithecus*, pero aún no se ha resuelto la controversia morfológica entre las cinco especies principales que lo forman ni sus subespecies. Los avances en técnicas moleculares, en secuenciación de ADN y próximos estudios genéticos podrían volver a cambiar su clasificación actual (figura 1) y deberían resolver definitivamente esta discrepancia (Lernould, 1988; Groves, 2001; Grubb *et al.*, 2003; Jasinska *et al.*, 2013).

Reino Animalia
Filo Chordata
Clase Mammalia
Orden Primates
Suborden Haplorrhini
Infraorden Catarrhini
Familia Cercopithecidae
Subfamilia Cercopithecinae
Género <i>Cercopithecus</i>
Género <i>Chlorocebus</i>
Especie <i>Chlorocebus pygerythrus</i>
Subespecie <i>Chlorocebus pygerythrus excubitor</i>
Subespecie <i>Chlorocebus pygerythrus hilgerti</i>
Subespecie <i>Chlorocebus pygerythrus nesiotes</i>
Subespecie <i>Chlorocebus pygerythrus pygerythrus</i>
Subespecie <i>Chlorocebus pygerythrus rufoviridis</i>

Figura 1. Clasificación actual de *C. pygerythrus*.

La forma de nombrar comúnmente la especie *C. pygerythrus* está llena de desacuerdos. En la mayoría de la literatura reciente, aparece nombrado como *vervet*, aunque también es posible encontrarlo como *cercopiteco verde* o *mono (de) vervet*. No se debe confundir la denominación de *mono verde* que hace referencia a la especie *C. sabaesus* (Jasinska *et al.*, 2013).

Dependiendo de la formación académica del autor la palabra "vervet" tiene un concepto distinto pudiendo llevar a la confusión del lector. En el área de conocimiento de los primatólogos, cuando se utiliza el término vervet, no se usa para referirse a una única especie, sino que engloba todas las que forman el género *Chlorocebus*. Por el contrario, en el área de conocimiento de la investigación en general, los inmunólogos y los virólogos utilizan el concepto de "vervet" para referirse a una única especie, *C. pygerythrus*, mientras que usan el término African Green Monkey cuya traducción literal sería mono verde africano, para referirse al género completo *Chlorocebus* (Jasinska *et al.*, 2013).

1.1.2. Características morfológicas y etológicas

La especiación alopátrida se da por la separación física de una población inicial en dos o más grupos. Como consecuencia del aislamiento reproductivo y dependiendo del nuevo ambiente al que llegan los animales, se ven favorecidas ciertas características morfológicas y determinados comportamientos. Además, existe la posibilidad de hibridación con otras especies, creando grupos de animales con características distintas entre ellos y con la población inicial (Templeton *et al.*, 1986). A lo largo de la historia evolutiva de los primates las poblaciones se han ido dispersando por el mundo y han formado poblaciones con fenotipos y comportamientos muy variables. Pese a que existen ciertas características comunes a casi todas las especies de primates, la diversidad dentro del orden sorprende por su heterogeneidad en cuanto a su morfología, ecología y comportamiento. Se compone de especies como el lémur ratón pigmeo (*Micricebus myoxinus*) con 30 g de peso y tamaño corporal de 12 cm (sin la cola) hasta el gorila (*Gorilla gorilla*) con 1,75 m y más de 150 kg de peso (Boyd y Silk, 2001).

Generalmente, en todas las especies de primates, las manos y los pies son pentadáctilos terminados por almohadillas táctiles cubiertas por uñas planas. Los dedos presentan gran movilidad, permitiendo la flexión total. Los pulgares oponibles principalmente en manos les dotan de un excelente agarre, lo que les ayuda a trepar a los árboles, a desplazarse entre sus ramas y a utilizar herramientas. El centro de gravedad está caudal por lo que son las extremidades posteriores las que dominan la locomoción. Además, los pies plantígrados, les permiten erguirse sobre sus extremidades posteriores e incluso

caminar en bipedismo, aunque en el caso de los monos vervets son considerados cuadrúpedos (Fedigan y Fedigan, 1988; Boyd y Silk, 2001).

Todas las especies del género *Chlorocebus* tienen el tamaño de un gato doméstico y presentan dimorfismo sexual. Los machos son más corpulentos que las hembras. El peso medio de un macho adulto es de 6,4 kg (4,3 – 6,6 kg) con una longitud corporal de unos 42 a 60 cm, frente a los 3,5 kg (2,9 – 5,8 kg) de las hembras y a los 30 – 50 cm de longitud corporal (Zihlman y Underwood, 2013).

A diferencia de los simios, la mayoría de los monos tienen una cola larga. En el caso de este género, no es prensil, pero les dota de cierto agarre y les sirve para estabilizarse. Puede tener una longitud mayor a la corporal, llegando a alcanzar los 70 cm (Cheney y Seyfarth, 1990). La coloración de la piel es azulada en el abdomen mientras que es oscura en la zona distal de las extremidades y la cara. El pelaje es una mezcla de pelos marrones, amarillos, grises y verdes con la punta gris claro que dan un color global de amarillento a verdoso. La parte dorsal del animal es más oscura mientras que las zonas ventrales son más blancas. Las extremidades son largas en relación con el cuerpo (Groves, 2001).

En comparación con otros mamíferos de tamaño similar, los primates tienen un mayor volumen cerebral. En la cara anterior de la cabeza, existen unas grandes órbitas redondeadas y protegidas por un saliente óseo, que albergan los ojos (figura 2). Esta disposición de los globos oculares, les dota de una visión estereoscópica. La visión es en color. Este sentido parece haber ganado importancia, en detrimento del olfato. El hocico es corto y el sentido del olfato tiene menor importancia en los primates diurnos como *C. pygerythrus*. La orientación de las narinas permite distinguir dos grandes grupos de primates no humanos (PNH), los platirrininos (hacia los lados) y los catarrininos (hacia abajo) que incluye al género *Chlorocebus*. Los vervets, al igual que otros miembros de la superfamilia Cercopithecoidea presenta abazones que les permiten almacenar alimentos para consumirlos posteriormente (Abee *et al.*, 2012). La cavidad bucal también esconde la dentición (figura 3). Entre las diferentes especies de PNH hay un máximo de dos incisivos, un canino, tres premolares y tres molares poco especializados por cada hemimandíbula y hemimaxilar (Boyd y Silk, 2001). En el caso del género *Chlorocebus* tienen por cada

hemimaxilar y cada hemimandíbula dos incisivos, un canino, dos premolares y tres molares (Wolfe-Coote, 2005).



Figura 2. Cráneo de *C. pygerythrus*.

Durante la primera semana de vida aparecen los incisivos inferiores, mientras que los incisivos centrales superiores aparecen durante la segunda y en la tercera semana de vida erupcionan los incisivos laterales. Al mes y medio de vida hacen aparición los caninos, tanto inferiores como superiores. En la mandíbula y el maxilar, aparecen los premolares entre los dos meses y dos meses y medio. Por último, crecen los molares, en primer lugar, los inferiores (113 – 119 días) y en último los superiores (113 – 140 días). En los meses siguientes los dientes deciduos irán cayéndose y dejarán paso a las piezas dentales permanentes. El primer molar permanente aparece a los 14 meses de edad (Seier, 1986).

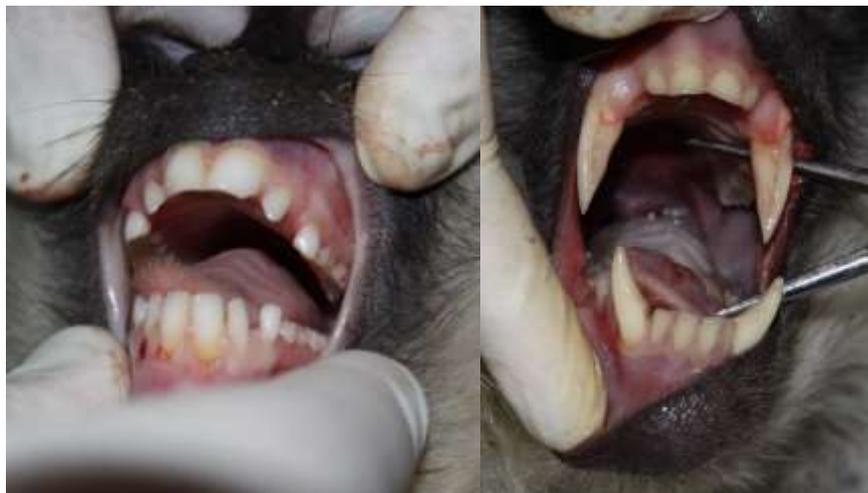


Figura 3. Dentición de *C. pygerythrus* con un año y cuatro meses (izquierda) y con ocho años de edad (derecha).

Vive en grupos sociales compuesto por varios machos y varias hembras, el ratio macho-hembra es de 1:1 y se establece una jerarquía social. El número de individuos varía desde pequeños grupos formados por apenas cinco monos a grandes grupos compuestos por más de 75 integrantes (Struhsaker, 1967b; Dunbar, 1974; Isbell *et al.*, 1993; Turner *et al.*, 1997; Hacker *et al.*, 1998). Al igual que en otras especies, en los vervets, se ha observado que a medida que aumenta el tamaño del grupo, el tiempo que cada miembro dedica a la vigilancia disminuye. Por el contrario, aumenta la cantidad de comida ingerida. Pero, un número excesivo de individuos hace que la cantidad de recursos para el grupo sea menor. Cada integrante ingerirá menor cantidad de alimento y aumentará el tiempo de búsqueda. El tamaño "óptimo" del grupo parece ser determinado por las hembras que regulan el número de machos del grupo permitiéndoles o no la cópula (Baldellou y Henzi, 1992).

La mayoría de las hembras permanecen siempre en el grupo de nacimiento. Por el contrario, los machos abandonan el suyo al alcanzar la madurez sexual. A lo largo de su vida, los machos pueden volver a cambiar varias veces de grupo. Este comportamiento migratorio es propio también de otros monos del viejo mundo (Pusey, 1987). Lo más habitual es que se intenten unir a comunidades que han aceptado previamente otros machos de su grupo (Cheney y Seyfarth, 1983a). Durante el periodo de intercambio, la mortalidad es superior en machos que en hembras. Al alejarse de su grupo original, algunos de los machos son cazados por depredadores, otros son atacados por los miembros del nuevo grupo y otros desaparecen sin dejar rastro (Cheney y Seyfarth, 1983b).

Las hembras de *C. pygerythrus* no presentan hinchazón perineal cíclico como los babuinos y la menstruación es escasa (Seier *et al.*, 1991), por lo que es difícil valorar externamente el momento del ciclo menstrual, saber si la hembra es fértil o si ha llegado a la menopausia (Jasinska *et al.*, 2013). Tampoco se aprecia ningún cambio físico ni de comportamiento que facilite dicha información (Andelman, 1985) por lo que la única forma de conocer la fase del ciclo ovárico es con una citología vaginal (Wolfe-Coote, 2005). La duración media de su ciclo menstrual es de 33 días mostrando a mitad del ciclo un pico de leucocitosis probablemente asociado a la ovulación (Rowell, 1970). La duración de la fase lútea es de 18 días (Wolfe-Coote, 2005), y la fase menstrual de 2,5-5 días (Seier *et al.*, 1991; Wolfe-Coote, 2005; Chomba *et al.*, 2012).

Los machos son característicos por poseer un escroto de color azul y un pene rojo (Rowell, 1970; Fedigan y Fedigan, 1988). Pueden tener erecciones voluntarias utilizadas como comportamiento intimidatorio para otros machos (figura 4). La llegada a la madurez sexual depende de las características del ambiente, aunque los machos suelen ser más precoces que las hembras (Cheney y Seyfarth, 1987). En cautividad, los machos suelen ser considerados sexualmente maduros a los 46 meses de edad (Hiyaoka y Cho, 1990).



Figura 4. Detalle de la región genital de un macho de *C. pygerythrus*.

Los machos de mayor rango copulan con mayor frecuencia y con mayor cantidad de hembras que los de bajo rango. Durante la gestación, las hembras aceptan menos montas, disminuyendo la frecuencia de cópula a la mitad (Rowell, 1970). Las hembras de menor rango social, tienen una tasa de gestación inferior y un mayor porcentaje de muerte fetal o neonatal (Fairbanks y McGuire, 1984).

La gestación dura entre 157 y 167 días, tras la cual normalmente nace una única cría con menos de 400 g de peso (machos 364 g y hembras 352 g aproximadamente), un pelaje oscuro y cara rosada (Lee y Else, 1986; Wolfe-Coote, 2005).

En los vervets en cautividad los nacimientos se producen durante todo el año (Wolfe-Coote, 2005), pero los nacimientos de los silvestres de Sudáfrica se concentran entre los meses de enero y junio. El parto suele ocurrir en las horas de menor actividad, es decir entre el anochecer y el amanecer. Suele durar entre 15 y 20 minutos (Seier, 1986). El ratio de nacimientos macho/hembra es de 1:1 (Rowell, 1970; Cheney y Seyfarth, 1987).

La esperanza de vida en vervets silvestres es difícil de determinar por los altos índices de depredación. Se han visto hembras silvestres que han llegado hasta los 17 años (Cheney y Seyfarth, 1990). Pero en cautividad se han observado serios problemas de salud a partir de los 11 – 12 años y esa edad sea probablemente su esperanza de vida (Fairbanks y McGuire, 1986).

Durante los dos primeros meses de vida, el recién nacido pasa más del 75% del tiempo agarrado a la zona ventral de la madre que le proporciona protección, calor y alimento. Durante este periodo el resto del grupo presta grandes atenciones hacia el nuevo miembro. A partir del segundo mes de vida, disminuye el tiempo agarrado a su madre, siendo prácticamente anecdótico a partir del cuarto mes de vida. También se reduce la atención del resto del grupo hacia la cría. El tercer mes de vida está marcado por el comienzo del destete, el pequeño que ya ha empezado a ingerir alimentos sólidos y a explorar su entorno social y físico y empieza a independizarse progresivamente de su madre (Struhsaker, 1967b). La hembra de vervet producirá leche entre tres y seis meses (Seier, 1986).

Al igual que otras especies de primates, presentan distintos patrones de coloración a lo largo de la vida (figura 5). Los cambios más patentes y predecibles se dan en la cara, la cola y la espalda permitiendo realizar una estimación de la edad a distancia. Al nacer y hasta el mes de vida, la cara está desnuda y tiene una coloración rosada. Al mes y medio de edad empieza a pigmentarse y la cara se oscurece; siendo a los tres meses de vida prácticamente negra a excepción de los párpados y la boca. Los párpados se mantienen blancos durante toda la vida y en las mejillas comienzan a destacar penachos de pelo (Struhsaker, 1967b).



Figura 5. Patrones de coloración de la cara.

El estómago se sitúa perpendicular a la columna vertebral con el fundus a la izquierda y el antro pilórico a la derecha ventralmente a la curvatura mayor del estómago. El duodeno cursa desde la parte ventral del píloro y desciende en sentido caudo-dorsal al colon ascendente. El yeyuno se encuentra centralmente dentro del espacio peritoneal, medial al ciego y caudal al colon ascendente y transverso, así como a lo largo del lateral izquierdo del abdomen y caudal al riñón izquierdo. El íleon está ubicado craneal al ciego y caudo-medial al colon ascendente. El ciego está ubicado en el lado derecho del abdomen y caudal a la unión ileocecal (Amory *et al.*, 2013).

En cuanto a la flora bacteriana digestiva del mono vervet, esta es escasa en el estómago. En el intestino delgado, se observa población bacteriana ampliamente distribuida. En el íleon junto con la flora bacteriana, se observan láminas filamentosas unidas a la superficie del epitelio. En el ciego las bacterias se encuentran en acinos, parte de las bacterias están libres en el lumen y otra parte unida al epitelio. En el colon solo se encuentran bacterias en el lumen que suelen estar atrapadas con restos de heces en las criptas (Bruorton *et al.*, 1991).

Como otras especies de cercopitecos, los monos vervets emiten distintas vocalizaciones cuando se acerca un depredador al grupo. En concreto, emiten tres tipos de llamadas de alarma diferentes que avisan de la presencia de águilas, felinos o serpientes. Las respuestas de los individuos son diferentes en función de la llamada de alarma que escuchen. Por ejemplo, la presencia de un águila marcial (*Polemaetus bellicosus*), desencadena el grito que avisa de la presencia de rapaces. Ante esta vocalización, la estrategia de huida del grupo, es adentrarse en el follaje de los árboles o esconderse en arbustos. La segunda llamada de peligro, se emite al detectar un felino, como el leopardo (*Panthera pardus*), provocando que sus congéneres se apresuren a trepar rápidamente a la parte más alta de los árboles. Por último, el grito emitido al ver una serpiente, como la pitón de seba (*Python sebae*), no desencadena una rápida huida como las dos anteriores (figura 6). En este último caso, la respuesta generada es la incorporación en bipedismo de los vervets dirigiendo su mirada hacia el suelo como para localizar la ubicación del reptil. Las madres castigan a las crías si utilizan las llamadas de alarmas en situaciones donde no existe

peligro. Por ejemplo, si avisan de presencia de serpientes al avistar un ciempiés (Cheney y Seyfarth, 1990).



Figura 6. Principales depredadores del mono vervet: águila marcial (izquierda), leopardo (centro), Pitón de seba (derecha).

1.1.3. Distribución geográfica y hábitat

La mayoría de los primates se encuentran distribuidos por África, América y Asia. Viven principalmente en selvas tropicales y subtropicales, teniendo grandes aptitudes para la vida arbórea, aunque existen especies como el macaco de Gibraltar (*Macaca sylvanus*) que rompen con esta regla. Se trata de la única especie de vida silvestre en Europa. Está distribuida por el norte de África y el sur de Europa (Peñón de Gibraltar y sur de la Península Ibérica) y, además, prefiere vivir en el suelo alejado de las selvas tropicales.

Los platirrinos se encuentran distribuidos por Centroamérica y Sudamérica, a diferencia de los catarrinos que se localizan en Asia y África. Existen excepciones, como los humanos que tienen una amplia dispersión, ocupando casi la totalidad del planeta.

La situación política en diversas zonas del este y oeste de África ha provocado que censar las especies del género *Chlorocebus* haya sido muy difícil, pero su distribución está bien definida (Zinner *et al.*, 2002). El área de distribución es un hábitat que tiene que ser compatible con las exigencias necesarias para garantizar la supervivencia de los animales; siendo el resultado de los mecanismos de dispersión desde el lugar de origen del taxón. La población del género *Chlorocebus* ocupa una gran variedad de países africanos como Ruanda, Burundi, Lesoto, Zimbabue, Suazilandia, Malawi, Mozambique y Sudáfrica (Wolfe-

Coote, 2005). Se trata de un tipo de área disyunta donde el intercambio genético entre especies es imposible a excepción de algunas zonas de hibridación (Groves, 2001b). Un ejemplo de aislamiento genético es lo que sucede entre las poblaciones de *C. sabaues* distribuidas por África (Groves, 2001) y las presentes en el caribe (Struhsaker, 1967a; Barrett *et al.*, 2005). Se cree que las poblaciones de las islas de Saint Kitts, Nevis y Barbados llegaron cruzando el atlántico en barcos de esclavos a finales del siglo XVII (Turner, 1989; Van der Kuyl *et al.*, 1996). Viajaron para ser vendidas, pero algunas acabaron siendo liberadas. Se adaptaron tan bien al nuevo hábitat que se convirtió en una especie invasora y ha llegado a ser considerada como peste (Fedigan y Fedigan, 1988; Boulton *et al.*, 1996).

C. aethiops se encuentra en Sudán, al este de Nilo, el sur de Egipto, Eritrea y Etiopía. En Etiopía, pero únicamente en las montañas, se encuentra *C. djamdjamensis*. *C. tantalus* se localiza en Sudán, Uganda, Kenia (alrededor del lago Turkana) y se extiende a Togo, Benín, Nigeria, Níger, Chad, Camerún, Guinea Ecuatorial, República Central Africana, Congo, Ghana (solo en el río Volta) y se hibrida con *C. rufoviridis* en Uganda. *C. cynosuros* se ha descrito en Namibia, Angola, el sur de República Democrática del Congo, Botsuana y Zambia. *C. pygerythrus* ocupa desde el Valle del Rift en Etiopía, Somalia, Kenia, Tanzania, Sudáfrica y el este de Uganda (figura 7). En Etiopía se hibrida con *C. aethiops* y con *C. hilgerti* (Groves, 2001; Gonedelé *et al.*, 2010).

Esta gran distribución es posible gracias a la gran adaptabilidad de estas especies. Toleran una gran variedad de hábitats (Grobler *et al.*, 2006). Pueden vivir desde en selvas húmedas hasta zonas semidesérticas (sabanas y montes abiertos), desde el nivel del mar hasta altitudes de 450 metros sobre el nivel del mar (Wolfheim, 1983; Fedigan *et al.*, 1984; Fedigan y Fedigan, 1988). *Chlorocebus* está presente en la mayoría de los ecosistemas de África subsahariana a excepción de las zonas desérticas y las selvas tropicales. Pese a que varias especies habitan los bordes de las selvas, como la selva del Congo, raramente se les encuentra en sus profundidades (Wolfheim, 1983; Lernould, 1988). Parecen preferir zonas arboladas, pero no muy densas, selvas de árboles de hoja caduca o de arbustos (Nakagawa, 1999). Su amplia distribución y su gran presencia por las sabanas hace que muchas tribus remotas tengan nombres específicos para estas especies (Cheney y Seyfarth, 1990) y que posiblemente sea el género de primate no humano más numeroso de África y del mundo

(Wolfheim, 1983; Cheney y Seyfarth, 1990; Boyd y Silk, 2001; Grobler *et al.*, 2006; Jasinska *et al.*, 2013).

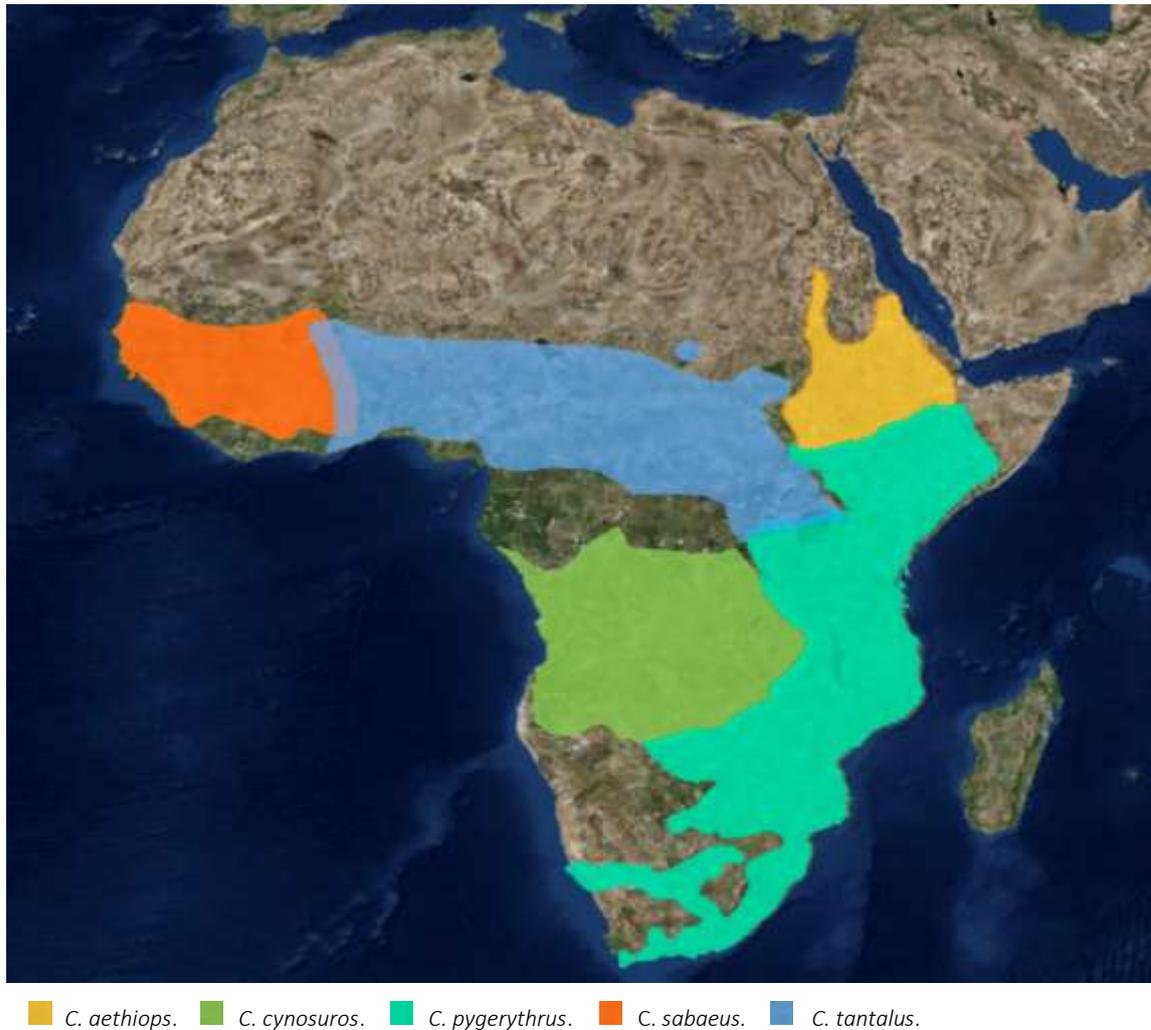


Figura 7. Distribución de algunas especies del género *Chlorocebus* en África (IUCN, 2016).

Algunas especies de primates son solitarias pero la mayoría son gregarias como las especies del género *Chlorocebus*. Normalmente viajan, se alimentan y duermen en grupo sobre una zona concreta, denominada área de campeo (Harrison, 1983b). Ésta suele ser bastante constante a lo largo del tiempo y contiene los recursos necesarios para satisfacer las necesidades de todos los integrantes de un grupo (Boyd y Silk, 2001).

Las características físicas del territorio determinan en gran medida las estrategias adoptadas por los animales. Dedicar una gran parte de su tiempo a la alimentación. Es vital encontrar, procesar y consumir alimento evitando ser devorado. Por ello, el territorio se divide en espacios con utilidades específicas. Se distinguen zonas fijas de alimentación y

zonas de descanso. El tipo y la cantidad de alimentos son variables lo que influye, al igual que los depredadores, en el valor del territorio. Los principales depredadores son serpientes, rapaces, felinos y humanos (Kavanagh, 1981; Harrison, 1983a; Jasinska *et al.*, 2013).

El vervet es un primate omnívoro oportunista, capaz de encontrar comida suficiente hasta en los ambientes más pobres (Kingdon y Lagen, 1997; Isbell *et al.*, 1998; Dunbar y Barrett, 2000). Tiene una preferencia clara por las frutas y las flores, pero su disponibilidad fluctúa entre la época seca y la época de lluvias obligándolos a variar su dieta, como ocurre en Kenia (Isbell *et al.*, 1999) y Senegal (Harrison, 1983b). Se alimentan de todo tipo de hojas, savia, semillas, tallos, setas, frutos, flores, invertebrados, huevos de pájaros, lagartos, roedores y otras presas vertebradas de pequeño tamaño (Harrison, 1983b; Fedigan y Fedigan, 1988). Los grupos de monos vervets seleccionan su alimentación dependiendo de la abundancia, de la presencia o ausencia de frutos en los árboles y de la concentración de taninos en el alimento (Wrangham y Waterman, 1981; Harrison, 1983b). Las crías tienden a comer lo que come su madre, lo que permite una rápida adaptabilidad al ambiente donde se van a desarrollar (Van de Waal *et al.*, 2014).

Su única limitación parece la presencia de agua y árboles (Wolfheim, 1983; Fedigan *et al.*, 1984; Fedigan y Fedigan, 1988). Una de las principales diferencias significativas en los territorios de los monos vervets es la disponibilidad de agua. Los territorios se clasifican en "húmedos", es decir la disponibilidad de agua es permanente y en "secos", donde el acceso al agua es estacional. Las hembras con disponibilidad de agua todo el año, tienen su primera descendencia a los cuatro años y suelen tener una cría cada año. Por el contrario, en los ambientes secos las hembras tardan más en convertirse en madres. Pueden llegar a los seis años sin haber tenido ningún parto. Pero la presencia de agua también atrae a otros animales, obligando a los vervets a compartir el área de campeo con sus depredadores. El porcentaje de muerte por depredación es superior en los grupos que habitan territorios húmedos que en los secos (Cheney y Seyfarth, 1987).

Los vervets seleccionan árboles altos y con buena visibilidad para dormir, distribuyéndose por sus ramas lo que les protege en gran medida de los ataques nocturnos de depredadores (Nakagawa, 1999). Con los primeros rayos de sol, el grupo empieza a moverse hacia las zonas de alimentación. Durante el día, alternan a partes iguales, la

locomoción arbórea y la terrestre (Fedigan y Fedigan, 1988). Se mantienen en el suelo para forrajear o para desplazarse entre zonas arboladas (Wolfheim, 1983).

Existen zonas de solapamiento entre las áreas de campeo, donde confluyen territorios de dos o más grupos vecinos. Cuando se encuentran miembros de diferentes grupos, el comportamiento puede ser muy variable, pueden pelearse, huir o mezclarse pacíficamente (Fedigan *et al.*, 1984). La territorialidad co-específica depende de la especie, aunque también existe una variabilidad individual y estacional. En el caso de *C. pygerythrus*, el grado de territorialidad es variable en función del tipo de hábitat, estación, intensidad de depredadores, el historial de relaciones con otros grupos y la distribución y abundancia de alimentos (Kavanagh, 1981; Fedigan *et al.* 1984). Cuando los recursos son limitados y se encuentran agrupados, se dan con mayor frecuencia agresiones territoriales. Por el contrario, en las sabanas arboladas, la intensidad disminuye. Los recursos son abundantes, pero presentan una amplia distribución y su defensa presenta más costes que beneficios (Kavanagh, 1981). Como norma general, todos los integrantes del grupo defenderán activamente de intrusos su territorio, pero con ciertas diferencias (Jasinska *et al.*, 2013). En la mayoría de las especies parece que los machos defiendan, como principal recurso, el acceso a las hembras mientras que estas, priorizan el acceso al alimento y la defensa de su descendencia. En la época de reproducción, los machos se muestran menos agresivos con las hembras de otros grupos, pudiendo copular con ellas. Es, precisamente en este momento, cuando existe mayor migración de machos, favoreciendo el intercambio genético entre grupos (Henzi y Lucas, 1980; Cheney, 1983a).

El campeo varía al igual que cambia su dieta, la distribución de tiempo de las actividades y el tamaño del grupo. En las zonas donde los recursos son escasos y/o están dispersos, los monos vervets se desplazan más y tienen mayores territorios. En Senegal, los grupos se desplazan entre 665 y 2.670 metros por día y cada grupo ocupa unos 1,78 km². La densidad más baja está en Kenia con nueve individuos por kilómetro cuadrado. En el lado opuesto están los grupos de la isla de Saint Kitts que ocupan extensiones pequeñas, de 0,6 km² con densidades elevadas, 255 individuos por km² (Kavanagh, 1981; Harrison, 1983a; Boyd y Silk, 2001; Jasinska *et al.*, 2013).

1.1.4. El mono vervet en cautividad

1.1.4.1. Centros de investigación

Los centros de investigación animal, únicamente albergan animales destinados a fines científicos. Además de las conocidas "ratas de laboratorio", muchos primates son utilizados en investigaciones biomédicas. Su cercanía filogenética con los humanos, hace que sus similitudes genéticas y comportamentales sean muy adecuadas para aplicar el método comparativo. Estas similitudes les convierten en unos candidatos ideales para llevar a cabo pruebas de seguridad de nuevos productos farmacológicos, así como estudios sobre procesos cognitivos o sobre enfermedades humanas (Jasinska *et al.*, 2013).

La extracción de primates de la naturaleza para proveer a los laboratorios ha disminuido considerablemente. En la actualidad antes de empezar una investigación se debe justificar la importancia del número de animales necesarios al igual que la especie a utilizar. La aparición de métodos alternativos, la regulación de la Convención internacional para el comercio de especies en peligro (CITES) y la comprensión de la situación de las poblaciones de primates ha sido esencial para disminuir el uso de ciertas especies. La utilización de grandes primates ha disminuido, siendo el chimpancé (*Pan troglodytes*) el más utilizado (Goodman y Check, 2002; Abee *et al.*, 2012). Dentro de los monos del viejo mundo el género más utilizado es *Macaca*, seguido por los géneros *Papio* y *Chlorocebus*. Entre 1980 y 1990 los estudios con primates sobre neurociencia, cardiovascular y endocrino aumentaron ligeramente, mientras que las investigaciones sobre farmacología disminuyeron. Las publicaciones sobre virología e inmunología aumentaron considerablemente coincidiendo con las investigaciones sobre el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) (Abee *et al.*, 2012). Los estudios de la biología reproductiva y la gestión de colonias de primates, también cobran mayor importancia ya que el tema de conservación y bienestar empieza a tener más fuerza (Stoinski *et al.*, 2012).

El uso de primates como modelo animal, no siempre implica el sacrificio de los animales que participan en el estudio. Pese a que algunos estudios son terminales, los estudios de la biología y comportamiento reproductivo rara vez implican el sacrificio del primate al finalizar el estudio. Muchas investigaciones de neurociencia o toxicología incluyen

la eutanasia humanitaria como parte del protocolo de investigación. En las ocasiones donde el protocolo experimental utilizado lo permita, pueden ser acogidos por algún centro autorizado. Los animales suelen estar bajo condiciones de alta seguridad biológica, con una estricta supervisión de los parámetros ambientales como la temperatura, la humedad relativa, el fotoperiodo, la alimentación, etc. (Hessler y Lehner, 2009).

Las investigaciones pueden centrarse en el estudio del comportamiento de la especie, de los procesos cognitivos, en estudios funcionales y en la selección genética. En este caso, los estudios suelen ser longitudinales por lo que las observaciones perduran varios años y los animales, pueden ser mantenidos en el centro hasta su muerte. Estos centros suelen colaborar o formar parte de universidades u organismos públicos de investigación. Además de ser usuarios de animales, lo que les permite utilizarlos en las investigaciones que realizan, pueden tener otra función, como centro de cría y suministro. Esto autoriza al centro a poder criar animales y venderlos o cederlos a otros centros. Dependiendo del país donde se localicen los centros de investigación deberán cumplir toda la legislación vigente al respecto (Abee *et al.*, 2012).

El mantenimiento de los animales de experimentación ha enfrentado en numerables ocasiones el bienestar animal con el avance científico, por ello la legislación intenta regular la utilización de estos animales y las condiciones de alojamiento. Las jaulas individuales y estériles van dejando paso a programas de enriquecimiento ambiental que favorezcan el estado de bienestar de los animales objeto de las investigaciones (Erwin y Landon, 1992).

En la investigación biomédica, las especies de *Chlorocebus* son un modelo animal más apreciado que los roedores (Jasinska *et al.*, 2013). Tiene varias características que les hacen ser muy usados en la investigación biomédica (Carlsson *et al.*, 2004). Se trata de una especie de primate, lo que le confiere una cercanía evolutiva con los humanos y no son especies catalogadas en peligro de extinción como, por ejemplo, los chimpancés. Además, son de pequeño tamaño y fáciles de mantener en cautividad (NRC (US), 2003). Por ello, tienen un valor único para la investigación genética y para el estudio de la genética de enfermedades humanas. Cabe destacar su gran utilización en investigación del cerebro, comportamiento, metabolismo e inmunidad humana (Jasinska *et al.*, 2013). Son especialmente importantes en el estudio de la presión arterial y el SIDA ya que de forma

natural desarrollan hipertensión arterial y el Virus de Inmunodeficiencia en Simios (SIV) (Chakrabarti *et al.*, 2002; NRC (US), 2003).

La aparición de programas de cría en cautividad suele tener como objetivo la utilización de los animales en biomedicina o para la exhibición zoológica. Los primeros suelen llevarse a cabo en los centros de investigación con las especies más utilizadas en experimentación animal; mientras que los segundos suelen realizarse en parques zoológicos con especies poco habituales o en peligro de extinción.

1.1.4.2. Parques zoológicos

Encontrar el origen de la tenencia de animales para exponerlos al público es complicado ya que hay que remontarse muchísimo en la historia de las civilizaciones humanas. Se sabe que en las ciudades romanas se podían contemplar combates entre animales o luchas de gladiadores contra animales. En el siglo XIII, monarcas y aristócratas seguían manteniendo animales en cautividad en los jardines de sus palacios. El fin de estas colecciones era obtener prestigio, impresionando y divirtiendo a sus invitados. Los animales eran capturados directamente de la naturaleza a cambio de grandes sumas de dinero y se alojaban en pequeñas instalaciones. En 1254, Enrique III abre las puertas de la Torre de Londres a todo el público a cambio del precio de la entrada. Este podía ser pagado con una dotación económica o con un perro o un gato que se utilizaban para alimentar a los carnívoros (Harvey, 1829). A mediados del siglo XVIII, continúa el interés por la observación de animales exóticos, pero disminuye el interés hacia las colecciones privadas (Hahn, 1967). Tras la revolución francesa, el concepto de las "casas de fieras" horroriza a los ciudadanos que lo comparan con un símbolo de tiranía. Por ello deciden "liberar a los animales". La desaparición de las colecciones privadas da lugar a las primeras instituciones públicas que albergaban animales silvestres. El primer parque zoológico fue "Le jardin des plantes" en Paris (Loisel, 1912). Inspirados por el zoológico de Paris, Tamford Raffles y Sir Humphrey Davy fundan, en 1826, la "Zoological Society of London". La finalidad ya no es solo exponer animales, se empieza a dar importancia a la investigación (Hahn, 1967).

Con la aparición de las instituciones públicas, continua la preocupación por los animales cautivos. Debido al manejo diario de estos animales en sus jaulas, se empiezan a

conocer sus grandes habilidades de aprendizaje y vuelve el interés de exhibir especies nunca vistas (Kleiman *et al.*, 1996). Pero, la falta de conocimientos sobre las necesidades biológicas de las especies hace que su longevidad en cautividad sea muy corta y se necesite una alta reposición de animales. Los parques zoológicos siguen pagando a cazadores, militares y balleneros a cambio de animales vivos de sus expediciones. La captura y el transporte de estos animales se realizan por “ensayo – error”, lo que provoca una gran pérdida de animales que mueren antes de llegar a su destino. Los parques zoológicos no solo se proveían de animales silvestres, también acogían a las mascotas exóticas indeseadas tanto de particulares como de circos (Dresser *et al.*, 1988; Reichenbach, 1989; Ehrlinger, 1993).

Con el paso de los años aparecen nuevas legislaciones que regulan las condiciones de tenencia de este tipo de animales como la directiva 1999/22/CE relativa al mantenimiento de animales salvajes en parques zoológicos o como la ley sobre Bienestar Animal del 1970 (EEUU). Los zoológicos también aceptan de forma voluntaria acreditaciones y guías de buenas prácticas éticas procedentes de la Asociación Americana de Zoos y Acuarios (Kleiman *et al.*, 1996).

En la actualidad, los parques zoológicos tienen como objetivos principales: facilitar la investigación, promover la educación y asegurar el bienestar de los animales albergados. Para ello se pone en marcha programas de cría en cautividad coordinados entre parques zoológicos de todo el mundo por asociaciones como la Asociación Americana de Parques Zoológicos y Acuarios (AAZPA) o para muchas especies de primates por el Programa de Supervivencia de Especies Específicas (SSP) (Abee *et al.*, 2012).

En los parques zoológicos se encuentran una gran cantidad de especies animales, con una gran variedad de primates. Los PNH constituyen el grupo animal de mayor reclamo para el público en los parques zoológicos, lo que conlleva a que sean muy frecuentes en cautividad y que el conocimiento de su carga parasitaria cobre importancia (Levecke, 2010).

1.1.4.3. Santuarios o centros de rehabilitación de fauna silvestre

El objetivo final de los programas de reproducción en cautiverio para las especies de primates en peligro de extinción, es que la progenie pueda ser reintroducida con éxito. Por ello son necesarios más conocimientos sobre el modo de vida de las especies en libertad. El

aumento del estudio de poblaciones silvestres, el conocimiento sobre su estado de conservación y la creación del CITES hacen imprescindibles la creación de centros donde poder mantener a los animales en los países de origen. Los centros de rehabilitación de fauna silvestre o santuarios surgen con el fin de rehabilitar y preparar los animales para una posible reintroducción en la naturaleza (Leendertz *et al.*, 2006) y suelen acoger distintas especies autóctonas heridas o desvalidas mientras que los santuarios suelen especializarse en un tipo de animal en particular. Suelen localizarse en el país de origen de las especies. En el caso del mono vervet su llegada a los santuarios es procedente de laboratorios (Kerwin, 2006), de particulares tras su tenencia como mascotas, de parques zoológicos y víctimas de accidentes, principalmente atropellos y electrocuciones en cables de alta tensión. La reintroducción de primates no siempre es posible, ya que se debe sopesar las consecuencias desastrosas que puede tener en las poblaciones silvestres y si existe un hábitat adecuado disponible (Konstant y Mittermeier, 1982; Soorae y Baker, 2002). Empiezan a realizarse estudios científicos sobre la viabilidad de poblaciones reintroducidas de primates como gorilas en África (King *et al.*, 2012) y orangutanes en Indonesia (Russon, 2009).

Los primates albergados en santuarios constituyen una fuente de muestras biológicas muy importante, ya que la toma de esas mismas en la naturaleza supondría un gran desafío para los investigadores. Aumentaría la dificultad, tanto en tiempo como en coste de las tomas de muestra (Leendertz *et al.*, 2006).

En general, todos los animales en cautividad permiten avanzar en la comprensión de la organización social, la biología y el comportamiento reproductivo, así como en la atención veterinaria necesaria para una buena gestión de las colonias (Hosey, 2005; Sapolsky, 2005; Fedullo *et al.*, 2013). Pero no siempre son comparables a las tomas de muestras en el medio natural, ya que ciertos factores pueden alterar el buen funcionamiento fisiológico de los animales. La tenencia en cautividad de un animal silvestre puede no recrear exactamente las condiciones de su hábitat de origen, pudiendo alterar su equilibrio biológico (Kuntz, 1982).

Las condiciones de alojamiento de los primates cautivos no son las mismas que las condiciones de vida en libertad. Muchas variables se ven alteradas. Unas malas condiciones de mantenimiento pueden provocar estrés crónico en los animales, produciendo un

aumento del cortisol (Kleiman *et al.*, 1996). Animales con altos niveles de cortisol eliminan mayor número de huevos de parásitos aumentando las posibilidades de dispersión de las enfermedades parasitarias (Chapman *et al.*, 2006b).

Pese a que se intenten reproducir las condiciones ambientales similares a las de la vida silvestre no siempre es posible. Por ejemplo:

El espacio. Pasan de jaulas inertes donde se mantienen animales aislados a complejas instalaciones con vegetación natural que son comparables a un estado de semilibertad. Pero el tamaño es significativamente más pequeño que el área de campeo en condiciones naturales. Por tanto, la concentración de animales por metro cuadrado es superior a la que encontraríamos en condiciones naturales. La cautividad provoca una restricción espacial y biológica alterando el comportamiento de los primates, lo que altera a su vez el patrón de transmisión de ciertas enfermedades (Levecke, 2010). Vivir en grupos más grandes también hace que los animales presenten una mayor diversidad de parásitos (Vitone *et al.*, 2004).

La alimentación. En la naturaleza la alimentación de los primates ocupa buena parte de su actividad diaria y suelen ser muy variada. En el caso de los primates en laboratorios y parques zoológicos, el elemento mayoritario de su dieta es pienso preparado. En el caso de la alimentación en los santuarios se suele suplementar la alimentación disponible en las instalaciones con una variedad de alimentos (frutas, verduras, pan, arroz, soja). En los santuarios, el agua, suele estar siempre a disposición de los animales. Su suministro puede provenir de manantiales no potables o su estancamiento puede hacer proliferar microorganismos por lo que puede ser la responsable de problemas digestivos en los animales. Por el contrario, el acceso a la comida se restringe y se utiliza como estrategia para el manejo lo que altera el comportamiento alimentario de los animales (Levecke, 2010).

El contacto con el hombre. El manejo diario de los primates en cautividad, hace que los humanos se encuentren expuestos a bacterias, virus y parásitos procedentes de éste (Kuntz, 1982). Por ejemplo, en vervets de centros de investigación biomédica se ha diagnosticado *Blastocystis* spp. Ciertos subtipos se postulan como posibles agentes zoonóticos (Zanzani *et al.*, 2014). También se ha comprobado que la prevalencia de *Balantidium coli* suele ser mayor en primates albergados en semilibertad (como en

santuarios) que en las poblaciones silvestres (Kilbourn *et al.*, 2003). En el caso de los orangutanes huérfanos mantenidos en cautividad con contacto estrecho con humanos se han detectado infecciones por géneros de *Plasmodium* habituales de humanos, a diferencia de los silvestres que lo hacen de especies habituales de primates no humanos (Kilbourn y Karesh, 1998).

Los tratamientos preventivos. En colecciones que reciben tratamientos antiparasitarios de forma regular, hay menores tasas de helmintos (Gómez *et al.*, 1996; Verweij *et al.*, 2003), pero una mayor prevalencia de protozoos (Kalishman *et al.*, 1996; Nakauchi, 1999; Verweij *et al.*, 2003). La protección frente a sus depredadores naturales, así como la prevención y tratamiento de ciertas enfermedades hacen que aumente la esperanza de vida de estos animales. El aumento de la longevidad se correlaciona con una mayor diversidad de parásitos (Vitone *et al.*, 2004).

Las alteraciones biológicas a las que se somete al animal aumentan el riesgo de transmisión de enfermedades (Kilbourn *et al.*, 2003; Nunn y Dokey, 2006), incrementan la gravedad de ciertos parásitos (Kuntz, 1982) y promueven ciertas infecciones (Gracenea *et al.*, 2002).

En los países donde se mantienen en cautividad primates nativos, es más frecuente la exposición a patógenos procedentes de animales recién llegados, de agua o de comida contaminada, de insectos o de otros animales autóctonos (Labes *et al.*, 2010). Además, en condiciones de cautividad es frecuente encontrar mayor prevalencia de parásitos gastrointestinales de ciclo directo y menor prevalencia de los de ciclos más complejos (ciclo indirecto) como los que necesitan de hospedadores intermediarios. También tenemos que destacar que comportamientos habitualmente observados en cautividad, como la coprofagia, pueden aumentar la prevalencia de parásitos de ciclo de vida simple (Pomajbíková *et al.*, 2010).

1.1.5. El mono vervet en Sudáfrica y en la región de Limpopo en particular

Sudáfrica está ubicada en el extremo sur del continente africano y se extiende desde el trópico de capricornio hasta el cabo de Agulhas. Limita al norte con, de oeste a este,

Namibia, Botsuana y Zimbabue. Mientras que al este con Mozambique y Suazilandia. El país también comparte sus fronteras con un pequeño país, Lesoto el cual está totalmente rodeado por tierras sudafricanas. Dentro de los límites políticos se distinguen cuatro regiones geográficas principalmente: El desierto, el altiplano, las montañas y el litoral costero (figura 8).



Figura 8. Mapa de Sudáfrica y países fronterizos (Universidad de Texas, 2016).

El desierto del Kalahari ocupa el oeste del país y su extensión de 930.000 km² se extiende hacia Botsuana y Namibia. Se extiende entre las cuencas de los ríos Zambezi y Orange (Rogers, 1935). El grosor del manto de arena sobre el lecho de roca llega hasta los 100 metros, aunque la media suele rondar los 30 metros (Jones, 1980).

El altiplano ocupa la mayor superficie, se caracteriza por tierras áridas que permiten la creación de algunos ríos en la época de lluvias, pero la mayor parte de la meseta carece de ríos o lagos, aunque se encuentra el río Orange que atraviesa Sudáfrica, Lesoto, las zonas del sur de Namibia y Botsuana (Diederichs *et al.*, 2005).

Las montañas dividen la región costera de la meseta interior, desde el cabo de buena esperanza hasta el valle de Limpopo. Mientras que el litoral costero de Sudáfrica limita al este con el océano Índico y al oeste con el océano Atlántico y tiene unos 3000 Km de longitud.

En Sudáfrica, el mono vervet, se ha adaptado a vivir alejado de los bosques y ocupa las sabanas, pero permaneciendo siempre cercano a fuentes de agua y zonas arboladas (Dunbar y Barrett, 2000). Debido a su alta capacidad de adaptación se distribuye por zonas rurales, cultivos agrícolas e incluso zonas urbanas como Ciudad del Cabo (Fincham y Seier, 1981).

La marcada estacionalidad de la temperatura y las precipitaciones en Sudáfrica provoca que los monos vervets que pueblan este país muestren diferencias de comportamiento principalmente de forrajeo respecto a los países africanos más ecuatoriales, de hecho, en Sudáfrica, durante la estación húmeda, cuando hay mayor abundancia de alimentos, los vervets ocupan una menor extensión de terreno y se alimentan de una mayor variedad de alimentos que en la época seca. Así mismo, se ha demostrado que durante la época húmeda los vervets pueden dedicar más tiempo de su actividad diaria a la socialización y al descanso. Mientras que, en la época seca, se ven obligados a forrajear más (Barrett *et al.*, 2005). De igual modo, en Sudáfrica se ha observado la colonización por parte de los monos vervets de zonas semiáridas al utilizar fuentes artificiales como recurso hídrico. Estos grupos, muestran mayor tiempo de anestro entre partos, probablemente como comportamiento ecológico adaptativo (Pasternak *et al.*, 2013).

El hecho de que el mantenimiento de los monos vervets como mascota sea ilegal en Sudáfrica, hace necesaria la existencia de santuarios y centros de rehabilitación especializados en esta especie para alojarlos en ellos cuando son requisados por las autoridades (Grobler *et al.*, 2006). Además, los monos vervets en Sudáfrica son habitualmente víctimas de disparos, ceptos, atropellos, envenenamientos y de ataques de animales domésticos lo que provoca en ellos, heridas, muerte y genera crías huérfanas (Guy *et al.*, 2011). Los supervivientes procedentes de estos accidentes también son alojados y rehabilitados en santuarios y centros de rehabilitación. Por lo que existen varios santuarios dedicados a la rehabilitación de *C. pygerythrus* en todo el territorio sudafricano.

La reintroducción se ha convertido en una de las principales medidas para el manejo y rehabilitación en Sudáfrica del mono vervet. Sin embargo, no se disponen de suficientes publicaciones para documentar su éxito (Guy *et al.*, 2011). De hecho, hasta la fecha se han publicado pocos trabajos que traten la rehabilitación y reintroducción del mono vervet en Sudáfrica (Whittsit, 1995; Wimberger *et al.*, 2010). Wimberger detalla cómo se realizó el proceso, obteniendo una supervivencia de entre 17 y 50% diez meses después de la liberación de los animales. Otro estudio más reciente de 2011 tuvo una supervivencia del 32% (Guy *et al.*, 2011).

Los vervets han pasado de ser considerados una plaga a empezar a considerarse que las poblaciones silvestres disminuyen y que deben de ponerse en marcha programas de protección (IUCN, 2016). La conservación de los primates requiere un gran esfuerzo multidisciplinar de científicos y de la población local. Cuanta más información se disponga más sencilla será la toma de decisiones acertadas sobre las especies.

1.2. Principales parásitos gastrointestinales en el mono vervet

El término parásito implica a muchos organismos distintos que viven a expensas de otros animales (hospedadores). Se alimentan de sus tejidos, de líquidos corporales, o del alimento ingerido por el hospedador. Los tamaños de los parásitos varían entre tamaños únicamente detectables con ayuda de un microscopio hasta organismos que miden más de un metro de longitud. Además, los parásitos presentan una gran variabilidad en el ciclo de vida, tanto en las localizaciones en el hospedador como en la forma de transmisión de un animal a otro. Por todo ello, no existe una prueba estándar para identificar a todos los parásitos (Taylor *et al.*, 2016). Este trabajo se centra en los parásitos gastrointestinales del vervet y los ha separado en protozoos y helmintos.

1.2.1. Protozoos

Los protozoos comprenden un amplio espectro de organismos con características biológicas variables, diferentes ciclos biológicos y diferente potencial patógeno. Los hospedadores pueden albergar infecciones latentes durante mucho tiempo y por cambios en la dieta u otros factores que provoquen estrés biológico, puede desencadenarse la patología. La gravedad de la patología dependerá del estado biológico del hospedador (Kuntz, 1982).

La capacidad patógena de la mayoría de los protozoos es controvertida, pero se han encontrado animales sintomáticos con infecciones mixtas de diferentes protozoos en las cuales un gran porcentaje de trofozoítos eran de *Blastocystis* spp., el cual a priori se considera apatógeno (Zanzani *et al.*, 2014).

Cabe destacar la importancia del análisis de la prevalencia de protozoos en primates en cautividad ya que es habitual encontrar mayores prevalencias de éstos que de helmintos. Al parecer, las condiciones de cautividad ayudan a la transmisión de protozoos debido a su ciclo de vida directo (Da Silva Barbosa *et al.*, 2015).

1.2.1.1. *Entamoeba coli*

Se reproduce por fisión binaria y se transmite por ingestión de ooquistes. Los trofozoítos tienen unas medidas de 15 a 50 μm de diámetro mientras que los quistes miden de 10 a 33 μm de diámetro (figura 9). Es considerado no patógeno (Taylor *et al.*, 2016).

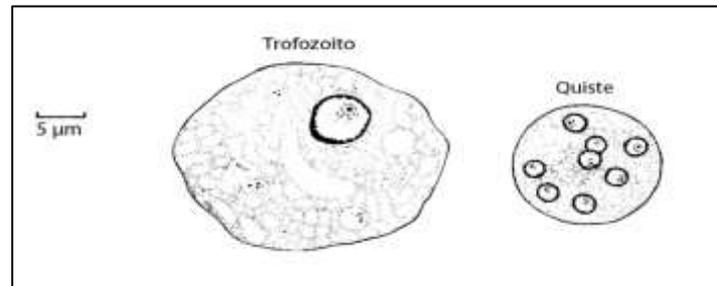


Figura 9. Esquema representativo de *Entamoeba coli* (Flynn, 2007).

Se trata de una de las amebas más frecuentemente encontrada en primates, siendo la más comúnmente descrita en humanos. Se encuentra en el colon y ciego de macacos (*Macaca spp.*), babuinos (*Papio spp.*), gibones (*Hylobates spp.*), vervets y grandes primates. Tanto en animales silvestres como animales de laboratorio. En los laboratorios se introducen al extraer animales directamente de la naturaleza. En ciertos centros de investigación su prevalencia puede alcanzar el 95% (Flynn, 2007).

1.2.1.2. *Entamoeba histolytica/dispar*

Se descubrieron en 1925 y se consideraron una misma especie hasta 1993 (Diamond y Clark, 1993). Durante mucho tiempo se creía factible la diferenciación morfológica de las dos especies con el microscopio. Se pensaba que solo *E. histolytica* podía mostrar eritrocitos fagocitados, pero en 2002 se demostró que no era cierto. (Munene *et al.*, 1998; Karere y Munene, 2002). Actualmente se recomienda el uso de técnicas moleculares para la diferenciación de ambas especies (Levecke, 2010) aunque el diagnóstico habitual se realiza mediante microscopía óptica teniendo en cuenta la imposibilidad de diferenciar las dos especies (Samuel *et al.*, 2001).

Se reproduce por fisión binaria y su transmisión es directa. En el proceso de enquistado esta ameba adquiere una morfología redondeada para, posteriormente, crear la cubierta quística. El núcleo se divide hasta dos veces para dar como máximo cuatro núcleos

en el quiste. Los quistes son eliminados en las heces e infectan a nuevos individuos al ser ingeridos. Al llegar al intestino del hospedador, eclosionan al mismo tiempo que los cuatro núcleos se dividen nuevamente. De esta forma, por cada quiste eclosionado se liberan ocho trofozoítos. Los hospedadores sintomáticos solo eliminan trofozoítos que no son infectivos. La presencia de portadores crónicos, que sí eliminan formas infectivas y actúan como reservorios, permite que se puedan observar brotes agudos de esta amebiasis con gran separación de tiempo entre ellos (Oriol y Seibold, 1972; Kuntz, 1982).

Los trofozoítos de este parásito miden entre 12 y 15 μm de diámetro, el núcleo es vesicular, mostrando un pequeño endosoma central, con un pequeño anillo de gránulos a su alrededor (figura 10). Los quistes miden entre 10 y 20 μm de diámetro y muestran un máximo de cuatro núcleos a su madurez (Taylor *et al.*, 2016).

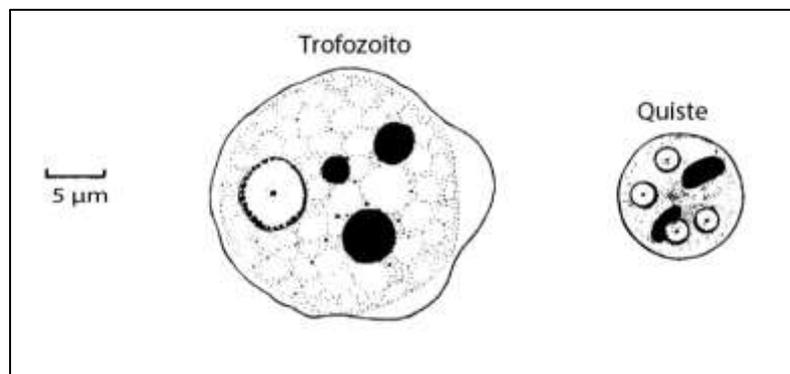


Figura 10. Esquema representativo de *Entamoeba histolytica* (Flynn, 2007).

Los efectos patógenos de estos parásitos son atribuibles a la especie *E. histolytica*, ya que *E. dispar* está considerada como apatógena y aunque son muy variables suelen ser colitis crónica presentando congestión, petequias y ulceraciones de la mucosa del colon. En ocasiones, pueden provocar la formación de abscesos, agravando su efecto patógeno y aumentando su morbilidad y mortalidad (Loomis *et al.*, 1983; Márquez-Monter *et al.*, 1991; Verweij *et al.*, 2003).

La gravedad de la sintomatología dependerá del propio parásito (capacidad patógena de la cepa) y del hospedador (estado inmunitario, nutricional y flora intestinal). Los platirinos son más susceptibles a desarrollar sintomatología que los catarrinos. Su patogenicidad en mono vervet se considera de baja a moderada en comparación a otros

parásitos. Si bien, en sinergismo con otros parásitos su patogenicidad aumenta pudiendo presentar alta morbilidad y mortalidad (Kuntz, 1982; Haq *et al.*, 1985; Verweij *et al.*, 2003; Flynn, 2007; Levecke, 2010).

Se ha descrito su presencia en la mayoría de primates. En libertad, afecta más a los catarrinos que a los platirinos. Mientras que, en condiciones de cautividad, su prevalencia es alta en todos los grupos de primates pudiendo superar la prevalencia de *Balantidium coli* (Kuntz, 1982; Flynn, 2007), llegando al 44% (Levecke *et al.*, 2007). En el caso de los monos de Braza (*Cercopithecus neglectus*) se ha observado una mayor prevalencia en juveniles (Gillespie *et al.*, 2004). En monos vervets la frecuencia de infección es media presentando una morbilidad de baja a moderada (Flynn, 2007).

1.2.1.3. *Giardia duodenalis*

G. duodenalis se ha descrito indistintamente en gran variedad de primates. Se ha estudiado profundamente en grandes primates y poco en otras especies (Nizeyi *et al.*, 2002; Salzer *et al.*, 2007). Las infecciones por este parásito son más frecuentes en individuos jóvenes (William, 2001; Flynn, 2007) y se han observado infecciones asintomáticas en *Macaco rhesus* (Sestak *et al.*, 2003). La presencia de este parásito en el mono vervet es media y su morbilidad y patogenicidad bajas (Kuntz, 1982). Su prevalencia en primates en cautividad suele ser del 41% (Levecke *et al.*, 2007).

Al igual que otros protozoos, su ciclo de vida es directo. Los dos trofozoítos resultantes del desenquistamiento colonizan la mucosa del duodeno (aunque también se les ha observado colonizando yeyuno e incluso íleon) donde se reproducen por fisión binaria. Las sucesivas mitosis producen más trofozoítos o quistes dependiendo de factores como la presencia o ausencia de sales biliares (Feng y Xiao, 2011). Los trofozoítos recorren el intestino, son eliminados en las heces y resisten muy bien en el exterior del animal (Erickson y Ortega, 2006). La transmisión de la enfermedad es producida por la ingestión de quistes, que son la forma infectiva, presentes en agua y/o comida contaminada. En cambio, en fases agudas de la enfermedad pueden eliminarse trofozoítos infectivos en las heces, aunque su resistencia es menor que la de los quistes (William, 2001).

Sus trofozoítos miden de 9 a 21 μm de longitud por 5 a 15 μm de ancho y de 2 a 4 μm de grosor (figura 11). Todo el género se caracteriza por su forma piriforme con el polo anterior redondeado y el posterior alargado. En la parte ventral posee un disco de succión. Posee dos núcleos y ocho flagelos organizados en cuatro pares. Sus quistes son muy resistentes en el medio ambiente, son ovoides y miden de 8 a 12 μm de longitud por 7 a 10 μm de ancho (Bogitsh *et al.*, 2013).

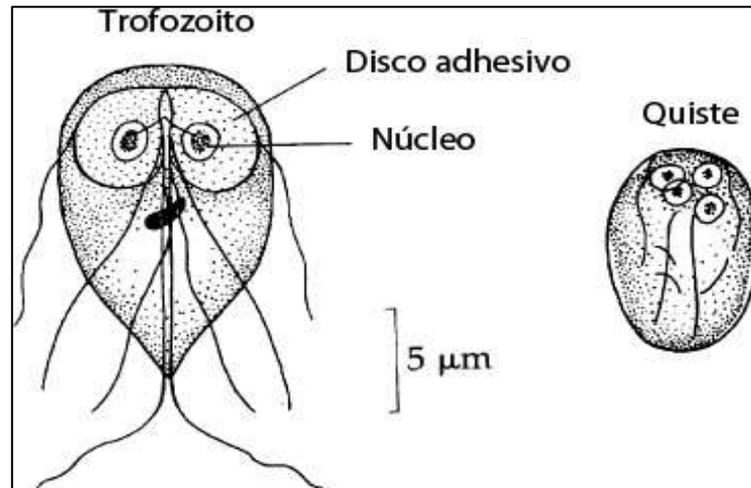


Figura 11. Esquema representativo de *G. duodenalis* (Bogitsh *et al.*, 2013).

La colonización de la mucosa intestinal por parte de los trofozoítos provoca un aumento del contenido acuoso y mucoso de la luz intestinal, inactivando parte de la función de diferentes enzimas digestivos y provocando atrofia de las microvellosidades intestinales e hipertrofia de las criptas intestinales. Otra alteración demostrada de la infección de este parásito es la hipermotilidad intestinal que desencadena la diarrea (Samuel *et al.*, 2001; William, 2001). Junto con la diarrea se ha descrito dolor abdominal, deshidratación, pérdida de peso y alteraciones del desarrollo. En casos severos se han observado síndromes de maldigestión-malabsorción (Samuel *et al.*, 2001; Kramer *et al.*, 2009).

El diagnóstico se puede realizar mediante detección de los quistes o trofozoítos en heces. Los trofozoítos solo se observarán en animales con enfermedad aguda. El examen coprológico directo o la flotación con sulfato de zinc al 33% son las técnicas microscópicas recomendadas. Otros métodos de diagnóstico recomendados son los kits comerciales ELISA que permiten la detección de antígenos en heces (Samuel *et al.*, 2001; Johnston *et al.*, 2003).

1.2.1.4. *Isospora* spp.

Se ha descrito de forma puntual especies de este género como *I. endocallimici*, *I. scorzai*, *I. cebi* e *I. paponis* infectando a platirrinos y babuinos. Sin embargo, la especie de *Isospora* más frecuentemente encontrada en primates es *I. arctopithecii*. Esta última se ha descrito en infecciones cruzadas entre monos platirrinos, carnívoros y marsupiales (Lindsay *et al.*, 1997).

Su ciclo de vida es directo. Las distintas fases de desarrollo del parásito se encuentran en los enterocitos de las dos terceras partes distales de las vellosidades intestinales, con una densidad mayor en el yeyuno (Lindsay *et al.*, 1997).

Los ooquistes esporulados de las especies de este género que afectan a primates, son ovalados de aproximadamente 40 μm de longitud con un esporozoíto y un gran glóbulo refráctil en su interior (figura 12) (Duszynski *et al.*, 2002).

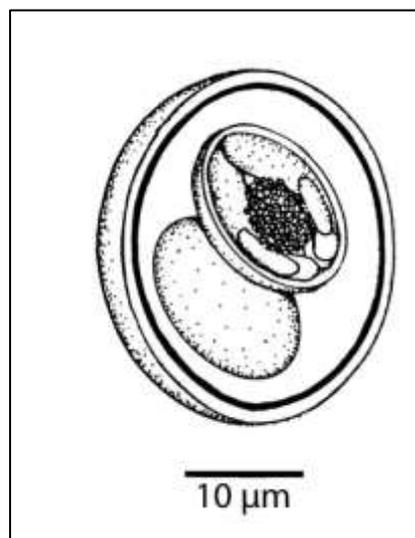


Figura 12. Esquema representativo de ooquiste esporulado de *Isospora arctopithecii* (Duszynski *et al.*, 2002).

Se considera patógeno ya que se ha observado necrosis apical de los enterocitos con exposición de la lámina propia intestinal en primates infectados experimentalmente, pero se desconoce su patogenicidad fuera del ámbito experimental (Lindsay *et al.*, 1997).

Los signos clínicos van desde la muerte súbita entre tres y cinco días postinfección a diarrea hemorrágica y muerte posterior entre cinco y siete días postinfección (Lindsay *et al.*, 1997).

El diagnóstico se realiza mediante la identificación de ooquistes en heces. Unos de los métodos más utilizados es la técnica de flotación con solución saturada de sacarosa, aunque la solución de sulfato de zinc al 33%, la solución salina saturada o el uso de otras técnicas de concentración como la sedimentación son también aceptadas (Lindsay *et al.*, 1997).

1.2.1.5. *Troglodytella abressarti*

Los trofozoítos son elipsoidales aplanados y miden entre 145 y 174 μm de largo por 87 a 126 μm de ancho (figura 13). Poseen tres zonas de cirros que se distribuyen como anillos concéntricos incompletos, pero su disposición en forma de espiral les da el aspecto de que sean continuos. El macronúcleo tiene forma de L y posee aproximadamente ocho vacuolas contráctiles distribuidas en dos círculos paralelos a las líneas de cirros (Kooriyama *et al.*, 2012).

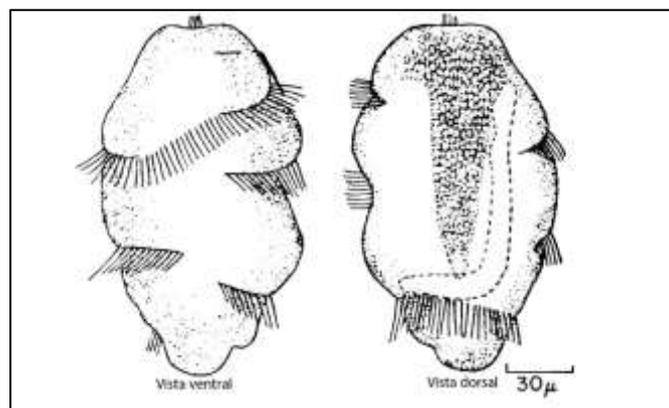


Figura 13. Esquema representativo del trofozoíto de *Troglodytella abressarti* (Kudo, 1966).

Este parásito se encuentra habitualmente en el ciego y colón de los chimpancés en África central, aunque también ha sido descrito en chimpancés utilizados en laboratorios de investigación en Estados Unidos. A medida que aumenta el tiempo en cautividad, disminuye su frecuencia de aparición (Flynn, 2007).

Se considera apatógeno, pero se ha relacionado con colitis en chimpancés. El ciclo de vida es desconocido, pero se piensa que es directo (Howells *et al.*, 2011).

Su diagnóstico se realiza identificando el parásito en heces, no existiendo recomendaciones de técnicas coprológicas en particular en la bibliografía (Kooriyama *et al.*, 2012).

1.2.1.6. *B. coli*

Este protozoo fue descrito por primera vez como *Paramecium coli* (Malmsten, 1857). Su nomenclatura ha ido cambiando hasta denominarlo como *B. coli* en 1863. Es el protozoo más grande que afecta a los primates. Los trofozoítos se localizan en el ciego y colon de los primates (Schuster y Ramírez-Ávila, 2008).

Se identifican dos formas parasitarias, el trofozoíto y el quiste. El trofozoíto ciliado mide de 30 a 300 μm de largo por 25 a 120 μm de ancho. El quiste de forma esférica o levemente ovalada mide de 40 a 60 μm de diámetro. La citofaringe del trofozoíto está situado en el polo anterior formando un estrechamiento y el citopigio en el polo caudal que es más redondeado (figura 14). En el citoplasma se puede distinguir un macronúcleo en forma de salchicha uniforme, pequeños micronúcleos de forma redondeada, y dos vacuolas contráctiles (Ferry *et al.*, 2004).

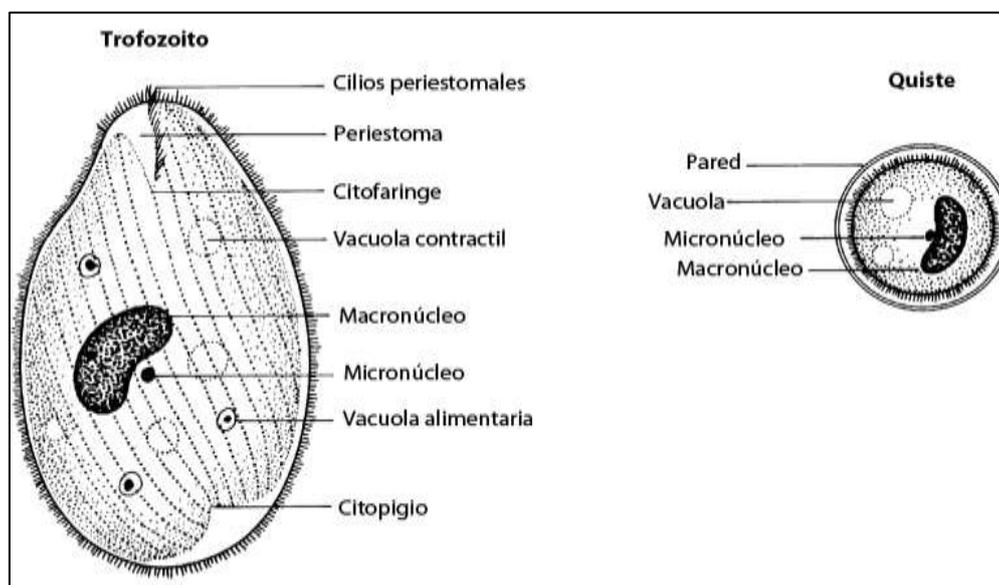


Figura 14. Esquema representativo de la morfología del trofozoíto y del quiste de *B. coli* (Bogitsh *et al.*, 2013).

Su ciclo de vida es directo. En los trofozoítos se puede dar la división asexual, se forma un surco transversal que divide a la célula madre en dos células hijas asimétricas, la célula hija anterior mantiene la citofaringe, aunque tanto la anterior como la posterior desarrolla una nueva. La reproducción sexual también es posible, pero no se conocen con detalle los sucesos nucleares de este tipo de reproducción. El quiste se considera como la fase infectiva debido a su pared gruesa que le confiere resistencia a la desecación y a otros factores ambientales. La transmisión es directa a través de agua o comida contaminada (Schuster y Ramírez-Ávila, 2008; Bogitsh *et al.*, 2013).

Generalmente se le considera apatógeno, aunque también se le ha asociado frecuentemente con sintomatología gastrointestinal (Jones-Engel *et al.*, 2004). Además, la balantidiosis subclínica cursa con inflamación superficial de la mucosa intestinal (McClure y Guilloud, 1971). La enfermedad clínica puede provocar alteración de la mucosa llegando a ulcerarla cursando con diarrea y enteritis (Flynn, 2007; Taylor *et al.*, 2016). Se cree que existen factores determinantes para que la enfermedad curse con sintomatología clínica como el pH del contenido intestinal, el estrés, o presencia de otros patógenos como virus (Kuntz, 1982).

Esta distribuido por todo el mundo. Afecta a los primates incluido el humano y a la mayoría de los animales domésticos y silvestres (Awakian, 1937; Epstein y Awakian, 1937; Beaver *et al.*, 1984).

El primer caso de balantidiosis en grandes primates se diagnosticó en el zoológico de Berlín (Christeller, 1922). A partir de entonces aumentaron los casos diagnosticados de grandes primates en cautividad (Cockburn, 1948; Kim *et al.*, 1978; Teare y Loomis, 1982; Lee *et al.*, 1990). Pese a que en grandes primates silvestres se ha descrito en pocas ocasiones (Lilly *et al.*, 2002) sí es frecuente encontrarlo en otros primates silvestres (Karere y Munene, 2002). Como es de suponer, se han descrito mayores prevalencias en primates en cautividad que en el medio natural (Kilbourn *et al.*, 2003; Levecke *et al.*, 2007). Las hembras adultas presentan mayores frecuencias, aunque se desconoce los factores predisponentes (Karere y Munene, 2002). En monos vervets, la frecuencia de infección es moderada con escasa morbilidad y mortalidad (Kuntz, 1982).

Para su diagnóstico se deben identificar los trofozoítos o los quistes del parásito en las heces del hospedador mediante técnicas coprológicas directas o cualquier técnica de concentración por sedimentación (William, 2001). El trofozoíto presenta una natación rotatoria característica.

1.2.1.7. *Chilomastix mesnili*

Los trofozoítos son piriformes de 6 a 24 μm de longitud por 3 a 10 μm de ancho. Tienen un núcleo anterior, una gran muesca citoplasmática cerca del polo anterior, tres flagelos anteriores y un cuarto flagelo corto que se mueve junto con la muesca citoplasmática. Los quistes son ovalados y miden de 6 a 10 μm de longitud. Contienen un núcleo y los orgánulos del trofozoíto (Taylor *et al.*, 2016).

Es habitual encontrarlo en el ciego y colon de numerosos primates, como macacos, vervets, orangutanes, chimpancés y otros, describiéndose una prevalencia de hasta un 26% (Sestak *et al.*, 2003).

Se le considera normalmente apatógeno, aunque, se ha asociado a casos de diarrea no se sabe si es el causante u oportunista (Kuntz, 1982).

El diagnóstico se realiza identificando los quistes o los trofozoítos en heces mediante técnicas coprológicas directas o mediante concentración por flotación. También pueden encontrarse al analizar el contenido intestinal durante una necropsia (Flynn, 2007).

1.2.2. Helmintos

Los primates no humanos son afectados por una gran cantidad de especies de helmintos muy variada. Sus ciclos biológicos pueden ser directos o indirectos y los niveles de patogenicidad varían en función de la especie. Pese a que su localización puede afectar diferentes órganos de los primates, los gastrointestinales son considerados los más patógenos (Kuntz, 1982).

1.2.2.1. *Strongyloides* spp.

Este género fue descrito por primera vez en primates en 1971 (McClure y Guilloud, 1971). En catarrinos, los más frecuentemente diagnosticados son *S. stercoralis*, *S. cebus* y *S. fülleborni* (Abbott y Majeed, 1984). Se han descrito en varias especies de PNH. En 1982, Harper y colaboradores lo identificaron en monos patas (*Erythrocebus patas*). En 2005, Krief y colaboradores lo describieron en chimpancés (*Pan troglodytes*). En 2012, Kooriyama y colaboradores lo diagnosticaron en vervets.

Los adultos de este género son filariformes, con medidas de 2 a 5 mm de longitud por 30 a 80 μm de ancho. Poseen un extremo caudal en punta, una pequeña cápsula bucal y un esófago cilíndrico que se extiende a lo largo del primer cuarto del parásito.

Los huevos miden de 40 a 70 μm de longitud por 20 a 35 μm de ancho (figura 15), poseen una fina cubierta, transparente, y están embrionados. Del huevo eclosiona, durante su tránsito en el intestino o después de ser eliminados en las heces, una larva rhabditiforme que mide entre 150 y 390 μm de longitud que rápidamente crece hasta 800 μm de longitud. La larva presenta un esófago muscular corto que termina en un bulbo precedido de un estrechamiento (Taylor *et al.*, 2016).

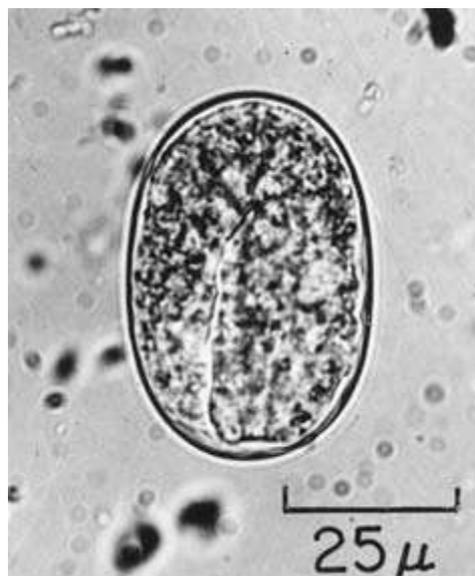


Figura 15. Huevo de *Strongyloides fülleborni* (Flynn, 2007).

Su prevalencia en cautividad puede llegar hasta un 23% (Flynn, 2007) aunque presenta diferencias significativas entre edades y sexos de mismas especies de primates. Es

más frecuente en hembras adultas del género *Cercopithecus* (Karere y Munene, 2002; Gillespie *et al.*, 2004), en machos adultos de colobo rojo (*Ptilocolobus kirkii*) (Gillespie *et al.*, 2005b), en macacos japoneses juveniles y geriátricos (Gotoh, 2000). En orangutanes juveniles menores de cinco años es superior que en individuos de más de ocho años (Labes *et al.*, 2010).

Es común en mono vervet y se considera de morbilidad moderada a grave y patogenicidad media (Kuntz, 1982).

Este parásito puede desarrollar su acción patógena afectando a la piel, a los pulmones o a nivel intestinal. En la piel, las larvas penetran la epidermis provocando irritación y dermatitis. En los pulmones, provocan inflamación del tejido pulmonar asociado a los trayectos parasitarios que desencadena sintomatología como tos, bronconeumonía, pericarditis y hemorragia pulmonar. En el intestino, produce disyunción del epitelio intestinal e inflamación de la lámina propia, pudiendo evolucionar a atrofia de las vellosidades. Se observará diarrea a veces hemorrágica, úlceras intestinales, anemia, hipoproteinemia, pérdida de peso e incluso la muerte. En casos graves, se ha observado invasión de tejidos adyacentes al intestino y de los linfonódulos mesentéricos. Los signos clínicos suelen mostrarse en parasitosis graves asociadas a fenómenos de autoinfección y en animales en situaciones de estrés (De Paoli y Johnsen, 1978; Kuntz, 1982; Abbott y Majeed, 1984; Janovy y Roberts, 1994; Chapman *et al.*, 2006a; Flynn, 2007).

El diagnóstico coprológico se puede realizar mediante técnicas directas en los casos que se elimina gran cantidad de huevos y larvas, o mediante técnicas de concentración, como la sedimentación con etil-acetato o la flotación con sulfato de zinc al 33% para los casos que eliminan menos formas parasitarias (Flynn, 2007; Greiner *et al.*, 2008).

1.2.2.2. *Protospirura sp.*

El tamaño medio de los vermes adultos es de 21 mm para los machos y de 35,5 mm para las hembras. Ambos poseen una gruesa cutícula con estrías transversales. La boca del parásito posee dos labios trilobulados con dos dentículos. El esófago se divide en una porción anterior muscular y una posterior glandular (Smales *et al.*, 2009). Los huevos eliminados en las heces son elipsoidales, larvados, con una cubierta gruesa rodeada de

sustancia hialina. Los huevos miden de 50 a 56 μm de largo por 37 a 42 μm de ancho (figura 16) (Petrželková *et al.*, 2006).



Figura 16. Huevo de *P. muricola*.

Parece que en roedores no es patógeno, pero en capuchinos se ha asociado a gastritis crónica e incluso perforación gástrica (Smales *et al.*, 2009). De forma general su patogenicidad se considera variable dependiendo de la especie de primate y en algunas especies como los chimpancés sigue siendo desconocida (Kouassi *et al.*, 2015).

Los ratones son su hospedador principal y se han descrito prevalencias que llegan al 70% (Behnke *et al.*, 2000; Smales *et al.*, 2009). Se ha documentado la infección por parte de este parásito en primates en general, chimpancés, colobo y mono vervet (Kuntz y Myers, 1966; Petrželková *et al.*, 2006; Petrášová *et al.*, 2010). Se ha observado mayor prevalencia de este parásito en primates que forrajean en basura que en los que no lo hacen. La basura, atrae a cucarachas y otros artrópodos que actúan como hospedadores intermediarios, los cuales pueden ser ingeridos por ratones, pero también por primates (Hahn *et al.*, 2003).

El diagnóstico se lleva a cabo identificando la morfología de los huevos en heces mediante técnicas de concentración físicas (Smales *et al.*, 2009; Kooriyama *et al.*, 2012).

1.2.2.3. *Oesophagostomum* spp.

Oesophagostomum spp. es el nematodo más frecuentemente encontrado en catarrinos como macacos, babuinos y mangabeys (Myers y Kuntz, 1972; McConnell *et al.*, 1974; Wong y Conrad, 1978) y grandes primates (chimpancés y gorilas). Se asume que la

especie de mayor prevalencia es *O. apiostomum*, aunque la diferenciación con *O. bifurcatum* y *O. stephanostomum* es difícil, por lo que estas otras especies deben de ser tenidas en cuenta (Flynn, 2007).

Su ciclo de vida es directo. Los huevos se encuentran en fase temprana de división cuando son eliminados en heces y si las condiciones ambientales son favorables eclosionan una larva en 24 a 48 horas. La infección se produce por la ingestión de la larva infectiva. Ésta profundiza en la mucosa del colon e induce el desarrollo de un nódulo encapsulado, en la submucosa o serosa del colon. El nódulo se rompe entre los cinco y ocho días posteriores y se libera el nematodo al lumen del colon, donde madura (Kuntz, 1982).

Los primates son susceptibles de infección por diferentes especies de *Oesophagostomum*. Tomando *O. apiostomum* como referencia, estableceremos que los vermes adultos miden de 8 a 10,5 mm de longitud por 0,2 a 0,3 mm de ancho. Los huevos eliminados en las heces, miden de 60 a 63 μm de longitud por 27 a 40 μm de ancho (figura 17).



Figura 17. Huevo de *Oesophagostomum* spp. (Flynn, 2007).

En el cercopiteco de cola roja (*Cercopithecus ascanius*) solo se ha descrito infectando a hembras adultas (Gillespie *et al.* 2004). En macacos japoneses se ha observado una prevalencia que alcanza hasta el 70% (Vickers, 1969) con mayor presencia en juveniles (Gotoh, 2000). Kuntz considera que es común diagnosticarlo en vervets con una morbilidad moderada y es raro que sea patógeno (Kuntz, 1982) aunque Orihel y Seibold le otorgan un alta morbilidad y patogenicidad (Orihel y Seibold, 1972).

En cuanto a su patogenicidad, depende del estado inmunitario y físico del hospedador (Kuntz, 1982). Se pueden observar úlceras, trayectos asociados al proceso de profundización de la larva en la mucosa y pequeños nódulos oscuros de unos 8 mm de diámetro. La respuesta inmune ante estos nódulos parasitarios, puede caseificarlos y calcificarlos (Flynn, 2007). En histopatología los parásitos se observan encapsulados en lesiones granulomatosas (Abbott y Majeed, 1984).

La sintomatología asociada a este parásito es inaparente en hospedadores levemente parasitados. En infecciones graves o en individuos inmunocomprometidos se observa: obstrucción intestinal, ascitis, debilidad, pérdida de peso, peritonitis, diarrea, melena y muerte (Kuntz, 1982; Chapman *et al.*, 2006b).

El diagnóstico se realiza identificando los huevos del parásito en las heces del hospedador mediante técnicas de coprología habituales. Es imposible la diferenciación de este género y de "hookworm" (*Necator* spp.) mediante criterios morfológicos por microscopía, por lo que para su diferenciación se debe realizar coprocultivo o diagnosticando los nódulos en el intestino. También puede encontrarse adultos en el intestino durante una necropsia (Taylor *et al.*, 2016).

1.2.2.4. *Schistosoma mansoni*

Es el único trematodo que afecta a primates descrito en el continente africano. Las especies a las que afecta son el babuino (Munene *et al.*, 1998; Howells *et al.*, 2011), el mono vervet (Muriuki *et al.*, 1998) y el colobo (Flynn, 2007).

A diferencia de en la mayoría de trematodos, que son hermafroditas, la hembra (mucho más fina que el macho) se introduce en cópula en una cavidad muscular del macho

llamado canal ginecóforo. El macho mide de 12 a 20 mm de longitud por 0,5 mm de ancho, mientras que la hembra mide de 15 a 30 mm de longitud por 0,1 a 0,3 mm de ancho.

Los huevos se pueden encontrar embrionados cuando se eliminan con las heces. Presentan características peculiares que facilitan su identificación, el tamaño es de 112 a 117 μm de longitud por 40 a 70 μm de ancho y presenta una espina terminal característica (figura 18).

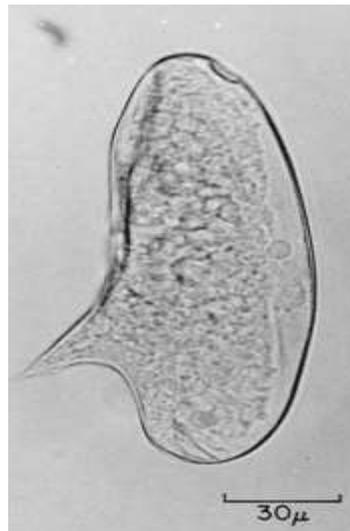


Figura 18. Morfología y tamaño de huevo de *Schistosoma mansoni* (Flynn, 2007).

Los adultos de este parásito residen en las venas mesentéricas del intestino delgado. Son sus huevos los que ocasionan la patogenia del parásito al acumularse en los vasos mesentéricos o migrar hacia la vejiga e intestino pudiendo dar reacciones de cuerpo extraño y émbolos. Se pueden encontrar granulomas provocados por la migración errante de huevos a órganos como cerebro, bazo o el hígado. Los síntomas que provoca son fiebre, diarrea hemorrágica, hematuria y ascitis (Flynn, 2007).

El diagnóstico se lleva a cabo detectando los huevos en heces u orina. Para su diagnóstico en heces se prefiere la técnica directa o la concentración por sedimentación formalina-éter. Se dispone de PCR diseñadas para su diagnóstico, pero su alta presencia de huevos en heces reduce su utilidad (Flynn, 2007; Howells *et al.*, 2011; Taylor *et al.*, 2016).

1.2.2.5. *Ascaris lumbricoides/suum*

Es el nematodo más grande descrito en primates no humanos. Las hembras llegan a medir 40 cm mientras que los machos alcanzan los 30 cm. Parasitan el intestino delgado de los primates y presentan dimorfismo sexual. El polo caudal del macho se enrolla mientras que el de la hembra se mantiene recto. Los huevos se eliminan en las heces del hospedador y presentan una cubierta mamilada característica (figura 19) (Bethony *et al.*, 2006).

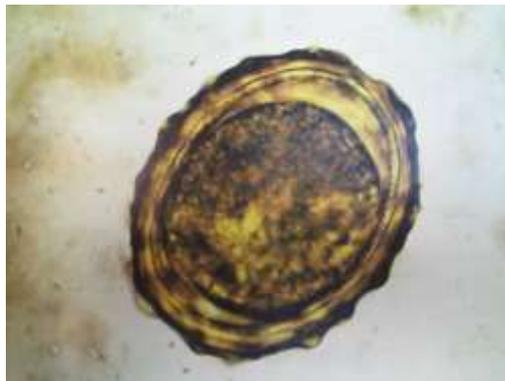


Figura 19. Huevo de *Ascaris lumbricoides* (Taylor *et al.*, 2016).

La patogenia se debe tanto a la migración de las larvas, por el hígado y pulmón, produciendo sintomatología hepática y respiratoria, como por el adulto en el intestino delgado pudiendo llegar a la obstrucción y perforación del intestino (Taylor *et al.*, 2016).

Las especies de primates no humanos en las que se ha descrito son muy variadas: tamarinos (Wenz *et al.*, 2010), macacos (Jones-Engel, 2004), orangutanes (Labes *et al.*, 2010) y babuinos (Howells *et al.*, 2011).

Su diagnóstico se centra en la observación de los huevos característicos en heces mediante técnicas de microscopía. Las hembras tienen un alto poder de oviposición por lo que las posibilidades de observar los huevos en heces son altas (Bogitsh *et al.*, 2013).

1.2.2.6. *Trichuris trichiura*

Esta especie de parásito tiene como hospedadores a los PNH y al humano (Taylor *et al.*, 2016). En el caso de los PNH ha sido ampliamente descrito en chimpancé y vervet (Kooriyama *et al.*, 2012), colobo (Teichroeb *et al.*, 2009), macacos (Broadhurst *et al.*, 2012) y gorila de montaña (Sleeman *et al.*, 2009) tanto en cautividad como en semilibertad y

estado silvestre. Debido a sus implicaciones zoonóticas se ha estudiado su prevalencia en primates en función de la cercanía al humano, encontrado correlaciones positivas (Wenz *et al.*, 2010). También se ha descrito la estacionalidad de esta parasitosis en colobos (Teichroeb *et al.*, 2009). Se ha descrito mayor prevalencia de este parásito en monos del nuevo mundo que en grandes primates, postulándose que estos últimos pudieran tener cierta resistencia a la infestación (Kooriyama *et al.*, 2012).

La morfología de los huevos de este parásito es peculiar al tener una forma claramente ovalada con ambos polos muy marcados, sus medidas medias son de 85 x 28 μm (Sleeman *et al.*, 2009).

La patogenicidad de la infección es debida al daño mecánico que provocan los adultos al anclarse sobre la mucosa del colon. Lo que ocasiona erosiones del epitelio y hemorragias (Bogitsh *et al.*, 2013).

La sintomatología es variable, desde ausente en infecciones leves hasta diarrea, hemorragias intestinales, anorexia y muerte en infecciones graves. Además, el daño del epitelio intestinal puede favorecer infecciones bacterianas secundarias que agravan el cuadro (Bogitsh *et al.*, 2013; Taylor *et al.*, 2016).

El diagnóstico se lleva a cabo observando los huevos característicos en las heces de los animales infestados. Para este fin se han utilizado técnicas directas (Gómez *et al.*, 1996) y de concentración, como la flotación (Sleeman *et al.*, 2009; Teichroeb *et al.*, 2009) y la sedimentación con formalina-éter (Kooriyama *et al.*, 2012). También se ha utilizado la secuenciación de ADN mitocondrial para mejorar los conocimientos acerca de las especies del género *Trichuris* (Broadhurst *et al.*, 2012).

1.3. Técnicas de diagnóstico de parásitos gastrointestinales

Las técnicas de diagnóstico parasitológico del tracto gastrointestinal, son procedimientos que pueden utilizarse como instrumentos de ayuda para el diagnóstico del parasitismo en el esófago, estómago, hígado, conductos biliares e intestino delgado y grueso. Permiten el diagnóstico etiológico de la mayoría de elementos parasitarios intestinales por medio de la identificación morfométrica de las formas evolutivas que se eliminan con las heces. Las formas parasitarias que podemos encontrar junto a la materia fecal son adultos, huevos, larvas, ooquistes, quistes, trofozoítos.

En la mayoría de los protocolos descritos para el diagnóstico coproparasitario se aconseja realizar el examen en tres muestras seriadas tomadas en días alternos ya que las hembras de los parásitos no eliminan huevos todos los días. Por tanto, la presencia de huevos de parásitos, en las heces de los hospedadores, no es constante. Al igual que el resto de formas parasitarias, donde su excreción suele ser irregular (Hall, 1919; Pit, 1999).

Varias opciones están disponibles para el examen de las muestras fecales dependiendo de las capacidades del laboratorio, del tiempo disponible y de la información deseada (Ash y Oriel, 2010).

1.3.1 Técnicas macroscópicas directas

El examen macroscópico es sencillo de realizar y muy económico ya que no se necesita gran equipamiento para poder realizarlo y aporta una información muy valiosa sobre las heces. Las características organolépticas de las heces son el resultado de los procesos fisiológicos que ocurren durante el procesado de los alimentos. Desde el momento en el que animal comienza con el masticado de la comida, el resultado de las heces empieza a determinarse. Un mayor triturado (es decir un mayor masticado) facilitará la digestión frente a trozos de mayor tamaño que pueden dificultar la digestión, observándose incluso, pedazos de los alimentos sin digerir en las heces. La composición de la ingesta, la masticación, la saliva, la secreción de jugos gástricos, así como la propia digestión, el peristaltismo, la absorción de nutrientes y el tiempo que tarde el alimento en recorrer el

tubo digestivo, determinan el aspecto de las heces resultantes. Estas funciones pueden estar modificadas por causas mecánicas, tumorales, degenerativas o infecciosas (virales, bacterianas o parasitarias) (Rousset, 1993).

Hay varias características muy importantes que pueden apreciarse “a simple vista”.

La consistencia. La descripción de la consistencia varía según la especie de animal. Por ejemplo, las heces del ganado bovino, generalmente, son más blandas que las de los caballos o primates. En una misma especie, la consistencia depende principalmente de la dieta y del tiempo que haya permanecido en el colon, es decir de la velocidad de tránsito intestinal. Existen diferentes escalas que describen y clasifican la materia fecal en distintos tipos. Por ejemplo, la escala de heces de Bristol (Amarengo, 2014) que cataloga en 7 tipos las heces humanas en función de su consistencia (tabla 1). Según esta escala las heces ideales son las de tipo 3 y 4.

Tabla 1. Escala de Bristol adaptada a las heces de *C. pygerythrus*.

Tipo	Imagen	Descripción
Tipo 1		Heces secas que se componen de trozos separados y duros al tacto. Son frecuentes cuando el animal está estreñido y tiene dificultad para defecar.
Tipo 2		Los trozos de heces son visibles, pero se mantienen agregados formando heces llenas de bultos. Las heces siguen presentando resistencia cuando se intenta deformar e indican dificultad en la defecación.
Tipo 3		Los trozos de heces no son fácilmente visibles y la superficie es más lisa, aunque presenta algunos surcos en ella.
Tipo 4		Los trozos que componen las heces ya no son visibles y la consistencia es más blanda debido a la cantidad de humedad que alberga.
Tipo 5		Las heces están compuestas de varios trozos, pero con alto contenido en humedad. La consistencia es semejante a la de la "pasta de dientes", es decir sigue guardando la forma, pero es muy blanda. Puede indicar diarrea.
Tipo 6		Las heces pastosas que pierden la forma, pero guardan mayor consistencia que los líquidos.
Tipo 7		Las heces diarreicas completamente líquidas sin trozos sólidos.

El color. Los principales responsables de la coloración de las heces son las sales biliares presentes en las heces y los alimentos ingeridos. La dieta puede dar colores “anormales” sin que indique una patología, pero es importante indicarlo (Hendrix, 1999). Las coloraciones que pueden adquirir las heces son las siguientes:

Marrón: Es el color ideal de las heces de la mayoría de los mamíferos.

Amarillo (o pálidas). Puede ser debido a la ausencia de bilis en las heces, indicando problemas que ocasionan obstrucciones biliares o disminución de la lipasa pancreática, entre otros. Si se tratan de heces diarreicas y amarillentas pueden ser causadas por coccidios.

Negro (u oscuras): La presencia de sangre digerida en las heces melénicas dará una coloración de marrón muy oscuro a negro alquitranado. Los arándanos pueden confundir, al igual que un consumo alto de hierro o carbón, la presencia de sangre puede indicar un parasitismo grave, así como otras enfermedades intestinales.

Rojo: Pueden indicar un sangrado en el último tracto del sistema digestivo (intestino grueso o recto) pero también puede ser debido a la ingesta de remolacha.

Verde: Puede deberse a tránsito intestinal demasiado rápido donde las enzimas no han permitido el cambio de color de la bilis de verde a marrón (presencia de biliverdina). Los vegetales verdes como las acelgas, suplementos de hierro o ciertos medicamentos también pueden provocar esta coloración.

El olor. Las heces adquieren su olor debido a la dieta y a las bacterias que mediante la fermentación producen gases que pueden dar un determinado olor a las heces, los más característicos son los olores fétidos como el provocado por el ácido butírico (Bruorton *et al.*, 1991). Este tipo de olores también pueden ser indicativos de alguna patología que puede ir acompañado de otros síntomas como la ictericia. Tanto los cambios de alimentación como el síndrome de malabsorción, infecciones intestinales, pancreatitis crónica pueden afectar en el olor de las heces y cambiar el equilibrio de flora intestinal que a su vez altera el olor de las heces. Puede que se trate de la característica más complicada de identificar de forma objetiva.

Presencia de elementos anormales.

Presencia de sangre. Si la cantidad de sangre es abundante la totalidad de la materia fecal adquirirá una coloración determinada dependiendo del lugar de sangrado. Pero si la cantidad de sangre es escasa, las heces pueden aparecer con vetas de gamas de color rojo vivo a negro. Si la lesión está localizada al principio del tracto digestivo, la sangre aparece mezclada con las heces mientras que, en lesiones del final del digestivo, la sangre envuelve las heces. Existen diferentes causas para la presencia de vetas de sangre en las heces como ancilostomosis, úlceras en el sistema digestivo y colitis. (Kubab *et al.*, 2006).

Presencia de mucus. Se trata de una sustancia gelatinosa que cubre la pared del colon. Permite mantener la pared lubricada y facilita el tránsito de las heces. Una pequeña cantidad de mucus junto a las heces se considera normal. Mientras que una presencia abundante puede asociarse con parasitismo intestinal o con algún tipo de patología metabólica (Hendrix, 1999).

Presencia de trozos de alimentos. Encontrar trozos de alimentos en las heces, significa que el organismo no los ha digerido. Dependiendo de la naturaleza del alimento es normal que no se absorban como es el caso de la fibra. En el caso de otros alimentos como trozos de frutas no siempre tiene que ser patológico, pero puede indicar que existe una mala digestión con etiologías diferentes. La causa puede localizarse en distintos momentos del procesado de alimentos. Por ejemplo, si el animal padece de alguna patología dental masticará menos los alimentos.

Presencia de parásitos o pseudoparásitos. Ciertas formas parasitarias son excretadas junto a las heces, algunos parásitos, porciones de ellos o sus larvas son lo suficientemente grandes como para ser detectados a simple vista (Hendrix, 1999). Los endoparásitos suelen carecer de pigmentos y suelen resistir a las enzimas del hospedador por lo que se suelen encontrar junto a las deposiciones de los hospedadores (Mehlhorn y Cordero del Campillo, 2001).

El examen macroscópico de las heces aporta una información muy valiosa, pero no permite la detección de muchos parásitos. Esto se debe a que las formas parasitarias

detectables por el ojo humano, son muy escasas. Por ello, es esencial combinarla siempre con un examen al microscopio.

Todos los exámenes microscópicos añaden más información a las características organolépticas de las heces. Muestran características de la estructura microscópica de las heces ayudando a conocer la dieta del animal y aportando información adicional sobre la composición y el estado de los elementos que la componen. Con la ayuda de un microscopio, se pueden observar los restos de almidón, de bilirrubina o de sus metabolitos (estercobilina), de celulosa y otros elementos que pueden aparecer como flora yodófila, parásitos, polen, etc.

1.3.2. Técnicas microscópicas directas

El examen directo de las heces se utiliza desde hace varios siglos. En el siglo XVIII, Antonio Van Leeuwenhoek ya determinó la presencia de trofozoítos de *G. duodenalis* en sus propias heces. Se trata de unas técnicas muy sencillas de realizar. El tiempo de procesamiento es muy breve y los materiales necesarios son relativamente económicos y fáciles de encontrar, en comparación con las otras técnicas coproparasitarias. Para realizar estas técnicas, es conveniente seleccionar la porción a examinar de distintas partes de la muestra fecal, favoreciendo las zonas que presentan anomalías como mucosidad sanguinolenta (Bailenger y Faraggi, 1973). El procedimiento consiste en emulsionar sobre un portaobjetos una pequeña porción de heces frescas y una gota de solución para diluir. La solución salina (0,85% NaCl) es muy utilizada ya que permite, si las heces son recientes, detectar el movimiento de amebas, flagelados, larvas de nematodos y similares (Bowman, 2010).

Las mismas soluciones pueden ser efectuadas con una solución de lugol (yodo, 2 g; yoduro potásico, 4 g; agua destilada, 100 mL) (Portillo *et al.*, 1997). En este caso, los protozoos perderán su movilidad rápidamente, pero la cromatina de los núcleos se coloreará permitiendo identificarla muy fácilmente (Bowman, 2010). La tinción con yodo es el método más sencillo para la tinción de quistes de protozoos (Hendrix, 1999).

Además, con la solución de lugol, se pueden valorar otros parámetros, como la cantidad de flora yodófila (se tiñe de marrón y suele aparecer en mayor cantidad en heces

diarreicas) o el estado de digestión de ciertos elementos como los hidratos de carbono (tabla 2). Según su desintegración a lo largo del proceso digestivo, el almidón se observará con tonalidades diferentes (Portillo *et al.*, 1997; Bowman, 2010).

Tabla 2. Tipos de coloración del almidón en presencia de lugol.

Estado del almidón	Coloración
Almidón crudo	Azul-violáceo intenso a negro (Más o menos desintegrados por el proceso digestivo)
Eritrodextrina (almidón semidigerido)	Violeta rojizo o rosa
Acrodextrina (fase avanzada de digestión)	Amarillo

En el examen directo de las heces, con o sin lugol, si la carga parasitaria es elevada, se identificará con bastante sencillez. El problema surge cuando no se observan ningún parásito que no se debe considerar que el animal no esté parasitado. Al utilizar un tamaño de muestra tan pequeño, no es muy fiable ni representativo del global de la muestra (Ash y Orihel, 2010) aunque no por ello carecen de utilidad. Algunos autores sugieren que diez exámenes directos bien efectuados son bastante más interesantes y más fiables que dos concentraciones examinadas rápidamente. Además, las técnicas directas han sido descritas como idóneas para el diagnóstico de protozoos móviles (Dryden *et al.*, 2005). Por ejemplo, en un estudio comparado de varias técnicas, el examen directo con lugol encontró tres protozoos diferentes mientras que la otra técnica dio negativo (Zanzani *et al.*, 2014).

Si se diluyen las heces con la solución salina fisiológica, el movimiento de los trofozoítos se mantiene y será más fácil reconocerlos. *B. coli*, nada de forma lenta, balanceándose. *G. duodenalis*, se mueve con movimientos bruscos, *Trichomonas* spp., ondula la membrana al moverse. Mientras que las amebas extienden el pseudópodo y a continuación el resto del cuerpo (Hendrix, 1999).

Como norma, las técnicas de concentración deben completar en lugar de sustituir al examen en fresco, pero habitualmente solamente se adopta una de ellas (Bowman, 2010).

De hecho, en heces formadas, algunos laboratorios, han eliminado las técnicas en fresco en favor de técnicas de concentración. El uso de procedimientos de concentración (o enriquecimiento) para el examen de heces prácticamente asegura la detección de organismos incluso en pequeñas cantidades que no serían fácilmente detectados con exámenes directos (Ash y Orihel, 2010).

Aunque se han descrito muchos procedimientos de concentración, por lo general se suelen utilizar los métodos físicos. Entre éstos, las técnicas de flotación y sedimentación son muy utilizadas para la determinación de parásitos intestinales. Las técnicas de enriquecimiento pretenden, a partir de una gran cantidad de materia fecal, concentrar en un menor volumen una gran cantidad de las formas parasitarias y eliminar los residuos de la digestión de manera que pueda ser examinado por el microscopio (Rousset, 1993; Hendrix, 1999). Aumentan, por tanto, el número de parásitos en una zona precisa de la preparación, separando las partículas sólidas de una fase líquida en la que se les ha previamente introducido. Permiten la agrupación de formas parasitarias en función del peso por unidad de volumen, es decir en función de la densidad. La densidad se expresa en forma de gravedad específica (SG) y relaciona el peso de un elemento con el peso de un volumen idéntico de agua pura (Bowman, 2010). Por ello, la elección de la densidad de la solución a utilizar es clave. En el caso de la flotación se emplean soluciones densas ($SG > 1,0$), de modo que los sólidos con menor densidad, ascienden a la superficie. En el caso de la sedimentación, se utilizan soluciones menos densas ($SG < 1,0$) donde los objetos de mayor densidad, se acumulan en el fondo del recipiente (Truant *et al.*, 1981; Navone *et al.*, 2005; Mariano *et al.*, 2012).

1.3.3. Métodos por flotación

El procedimiento de la flotación varía desde métodos cualitativos muy sencillos hasta métodos cuantitativos más complejos. Los métodos sencillos se basan en llenar un cilindro con el medio de solución y la muestra de heces y dejarlo reposar un tiempo. Este reposo, permite que ciertos elementos asciendan hasta la superficie, reteniendo los restos fecales en el fondo. A continuación, se toma una muestra de la parte superior, se traslada a un portaobjetos y finalmente, se procede a su observación al microscopio óptico. Los métodos

más completos combinan el principio básico de la flotación simple con cámaras de conteo para convertir el método cualitativo en cuantitativo como puede ser la cámara de Mc Master o la técnica de Mini-flotac® (Gómez *et al.*, 1996; Dryden *et al.* 2005; Ballweber *et al.*, 2014; Barbosa *et al.*, 2015).

Los métodos de flotación se basan en las diferencias de densidades entre los huevos, la materia fecal y la solución de flotación. Para que los huevos y ooquistes floten deben tener una densidad menor a la densidad del medio. De forma ideal, los huevos, quistes y ooquistes deberían flotar manteniendo su morfología, mientras que los restos fecales deberían hundirse en el medio de flotación facilitando la detección de las formas parasitarias (Dryden *et al.*, 2005; Ash y Orihel, 2010; Bowman, 2010; Katagiri y Oliveira-Sequeira, 2010).

Varios estudios demuestran que pueden existir individuos infectados que son diagnosticados como libres de patógenos debido a una mala elección del método de diagnóstico. Cuanto mayor sea el caso de falsos negativos menor será la sensibilidad de la técnica. La sensibilidad depende de la destreza del observador, de la técnica utilizada, del componente de la solución de flotación elegida y de la especie de parásito que se pretende diagnosticar. Se han encontrado diferencias significativas entre los resultados obtenidos para la sensibilidad de soluciones con distintas densidades y con soluciones de naturaleza diferente (Cringoli *et al.*, 2004; Christie *et al.*, 2011).

A la hora de decidir el medio de flotación a utilizar hay que tener en cuenta todas sus características. El pionero en la utilización de una solución de flotación en parasitología parece que fue Koutz en 1941. A partir de ese momento se desarrollaron una multitud de soluciones con características diferentes. Como ya se ha mencionado, es importante la elección de la gravedad específica de la solución que permitirá o no que asciendan unas u otras formas parasitarias presentes. Pero, no hay que olvidar los componentes de la solución ya que son los responsables de las características físicas del medio de flotación. Por ejemplo, la solución de sacarosa saturada es más viscosa que otras soluciones a la misma densidad. Estas peculiaridades demuestran la importancia de realizar una buena elección de la solución de flotación entre todas las descritas en la literatura para obtener una sensibilidad adecuada (Stoll, 1930; Farr y Luttermoser, 1941; Koutz, 1941; Bello, 1961; Dryden *et al.* 2005; Ballweber *et al.*, 2014).

En general, los procedimientos basados en el principio de flotación hacen que la mayoría de los quistes de protozoos y muchos de los huevos de nematodos y cestodos floten con relativa facilidad en las soluciones que se suelen utilizar. La densidad de la mayoría de los huevos de estos parásitos esta entre 1,05 y 1,23 (David y Lindquist 1982) encontrándose principalmente acotados entre 1,1 y 1,2. El problema radica en que algunos huevos de trematodos y de cestodos no flotan debido a su alta gravedad específica, en que los trofozoítos de los protozoos y algunas larvas de nematodos se deterioran, impidiendo ser diagnosticados (Ash y Orihel, 2010; Bowman, 2010).

Las técnicas de flotación consisten en realizar una suspensión de un volumen de materia fecal, en un frasco de boca ancha, con una solución de flotación. Tras homogenizar las heces en la solución se procede a su filtrado. Posteriormente, se llena el recipiente con la mezcla homogenizada hasta formar un menisco en el borde superior del recipiente. A continuación, se puede depositar un cubreobjetos en la boca del recipiente, evitando que queden atrapadas burbujas de aire y que toda la superficie del cubreobjetos entre en contacto con la solución. Se deja reposar durante un tiempo determinado y se toma el cubreobjetos con cuidado para colocarlo sobre un portaobjetos. En otras ocasiones, en vez de utilizar un cubreobjetos se puede recoger la parte superficial del menisco con la ayuda de un asa estéril o una pipeta Pasteur. Y, con la ayuda de un microscópico, se examinan con el objetivo de 10X y 40X, todos los campos en la búsqueda de formas parasitarias, añadiendo o no una gota de colorante (Hendrix, 1999; Dryden *et al.*, 2005; Gillespie, 2006; Bowman, 2010; Taylor *et al.*, 2016).

Como ya se ha mencionado, las densidades específicas de la mayoría de los huevos de parásitos, presentan una densidad específica comprendida aproximadamente entre 1,1 y 1,2 g/mL, mientras que el agua corriente contiene una densidad levemente superior 1 g/mL. Motivo por el cual los huevos de parásito no flotan en el agua y se utilizan soluciones de flotación con densidades superiores a la de los huevos. Las diferentes soluciones de flotación están compuestas por agua (que puede ser destilada o no), a la que se le añade un concentrado de varias sales o de azúcar, para aumentar su densidad hasta estar comprendidas entre 1,15 y 1,55 aunque por lo general se buscan gravedades específicas entre 1,18 y 1,30. Con estas densidades se consigue que la mayor parte de material fecal no

flote, ya que tiene una densidad igual o superior a 1,3 (Stoll, 1930; Mayhew, 1962; Parfitt, 1969; O'Grady y Slocombe, 1980; Egwang y Slocombe, 1982; Cringoli *et al.*, 2004; Cebra y Stang, 2008; Vadlejch *et al.*, 2011).

Entre los diferentes medios de flotación más utilizados en veterinaria se encuentran la compuesta por azúcar (solución de Sheather), la solución de cloruro sódico saturado (sal de mesa), la solución de sulfato de magnesio (sal de Epsom), la solución de sulfato de zinc y la de nitrato sódico. Su elección depende de la preferencia personal, de la disponibilidad de los reactivos y de los parásitos que se quieren aislar. A continuación, se detallan las características de estas soluciones según las descripciones de varios autores (Hendrix, 1999; Dryden *et al.*, 2005; Bowman, 2010).

Solución saturada de fructosa o de azúcar (Sheather).

- La gravedad específica de esta solución está comprendida entre 1,27 y 1,33.
- Calentar, evitando la ebullición, 350-355 mL de agua destilada y mezclar 450 - 454 g de azúcar hasta conseguir que se disuelvan completamente. Se puede agregar 6 mL de formaldehído al 40% o 1 g de fenol cristalizado por cada 100 mL de solución que servirá de conservante.
- El tiempo de reposo necesario para que floten las formas parasitarias es entre 15 y 20 minutos dependiendo de la altura del tubo.
- La viscosidad de la solución dificulta una buena homogenización con el sedimento y que algunos huevos floten. No deforma los huevos de los vermes redondos.

Solución de cloruro sódico saturado (sal de mesa).

- La gravedad específica debe de ser entre 1,8 y 1,20.
- Se trata de una solución salina saturada. Esta se consigue disolviendo 350 g de sal en un litro de agua destilada. En otros casos se aconseja añadir cloruro de sodio a agua hirviendo hasta que ya no se disuelva y se acumule en el fondo.

- El tiempo de espera para que las formas parasitarias asciendan y se adhieran a la parte inferior del cubreobjetos es de 10 – 15 minutos dependiendo de la altura del tubo.
- Se trata de una buena técnica para identificar nematodos, y algunos cestodos a excepción de los huevos de *Pseudophylidea* que no flotan en esta solución (Sixtos y Virbac, 2010).

Solución de sulfato de magnesio (sal de Epsom).

- La gravedad específica de esta solución se sitúa entre 1,20 y 1,3.
- Para preparar la solución es necesario añadir, sin dejar de remover, sulfato de magnesio a un litro de agua. Algunos autores como Dryden indican que es necesario 450 g mientras que Hendrix recomienda 350 g de sulfato de magnesio por cada litro de agua. No es necesario calentar la solución, pero acelera la disolución.
- Se requiere entre 10 y 15 minutos para que los huevos se adhieran al cubreobjetos.

Solución de sulfato de zinc.

- La gravedad específica de esta solución se encuentra entre 1,18 y 1,25.
- Para realizar este método se utiliza la preparación de Faust que consiste en una solución de zinc al 33%. Para ello hay que diluir 331 g de sulfato de zinc en un litro de agua. En el caso de querer alcanzar densidades superiores (SG 1,2 – 1,25) añadir 386 g de sulfato de zinc por cada litro de agua. No es necesario calentarlo, pero acelera la disolución.
- Se requiere de entre 10 y 15 minutos para que los huevos se adhieran al cubreobjetos.

Las estructuras de los quistes de protozoos no se ven afectadas por esta solución y se concentran adecuadamente al igual que los huevos y las larvas de helmintos. Pero no es

conveniente utilizarla en el caso de sospechar de huevos pesados (Por ejemplo, los de *Taenia* spp.) ya que estos no flotarán.

Solución de nitrato sódico.

- La gravedad específica que se quiere conseguir con esta solución es entre 1,18 y 1,25.
- Para obtener densidades de entre 1,18 y 1,2, mezclar 315 g de nitrato sódico con un litro de agua destilada. Si se quiere conseguir densidades más altas mezclar 338 g de nitrato de sodio por cada litro de agua. El calentamiento de la solución facilita la disolución, pero no es necesario.
- Se requiere de unos 10 minutos para que los huevos se adhieran al cubreobjetos.
- Hay que examinarlo rápidamente, de lo contrario la cristalización del medio y la distorsión osmótica pueden dificultar la identificación de las formas parasitarias.

Sea cual sea la solución y la densidad elegida la mejor manera de asegurar la gravedad específica del medio de flotación es mediante el uso de un densímetro. Los más adecuados son los que permiten determinar rangos de densidad entre 1,00 y 1,40.

Se cree que el origen de las técnicas de flotación se remonta a Stoll. En 1923, realizaba un examen directo añadiendo a la muestra una cantidad de diluyente y lo observaba al microscopio. Probablemente sea la primera dilución que se realizó donde se tuvo en cuenta el factor de dilución para el cálculo de la concentración de huevos por gramo de heces. Lane introduce la fase de lavado de la muestra. En 1924, propone otra técnica donde un gramo de heces era sometido a un lavado con agua para quitar las partículas de mayor tamaño y posteriormente se le añadía un fluido pigmentado y se realizaba una flotación para observarlo a continuación en un cubreobjetos. En 1930, Stoll propone una modificación de su técnica. Añade una fase de lavado, poniendo diez gramos de heces en 300 mL de agua. A continuación, llena con el sobrenadante uno o dos tubos de 15 mL y lo

centrifuga durante un minuto a 1000 rpm. El sedimento lo mezcla con cloruro sódico (SG 1,2) en un tubo colocando un cubreobjetos en contacto con el líquido.

El lavado permite un mejor visionado de las formas parasitarias, pero aparecen nuevas técnicas sin fase de lavado junto con estudios que demuestran que al eliminar la fase de lavado la sensibilidad de la técnica es superior. Por lo que se volvió a la flotación en un paso, eliminando la fase de lavado, pero añadiendo un tiempo de centrifugación que cambiaba en función del autor o de la especie de la que procedía la muestra de heces. El tiempo de suspensión para permitir a las formas parasitarias ascender a la superficie también varía de una técnica a otra (Cox y Todd, 1962; Egwang y Slocombe, 1982; Foreyt, 2001; Dryden *et al.*, 2005; Bello y Allen, 2009; Zajac y Conboy, 2012).

En la actualidad se pueden encontrar diversos kits de flotación fecal disponibles en el mercado. Algunos como Fecalyzer® y Ovatector® (figura 20) son cilindros de flotación semejantes a un tubo de ensayo, pero con distintas dimensiones. Otros como Mc Master o Mini-flotac® son cámaras de pequeña capacidad que permite cuantificar las formas parasitarias encontradas. En el caso de los primeros, los kits de flotación suelen suministrarse con todo lo necesario para realizar el examen: cuchara para realizar la toma de muestras, varilla para homogeneizarla, colador, cilindro de flotación y solución de flotación. El único material no facilitado es el cubre y el portaobjetos. Mientras que, en el caso de los segundos, suelen venderse únicamente las cámaras.



Figura 20. Kit de flotación Ovatector®.

1.3.4. Métodos por sedimentación

Las técnicas de sedimentación se utilizan habitualmente para identificar elementos demasiado pesados o elementos que se distorsionan mediante los métodos de flotación. Se pueden utilizar tanto muestras frescas como conservadas y se trata de separar las partículas más pesadas por medio de un asentamiento gravitacional. Gracias a la utilización de soluciones de baja densidad (agua; SG 1) se pueden recuperar, en el fondo del recipiente, formas parasitarias más densas como ciertos huevos, larvas, ooquistes y quistes. Por el contrario, los elementos menos densos que la solución, como los restos de fibras, se quedarán en suspensión. Al igual que en los métodos de flotación, las características fisicoquímicas de los elementos parasitarios tienen un papel esencial. En efecto, la concentración de huevos está favorecida por el carácter hidrófilo de los huevos. La sedimentación se puede lograr mediante centrifugación o mediante el uso simple de la gravedad. La sedimentación espontánea es poco práctica debido a la lentitud del proceso, pero puede resultar de gran utilidad en laboratorios de campo cuando el acceso a la electricidad es restringido o no se dispone de centrífuga (Taylor *et al.*, 2016).

El sedimento obtenido suele contener los parásitos presentes en las heces procesadas y los restos fecales. Estos, pueden ser excesivos y enmascarar la presencia de parásitos. Para una mejor visualización de los parásitos, es necesario diluir una o dos gotas del sedimento con una o dos gotas de solución salina al 0,85% para reducir la densidad de las partículas en la preparación. También se pueden diluir con colorantes, como el yodo, que facilitarán la detección de quistes de protozoos (Ash y Orihel, 2010).

La sedimentación ha demostrado ser especialmente adecuada para el diagnóstico de huevos de trematodos (Boray, 1969; Rojo-Vázquez *et al.*, 2012) y acantocéfalos, amebas, ciliados y quistes de *G. duodenalis*. Por el contrario, muestra una menor sensibilidad ante huevos de nematodos y ooquistes de coccidios, larvas de nematodos. Para aumentar la sensibilidad de las técnicas se debe examinar por lo menos la mitad del sedimento al microscopio (Bowman, 2010).

En 1930, Faust describe una primera técnica de sedimentación utilizando agua del grifo como líquido de dilución. En 1946, Faust y Ingalls sustituyen el agua de grifo por una

solución acuosa de glicerina al 0,5%. Pero ambas técnicas necesitan entre 30 y 45 minutos para que las formas parasitarias sedimenten. Con el fin de mejorar la detección de huevos de parásitos se propusieron ciertas modificaciones en el líquido de dilución. Jahnes y Hodges (1947) utilizando alcohol etílico al 10%, Ritchie (1948) utiliza éter y formalina, Euzéby (1956) propone añadir un detergente, Teepol 1%, al agua. Posteriormente, Barrody y Most utilizan una etapa de centrifugación para disminuir el tiempo de sedimentación y Boray y Pearson añaden un azul de metileno como colorante (Happich y Boray, 1969; Bailenger y Faraggi, 1973).

1.3.4.1. Sedimentación de etil-acetato-formalina o formalina-etilacetato

A veces también es llamada como la sedimentación de Ritchie (Petrželková *et al.*, 2006; Hernandez y MacIntosh, 2009) pero hay que tener cuidado puesto que han salido varias modificaciones después de haber sido descrita por Ritchie en 1948.

La preocupación con el almacenamiento y el uso del éter, un material potencialmente inflamable y explosivo, en el laboratorio ha llevado a su sustitución por etil-acetato. El acetato de etilo ha demostrado ser más seguro que el éter e igual de eficaz en la recuperación de los parásitos presentando una sensibilidad y fiabilidad similar o incluso superior en el diagnóstico de *G. duodenalis*, *Taenia* spp. y *Hymenolepis nana*. Estos huevos y quistes parecen tener menor tendencia a quedar atrapados en el sedimento. Un inconveniente del acetato de etilo es que, en heces frescas, no es tan eficiente como el éter en la extracción de la grasa y el material mucoide (Young *et al.*, 1979; Ash y Orihel, 2010).

Se trata de un método muy utilizado en laboratorios de Salud Pública para la identificación de huevos, quistes y larvas ya que permite la concentración de huevos y quistes sin deformarlos. Es necesario utilizar varios reactivos y soluciones como el cloruro de sodio, formaldehído en solución, éter etílico comercial y una solución salina isotónica. El formol conserva las heces, detiene o enlentece el desarrollo de la mayoría de los parásitos y reduce el mal olor de las muestras fecales. El acetato de etilo elimina las grasas, pigmentos y otras sustancias que pueden interferir en la detección de los elementos parasitarios (Bowman, 2010).

Se trata de un método ampliamente descrito en la literatura y con un sinnúmero de modificaciones. En general, el método consiste en homogeneizar unos gramos de heces con agua, solución salina o formol al 10%. El resultante se pasa a través de un filtro, colador o gasa y el líquido recolectado se centrifuga a una velocidad determinada, se decanta el sobrenadante y se resuspende el sedimento varias veces. Se deja reposar y se le añaden unos mililitros del reactivo utilizado. A continuación, se agita enérgicamente durante unos segundos y se vuelve a centrifugar.

En el tubo se pueden observar cuatro capas (figura 21). La primera está formada por el éter (o el reactivo que lo remplace) que se queda en la superficie. La segunda es un tapón de restos fecales y con gran contenido en grasa. La tercera capa será el formaldehído utilizado. En el fondo del tubo, se encuentra el sedimento donde estarán los elementos parasitarios. Con la ayuda de una pipeta Pasteur se extrae una gota del sedimento directamente o se rompen las tres primeras capas, se voltea el tubo de sedimentación y se decanta el sobrenadante. Por último, se suspende, homogeneiza un poco del sedimento, se le añade o no una gota de colorante y se coloca en un portaobjetos con el cubreobjetos para su examen al microscopio con objetivos de 10X y 40X.



Figura 21. Sedimentación con etil-acetato-formalina.

1.3.4.2. Sedimentación de Telemann

En 1908, Telemann describe este método de sedimentación con necesidad de éter y ácido clorhídrico. En 1928 Rivas, sustituye el ácido clorhídrico por ácido acético.

Un gramo de heces se homogeniza con ácido clorhídrico al 15%. Una vez filtrado a través de dos capas de gasas humedecidas, se añade la misma cantidad de éter y se agita antes de centrifugarlo a 1500 rpm durante un minuto. Al igual que en la sedimentación de formalina-etilacetato se observan las mismas cuatro capas. Se vierte las 3 capas superiores y se observa el sedimento al microscopio.

1.3.4.3. Kits comerciales de sedimentación

La mayoría de los kits comerciales de sedimentación contienen recipientes que pueden ser tubos de centrífuga (en el caso de que sea necesario centrifugar) y algún sistema de filtración que permita pasar las formas parasitarias pero eliminar la mayoría de artefactos con el fin de obtener una preparación más limpia en menos tiempo. Suelen utilizar algún fijador y un surfactante para disgregar y disolver los restos fecales. El objetivo final es obtener un sedimento que se observará al microscopio.

1.3.4.4. Técnica de Baermann

Se trata de una técnica que permite obtener larvas de nematodos y es especialmente eficaz para la detección de larvas de *Strongyloides* spp. en muestras de heces.

Consiste en un embudo de cristal de 14 cm de diámetro con un tubo de goma corto en el extremo caudal que termina con un tubo estrecho (una punta de pipeta Pasteur). Se cierra la goma con una pinza que permite llenarlo de agua y dejarla salir cuando es necesario. A continuación, se coloca una muestra de heces envuelta por varias capas de gasa o sobre un colador de té sumergiéndola en el agua 1-3 cm. La técnica se basa en la migración activa de la larva fuera de las heces debido a que el agua caliente estimula su movimiento. Al salir de la muestra cae al fondo del recipiente. Se deja reposar 24-48 horas. Sostener un portaobjetos bajo el tubo estrecho y dejar caer una gota gruesa, colocar un cubre y examinarlo al microscopio. O dejar caer unas cuantas gotas y centrifugar y decantar. Se

pueden utilizar diseños alternativos a este montaje siempre y cuando se conserven sus características esenciales (Hendrix, 1999; Ash y Orihel, 2010; Taylor *et al.*, 2016).

1.3.5. Otros métodos

1.3.5.1. Cultivo de heces

Sirven para llegar al diagnóstico definitivo de muchos de los huevos que no se han podido diferenciar debido a la similitud de algunos. El método consiste en mantener los huevos viables dentro de las heces hasta que la larva se desarrolle y eclosiona el huevo.

Para los huevos de nematelmintos se toman 20 – 30 g de heces y se deshace el material fecal al tiempo que se humedece. Se coloca en un recipiente sin luz directa y se deja durante siete días. Durante este tiempo la humedad se debe condensar en las paredes del recipiente, en el caso de no observar gotas de agua, pulverizar de nuevo la muestra. Para recuperar las larvas, se puede utilizar la técnica de Baermann.

Si se observan ooquistes de coccidios que no se pueden diferenciar, se puede cultivar las heces parasitadas para poder llegar a identificarlos. Por ejemplo, al producirse la esporulación de ooquistes del género *Eimeria*, se observa que contiene cuatro esporocistos mientras que un ooquiste de *Isospora* spp. contiene únicamente dos (Hendrix, 1999).

1.3.5.2. Obtención de elementos parasitarios en la necropsia

Se trata de un método muy importante para diagnosticar elementos parasitarios en el tracto digestivo. Además, también pueden observarse las lesiones ocasionadas, en los distintos órganos, debido al parasitismo. Durante la necropsia o autopsia de un PNH, el personal que la realice (normalmente un veterinario) puede identificar fácilmente los trematodos y cestodos. Para el caso de los nematodos se suelen utilizar el método de decantación y el de filtrado. Los parásitos encontrados se colocan en cajas de Petri con suero salino fisiológico y posteriormente se conservan los cestodos con formol al 10% y el resto con etanol.

1.3.4.2.1. Método de decantación (Hendrix, 1999)

Una vez anudado cada porción del tracto digestivo con una doble ligadura a nivel del cardias, píloro y válvula ileocecal, verter el contenido de cada una de las partes en recipientes individuales de manera que permita poder especificar la localización del parásito una vez identificado. Se debe raspar la mucosa interna y añadir el material obtenido al examen al microscopio. A cada uno de los recipientes se les añadirá agua y se mezclará bien con el contenido digestivo. Tras unos 45 minutos de reposo, eliminar el sobrenadante. Repetir el lavado tantas veces como sea necesario hasta que el sobrenadante sea transparente. Por último, examinar el sedimento. Cualquier parásito detectado, será conservado para su posterior identificación.

1.3.4.2.2. Método de filtrado (Gimard, 2001)

La diferencia con el método de decantación es que en el método de filtrado es que la mezcla de contenido digestivo al que se añade agua, se debe colar a través de un filtro con orificios de un milímetro de diámetro y a continuación por un filtro de 0,354 mm de diámetro.

Cuando existe una gran carga parasitaria y las formas parasitarias presentes son de gran tamaño es más fácil de diagnosticar con este método, pero si solo se utiliza esta técnica los falsos negativos son frecuentes.

Las combinaciones de los métodos de examen vistos hasta el momento son los utilizados habitualmente para detectar la presencia de parásitos, pero existen otros. El examen coprológico solo permite la detección de la infección cuando existe excreción de formas parasitarias mientras que el diagnóstico inmunológico se ha demostrado más eficaz para detectar algunas infecciones parasitarias. Se consideran más rápidos y más simples para determinar la prevalencia de *Fasciola hepatica* en animales de producción. Pero no existen test serológicos para detectar todos los parásitos (Anderson *et al.*, 1999; Reichel *et al.*, 2005; Meissonnier y Mage, 2007; Salem *et al.*, 2011).

1.3.5.3. Métodos de diagnóstico molecular

Con la aparición de las técnicas de diagnóstico molecular, se pudo perfilar más la identificación de infecciones por parásitos gastrointestinales y diferenciar especies que hasta el momento resultaba complicado (Haque, 1993). Se diseñaron métodos ELISA que permitieron diagnosticar parásitos (Mezo, 2009) y se desarrollaron nuevas tecnologías de diagnóstico donde ya no es necesario una muestra de heces sino de sangre (Fagbemi, 1997) o incluso de saliva (Leendertz *et al.*, 2006). Algunos de los estudios los consideran más rápidos, más simples y/o más eficaces que los métodos de concentración (Merino, 1990; Aldeen, 1995; Morgan, 1998; Otranto y Traversa, 2002; Reichel, 2005; Meissonnier y Mage, 2007; Salem *et al.*, 2011) aunque siguen presentando defectos como las reacciones cruzadas (Lorenzo, 1998).

El hecho de que aparezcan nuevas técnicas y que se vayan modificando, no hace que las anteriores dejen de usarse. De hecho, en la actualidad se sigue utilizando el examen directo, con o sin colorante, aunque lo más utilizado es una combinación de diferentes técnicas coprológicas. Es una lástima que no exista una única técnica ideal para la identificación de todos los parásitos, pero teniendo en cuenta la gran diversidad de los elementos parasitarios es normal (Baxby, 1984; Anderson *et al.*, 1999; Bowman, 2010).

En general, la correlación entre los huevos detectados por métodos coproparasitarios y la carga parasitaria real es considerada baja (Phiri *et al.*, 2006), lo mismo pasa con los resultados obtenidos por métodos inmunológicos (Jacquiet, 2001; Charlier *et al.*, 2008). Para realizar un estudio de la prevalencia de un parásito, lo ideal sería utilizar combinación de métodos coproparasitarios, inmunológicos e incluso la necropsia (Dorchies, 2007).

2. Objetivos

El objetivo general de este trabajo es optimizar las técnicas de diagnóstico parasitarias en el mono vervet y para ello se definen tres objetivos específicos:

1. Realizar un análisis bibliométrico de los estudios y las técnicas para el diagnóstico de parásitos gastrointestinales en primates.
2. Determinar el método de filtrado y homogenizado más eficaz para procesar muestras fecales de *Chlorocebus pygerythrus*, a partir de una contaminación experimental.
3. Evaluar diferentes métodos de diagnóstico coproparasitario en condiciones de laboratorio y de campo, para determinar los métodos más eficaces.

3. Material y Métodos

Para conseguir los objetivos anteriormente citados se planteó realizar el estudio en dos fases. En la primera fase, se realizó un análisis bibliométrico y se analizó, a partir de la literatura, la evolución de las técnicas coproparasitarias utilizadas en PNH. Esto permitió observar las modificaciones efectuadas en ellas, los parásitos identificados, las especies de PNH estudiadas y el tipo de alojamiento en que se encontraban. A partir de los resultados obtenidos en esta fase, se seleccionaron los métodos de diagnóstico coproparasitario más idóneos para ser utilizados en monos vervets y se procedió a su evaluación, con el fin de optimizar el diagnóstico parasitario.

En una segunda fase, se llevó a cabo un estudio experimental que se dividió en tres etapas:

Etapas 1: comparar dos procedimientos de homogenización y filtración de material fecal para determinar cuál de ellos es más eficaz.

Etapas 2: evaluar diez métodos de recuperación de formas parasitarias con heces contaminadas de manera experimental.

Etapas 3: evaluar ocho métodos de recuperación de formas parasitarias en una situación real de campo con heces procedentes de monos vervets infectados de manera natural.

3.1. Análisis bibliométrico

La bibliometría es una ciencia que estudia la actividad científica mediante el análisis de la literatura científica y los autores que la producen. La parte descriptiva se encarga de las características de la literatura científica mientras que la evolutiva estudia la relación existente entre estas características (Hertzfel, 1987). Se puede centrar el análisis en distintos niveles en función del interés (Moed *et al.*, 1985).

3.1.1. Acotación de la búsqueda

3.1.1.1. Delimitación del área de estudio

Para este trabajo, el área de estudio es específica y su delimitación se centró en los métodos coproparasitarios. Por ello, se incluyó en la búsqueda todas las técnicas de diagnóstico parasitario realizadas a partir de muestras de heces de cualquier especie de PNH.

3.1.1.2. Delimitación del periodo de estudio

Para la delimitación del tiempo de estudio se tuvo en cuenta que cuanto mayor es el periodo, más representativos son los resultados. Al no existir excesiva digitalización de artículos antiguos, es complicado acceder a una gran cantidad de ellos. Además, se trata de un tema muy específico, por lo que no se preveía un gran número de documentos que cumplieran todos los criterios de inclusión. Por ello, el periodo de estudio solo se delimitó hasta diciembre de 2015, sin poner un límite en cuanto al artículo más antiguo.

3.1.1.3. Elección del buscador y bases de datos

Como herramienta principal de búsqueda se utilizó el programa Papers® para Mac®, versión 3.4.7, que realiza una búsqueda simultánea en Google scholar, Pubmed, Web of Science (BIOSIS Previews) y Science Direct ya que ha demostrado ser más exhaustiva que otras bases de datos y ya ha sido utilizada en varios estudios como la única fuente de datos (Brandsma *et al.*, 1990).

3.1.1.4. Delimitación de la naturaleza de las publicaciones

Se asume que las publicaciones son la forma en que los investigadores transmiten sus estudios, y que la aceptación de los resultados expuestos entre la comunidad científica se mide por la cantidad de citas, y si estas son positivas o negativas (Moravcsik, 1989; Sancho, 1990).

La naturaleza de las publicaciones puede ir desde libros o artículos de revistas hasta comunicaciones orales que quedan reflejadas en las actas de congresos, pero uno de los principales modos de comunicación de las ciencias experimentales y de la naturaleza son los artículos en revistas científicas (Van Raan y Peters, 1989; Piñero y Ferrandis, 1992). Por este motivo, la búsqueda se centra únicamente en artículos publicados, excluyendo los libros, los posters, los monográficos y las comunicaciones orales.

3.1.1.4. Delimitación de los parámetros para la búsqueda

La procedencia de artículos que apliquen métodos de diagnóstico coproparasitario en PNH es muy diversa. Se pueden encontrar artículos en revistas de ámbito de la veterinaria, de la medicina humana o incluso de la antropología. Por esta razón, la búsqueda no se centró en revisar los artículos publicados en algunas revistas, sino que se realizó una búsqueda por parámetros.

El buscador realizó una revisión de todos los artículos almacenados en las bases de datos que contuvieran en el título, en el resumen y/o en las palabras clave estos términos y la combinación de ellos.

La mayoría de las revistas con mayor factor de impacto se escriben en lengua anglosajona, por lo que se decidió tener en cuenta únicamente el inglés como idioma de búsqueda.

Los parámetros utilizados deben adecuarse al área científica estudiada y a las bases de datos consultadas (Small, 1973; Van Raan y Peters, 1989; Sancho, 1990; Luukkonen, 1990). En este estudio se buscaron una serie de términos que aparecieran en los campos de "title", "abstract" y/o "keywords".

Los términos utilizados fueron los siguientes:

APE	Endoparasite	Coproscopy
Catarrhini	Gastrointestinal	Diagnosis
<i>Cercopithecus</i>	Parasites	Direct smear
Chimpazee	Helminth	Fecal egg count
<i>Chlorocebus</i>	Intestinal parasites	Flotation
<i>Colobus</i>	Nematode	IFI
Gorilla	Parasites	Methods comparison
Guenon	Protozoa	Molecular diagnosis
Monkey		Parasitological diagnosis
New world monkeys		PCR
Non human primate		Sedimentation
Old world monkeys		
Platyrrhini		
Primate		

3.1.2. Selección de la muestra

Se incluyeron para este estudio todos los artículos publicados en alguna de las bases de datos que consulta el programa Papers®, que cumplieran las siguientes características:

- El idioma publicado debe ser el inglés.
- Debe utilizar al menos un método de diagnóstico coproparasitario.
- Los individuos de estudio deben pertenecer al grupo de los PNH.

3.1.3. Recopilación, procesado de la muestra y análisis de los resultados

3.1.3.1. Recopilación de la muestra

Los artículos encontrados fueron procesados con el programa de gestión bibliográfica Papers®, que permite organizar las referencias bibliográficas en función de palabras clave creadas por el usuario, permitiendo un fácil manejo de toda la información.

El programa también dispone de un motor de búsqueda con filtros bibliométricos que permite acotar la búsqueda en función de los parámetros seleccionados.

3.1.3.2. Tratamiento de los datos y análisis de los resultados

Todos los artículos se clasificaron en función del autor, del año de publicación, de la revista de publicación, de las técnicas coproparasitarias utilizadas, de los parásitos identificados, de los PNH estudiados y del alojamiento.

Para el análisis de los resultados se utilizó el programa Papers® (Labtiva Corporation) y el programa Excel® del paquete Microsoft Office® (Microsoft Corporation).

3.2. Fase experimental

3.2.1. Materiales necesarios para la obtención y procesado de las muestras

3.2.1.1. Elementos de protección

Los elementos de protección personal necesarios durante la recogida y procesado de las muestras fueron guantes, gafas de seguridad, mascarilla e indumentaria de trabajo (figura 22).



Figura 22. Mascarilla (izquierda) y gafas de seguridad (derecha).

3.2.1.2. Equipos y materiales fungibles

Todo el equipamiento de laboratorio utilizado para este estudio, se detalla a continuación.

- **Microscopio binocular.** La marca del microscopio fue Nikon modelo alfhaphot-2 YS2, microscopio binocular con objetivos de 10X, 40X, 100X. Las lentes oculares estaban dotadas de una escala micrométrica para realizar mediciones de los elementos encontrados. El microscopio tenía una platina mecánica que favorece que el portaobjetos se mueva de manera uniforme y constante (figura 23).

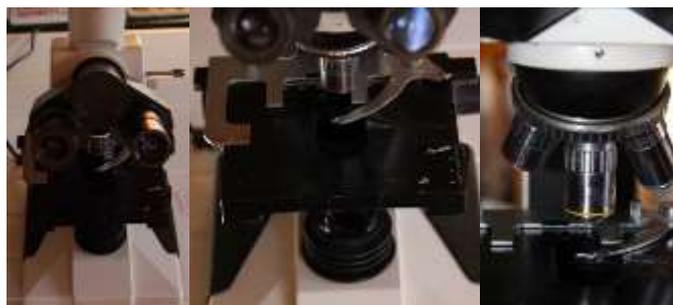


Figura 23. Detalle del microscopio.

- **Balanza de precisión.** La balanza utilizada para pesar las muestras fue Mettler Toledo modelo PL1502E.
- **Centrífuga.** La centrífuga utilizada fue la misma para todo el estudio, marca Hettich, modelo Universal 300.



Figura 24. Detalle de la centrífuga utilizada.

- **Fill-flotac®** Está formado por un contenedor y un cono para la muestra que a la vez sirve de agitador. En la tapa se acoplan dos tapones, el de agitación y el de vertido. El primero permite acceder al extremo del agitador mientras que en el segundo se acopla una punta de pipeta que facilita el vertido del contenido. El interior de la tapa dispone de un filtro.
- **Mortero y colador.** Se utilizó un colador convencional de cocina.
- **Frasco seco.** Recipiente de plástico transparente, limpio (sin necesidad que sean estériles), con tapa de rosca que permite un cierre hermético. Los frascos disponen de espacio suficiente para identificar la muestra.
- **Kit comercial Uranotest copro®.** Se trata de un recipiente con un medio de conservación para la recogida, transporte y filtración de heces con destino a la posterior realización de análisis parasitológico.
- **Ovatector® y Cámara de Mini-flotac®.** Los componentes se detallan en la figura 25.



Figura 25. Detalle Ovatector® (izquierda) y de la cámara de Mini-flotac®.

Se utilizó diverso material fungible que se detalla a continuación:

- **Portaobjetos y cubreobjetos.** Todos los portaobjetos utilizados fueron previamente desengrasados y los cubreobjetos eran cuadrados, de 22 x 22 mm.
- **Varilla o depresor lingual.** Se utilizaron para introducir la muestra en el frasco, para eliminar restos vegetales de las heces y para colocar la muestra fecal en el contenedor de Fill-flotac®.
- **Marcadores.** Bolígrafo, rotulador de identificación. Permitieron rotular todos los recipientes para poder identificar todas las muestras en cualquier momento. También fueron necesarios para poder completar la hoja de resultados.
- **Pinzas sin dientes.** Permitieron extraer las formas parasitarias macroscópicas encontradas en las heces.
- **Jeringas y pipetas.** Se utilizaron para recoger las heces líquidas y para añadir con precisión ciertas soluciones como el etil-acetato.
- **Film de cocina.** Solo se utilizó en el estudio preliminar, para ponerlo debajo de la jaula.
- **Pipeta Pasteur.** Se utilizó para romper las capas superiores en la sedimentación de etil-acetato formalina y para el examen directo.
- **Guantes.** Se utilizaron guantes de látex.
- **Material de limpieza.** Todo el material de limpieza para limpieza de superficies, material y personal: estropajo, cepillo, varilla limpia tubos, etc.
- **Tubos de centrifuga.** Tubos de cristal para que no se deformen por la solución de etil-acetato (Rousset, 1993). Tenían una capacidad de 15 mL con una boca de 15 mm.
- **Gasas.** Se utilizaron gasas médicas de hilo.

3.2.1.3. Soluciones y reactivos

Para el estudio se necesitaron distintas soluciones y reactivos que se detallan a continuación:

- **Agua.** Se utilizó agua del grifo para las soluciones de flotación, para la sedimentación por gravedad y para la limpieza de la zona de trabajo, del personal y del material.
- **Formaldehído al 10%.** Se trata de un reactivo necesario para una de las sedimentaciones realizadas.
- **Etil-acetato.** Se trata de un reactivo necesario para una de las sedimentaciones realizadas.
- **Aceite de inmersión.** Aceite de inmersión Euromex®.
- **Lugol.** Se trata de un colorante. Se utilizó en el examen directo con colorante.
- **Virkon® S.** Se trata de un desinfectante eficaz frente a virus, bacterias, levaduras y hongos. La preparación de la solución consiste en poner una tableta de Virkon® S en 500 mL de agua. El material debe permanecer 10 minutos sumergido antes de ser aclarado con agua. La solución se preparaba diariamente. Con la solución de Virkon® S se llenó un recipiente para ir dejando todo el material que estaba en espera de ser aclarado y posteriormente lavado con detergente.
- **Soluciones de flotación.** Se utilizaron dos soluciones de flotación. La primera, la solución de cloruro de sodio se preparó con sal de mesa Royal® comprada en un supermercado de la zona y con agua del grifo. Se añadió 331 g de sal a 1000 mL de agua con el fin de alcanzar la densidad deseada (SG 1,2). La segunda solución de flotación, la solución de sulfato de zinc al 33% fue elaborada a partir de 450 g de sulfato de zinc en polvo (Zinc Sulfate PanReac AppliChem®) mezclada con un litro de agua de grifo para conseguir la densidad deseada (SG 1,2). La gravedad específica de las soluciones de flotación se ajustó y comprobó diariamente con la ayuda de un densímetro.

Antes de realizar las técnicas laboratoriales con heces se comprobó que las soluciones no estuvieran infectadas por ninguno de los parásitos. Se realizaron todas las

técnicas de flotación únicamente con las soluciones de flotación y las de sedimentación con agua del grifo, obteniendo resultado negativo en todos los casos.

3.2.2. Selección de la muestra

3.2.2.1. Lugar y especies

Este estudio se realizó en Valencia (España) y en Tzaneen (Sudáfrica) y se utilizaron tres especies de PNH: mangabeys de coronilla blanca (*Cercopithecus neglectus*), cercopitecos de brazza (*Cercocebus atys lunulatus*) y vervets.

La primera fase se desarrolló en los laboratorios de parasitología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Cardenal Herrera CEU, Valencia (España). Se utilizaron heces procedentes de mangabeys de coronilla blanca y cercopitecos de brazza albergados en el parque zoológico Bioparc Valencia perteneciente a la fundación Bioparc (figura 26). Se seleccionaron estas especies por ser las de mejor acceso y más próximas filogenéticamente al mono vervet.



Figura 26. Mangabey de coronilla blanca (izquierda) y cercopiteco de brazza (derecha).

La segunda fase se desarrolló en el laboratorio de campo de *Vervet Monkey Foundation* (VMF), en Tzaneen (Sudáfrica). Se eligieron los monos vervets alojados en este centro por los siguientes motivos:

- Se trata de un género ampliamente distribuido en África.
- Es un animal muy utilizado en investigación biomédica.
- Por la relativa sencillez de realizar la toma de muestras en el santuario africano.

3.2.2.2. Instalaciones

No se tuvo acceso a las instalaciones del parque zoológico, por lo que se desconocen las características de las instalaciones interiores donde pasan la noche los animales, que es el lugar donde se recogieron las muestras.

En el caso de los vervets, para la realización de este estudio se consideró como una misma instalación (figura 27) al espacio central vallado y a todas las instalaciones que la rodean (jaulas satélites).



Figura 27. Imagen de una jaula satélite y parte de una instalación central de *Vervet Monkey Foundation*.

En el espacio central suelen convivir un gran número de vervets, mientras que en las jaulas satélites suelen alojarse de cero a cinco individuos.

Se seleccionaron las instalaciones con al menos una jaula satélite vacía. El hecho de poseer jaula(s) satélite(s) vacía(s) era imprescindible para poder realizar la toma de muestras minimizando el estrés ocasionado a los individuos.

Los motivos de exclusión de las instalaciones fueron los siguientes:

- Las instalaciones donde se hubiera administrado al menos a un animal, algún compuesto que pudiera interferir en la detección de parásitos en los veinte días anteriores al inicio de la toma de muestra, o fueran a recibirlos antes del

fin del periodo. Éstas fueron descartadas debido a que la administración de antiparasitarios, laxantes, antibióticos, contraste de bario, etc. altera el ritmo de excreción de formas parasitarias en las heces. Aunque puede carecer de importancia para la comparación de diferentes técnicas, era imperativo para poder realizar el estudio, ya que las muestras se recogían dentro del plan de prevención y diagnóstico de agentes infecciosos del santuario. Una vez iniciado el estudio, no se desparasitó ni se administró ningún compuesto contraindicado a ningún animal de las instalaciones seleccionadas. En el caso de que esto hubiera sucedido, se hubiese parado la toma de muestras en esa instalación.

- Las instalaciones donde se hubiera introducidos nuevos monos vervets en los seis meses anteriores, ya que podrían estar parasitado y actuar como una fuente de infección.
- Las instalaciones que permitiesen el contacto entre individuos de distintos grupos, ya que el contacto entre individuos puede ser el origen de la transmisión de ciertas formas infectantes parasitarias.

Se seleccionaron cuatro de las instalaciones de VMF: Gismo, Royal, Sickbay y Skrow.

3.2.2.3. *Animales*

En el caso de los mangabeys de coronilla blanca y los cercopitecos de brazza se tomaron muestras colectivas.

En el caso de los vervets, se consideró un mismo grupo, a los animales que comparten el espacio central y a todos los alojados en las jaulas satélites contiguas. Se hizo esta consideración, ya que puede existir un contacto estrecho entre todos ellos. Se incluyeron todos los individuos de las instalaciones seleccionadas a excepción de las hembras lactantes, las que aún transportaban a sus crías y las que ejercían de madres nodriza. También se excluyeron del estudio todos los individuos de menos de ocho meses de edad. El principal motivo fue por interferir lo menos posible en el proceso de adopción o de integración de los individuos más jóvenes.

3.2.2.4. Muestra de heces

Para este estudio se diferenciaron dos tipos de muestras de heces:

- Las muestras fecales colectivas. Se trata de un agregado de heces procedentes de distintos individuos de una de las tres especies de PNH. Se utilizaron para las etapas 1 y 2 de este estudio.
- Las muestras fecales individuales. Son muestras pertenecientes a un único mono vervet. Este tipo de muestras solo se utilizó en la etapa 3 del estudio. Se descartaron todas las heces que se mezclaron con orina, comida o agua y se desechó la porción de muestra en contacto con el suelo para reducir la contaminación cruzada (Ash y Oriol, 2010). Se excluyeron también las heces de las que se desconocía la hora de deposición, ya que los huevos de los parásitos pueden haber embrionado o eclosionado; los ooquistes de protozoos pueden haber esporulado, y algunos protozoos pueden carecer de los movimientos característicos que facilitan su identificación.

3.2.3. Elección del método de toma de muestras de heces

Las heces de mangabeys de coronilla blanca y las de cercopitecos de brazza, fueron recogidas y facilitadas por el personal del Bioparc en dos frascos. Cada frasco contenía muestras fecales colectivas de una de las dos especies de PNH.

En el caso de los vervets, se realizó un estudio preliminar para determinar la manera más eficaz y eficiente de tomar las muestras y, tras su finalización se descartó:

- La captura física de los animales para obtener las muestras por tratarse de animales poco habituados al contacto directo con los humanos.
- La toma de muestras directamente del recto. Era ideal para minimizar la contaminación cruzada, pero necesita de anestesia general y la cantidad de materia fecal que se extrae es inferior a la obtenida por deposiciones voluntarias de los animales. Además, el número de animales previstos para anestesiar durante el periodo de toma de muestras era muy pequeño.

- La toma de muestras de la instalación central. El acceso está restringido para algunos trabajadores, por lo que recoger muestras en ella era complicado. Solo se podía acceder a las heces próximas a la valla, que suelen estar contaminadas por la comida y el agua que se les distribuye por todo el perímetro.
- Colocar un plástico bajo la jaula para minimizar la contaminación. Se valoró que el riesgo de ingestión de alguna parte del plástico era elevado, y no disminuía mucho el riesgo de contaminación, puesto que el plástico era manipulado, troceado y mordisqueado.

3.2.4. Recogida de las muestras fecales

Todas las heces incluidas en este estudio se recolectaron del suelo o de alguna superficie de la jaula. Para tomar las muestras fecales colectivas de vervets, se recogieron varias heces de una misma instalación hasta llegar al volumen deseado. En el caso de las muestras fecales individuales, se recogieron de forma aleatoria y sistemática. Se tomaron 117 heces en total de los cuales 60 procedían de machos y 57 de hembras de la especie *C. pygerythrus* albergados en cuatro instalaciones diferentes del santuario (tabla 3).

Tabla 3. Distribución de los vervets por instalación y sexo.

Instalación	Machos	Hembras	Total
Royal	15	6	21
Sickbay	15	12	27
Gismo	15	21	36
Skrow	15	18	33
Total	60	57	117

Los animales debían ser aislados individualmente en una jaula satélite vacía para poder identificarlos correctamente y recolectar una muestra siguiendo el protocolo establecido. Los sujetos fueron capturados por el personal del santuario con la ayuda de un sistema de cuerdas que permitía abrir y cerrar las puertas de las jaulas satélites vacías.

Una vez encerrado el animal en la instalación satélite, se le identificó por medio de características físicas y/o con la lectura del transponder y se actuó de la siguiente manera:

1. Se identificó el frasco con el código correspondiente.
2. Tras la defecación, se permitió salir al sujeto de la jaula satélite, asegurando la puerta por seguridad de los operadores y entrando entonces en la instalación.
3. Se recolectaron las muestras de heces, de la forma más "estéril" posible. Si las heces estaban formadas o sólidas, se recogían directamente con un guante o con una espátula. El propio guante dado la vuelta y anudado sirvió de recipiente de transporte hasta el frasco correspondiente o hasta el procesado de la muestra (Urquhart, 1990). Si las heces eran líquidas, se recogía por aspiración con la ayuda de una jeringa. La propia jeringa sirvió de recipiente de transporte.
4. Se introdujo la muestra en el frasco elegido (seco o comercial) previamente identificado. En el caso de los recipientes con conservante se homogeneizó la muestra antes de cerrar el recipiente.
5. Se completó la hoja de registro asociada al código del frasco.
6. Se trasladaron las muestras al laboratorio.

Para optimizar el diagnóstico de algunas infecciones parasitarias, puede ser necesario examinar múltiples muestras, de un mismo individuo, recogidas durante un periodo de 7-10 días (como giardiasis o estrongiloidosis), pero resultaba muy complicado capturar en diferentes días a los individuos, y aislarlos repetidamente puede alterar las relaciones sociales como esta reportado en la literatura (Morgan y Tromborg, 2007; Ash y Oriel, 2010). El objetivo del estudio no era conocer la prevalencia de los parásitos en el santuario, sino la idoneidad de las técnicas a utilizar para su diagnóstico. Por tanto, se tomó la decisión de realizar una única muestra por cada individuo (Gillespie, 2006). Para ello, Se intentó evitar la entrada del mismo individuo a la jaula satélite.

3.2.5. Tiempo de conservación de las muestras de heces

Los exámenes de las muestras pueden realizarse con material fecal fresco o mantenido con algún conservante (Ash y Oriel, 2010). Para la realización de este estudio se intentó que una vez infectadas las muestras fecales colectivas o una vez recogidas para las muestras fecales individuales no existiera tiempo de conservación para las muestras recogidas en frasco seco (Clough *et al.*, 2010).

Todas las heces incluidas en la evaluación de métodos de recuperación en la situación de campo (muestras fecales individuales) se empezaron a procesar en un máximo de 10 minutos tras la recogida de la muestra, tiempo necesario para liberar al individuo de la instalación, tomar la muestra y llegar al laboratorio de campo.

Las muestras fecales individuales que se conservaron en Uranotest copro[®], se mantuvieron a temperatura ambiente durante 20 días y fueron analizadas tres veces, el mismo día de la defecación, a los 10 días y a los 20.

3.2.6. Hoja de registro

La hoja de registro está dividida en varios apartados para facilitar una rápida toma de datos (figura 28). En ella se anotó cualquier observación sobre el aspecto de las muestras fecales individuales, así como la presencia o ausencia de parásitos. Se decidió anotar

3.2.7. Procesado de las muestras para la contaminación experimental

3.2.7.1. Preparación de las muestras fecales colectivas

El procedimiento descrito a continuación se realizó varias veces: una con heces de mangabey de coronilla blanca, una con heces de cercopiteco de brazza y cuatro con heces de vervet, una por cada concentración de *P. muricola* utilizada.

Se eliminaron las piedras y los restos vegetales de gran tamaño de las heces.

Se mezclaron con 50 mL de agua por cada 100 g de heces hasta conseguir una mezcla fluida.

Se comprobó que las heces no estuvieran previamente infectadas por los parásitos a estudiar. Para ello se tomó una muestra de 50 g y se evaluó mediante los métodos de diagnóstico coproparasitario siguientes: examen directo con y sin lugol, flotación con solución de flotación de cloruro sódico y sulfato de zinc al 33% en tubo de ensayo, en Ovatector®, y en Mini-flotac®, sedimentación por gravedad y sedimentación de etil-acetato-formalina.

Se realizaron diez muestras de 50 g para evaluar los métodos de homogenización y filtrado para cada una de las tres especies de PNH.

Para la recuperación de formas parasitarias a partir de heces infectadas experimentalmente, se pesaron diez muestras de 30 g de heces de mangabey de coronilla blanca. Para las heces de vervet se repitió este mismo proceso cuatro veces, una por cada concentración de *P. muricola* que se realizó. No se llevó a cabo con heces de cercopiteco por no tener suficiente volumen de material fecal.

3.2.7.2. Origen del material contaminante

Los huevos y quistes de *Ancylostoma* spp., *Ascaris* spp., *B. coli*, *Dicrocoelium* spp., *G. duodenalis* y *Strongyloides* spp. utilizados para la contaminación experimental de las heces procedían de preparaciones elaboradas por la Unidad Docente de Parasitología y Enfermedades Parasitarias de la Facultad de Veterinaria de la Universidad CEU Cardenal

Herrera. Estos fueron utilizados para contaminar la muestra de mangabey de coronilla blanca y cercopiteco de brazza.

Los huevos de *P. muricola* procedían de hembras grávidas recolectadas durante la realización de una necropsia de un vervet del santuario *Vervet Monkey Foundation*.

3.2.7.3. Preparación de las soluciones contaminantes

Las únicas soluciones contaminadas que hubo que preparar fueron las de *P. muricola*.

Para obtener los huevos, se tomaron hembras grávidas del parásito y se maceraron en un mortero con 10 mL de agua, hasta total disgregación. De este modo los huevos quedaron suspendidos en la solución junto a los restos del parásito.

Para eliminar las partes restantes del parásito, se filtró la mezcla, con la ayuda de un par de gasas húmedas y un colador. El contenido se recogió en un recipiente y se le añadió agua hasta llegar a los 200 mL de solución.

La preparación se agitó durante 15 min para alcanzar una solución homogénea en el momento de su inoculación experimental a la mezcla de heces.

Una vez homogeneizada la solución, se tomaron 50 μ L y se observaron al microscopio con el objetivo 10X para determinar la concentración de formas parasitarias. Este mismo procedimiento se aplicó a las demás soluciones para conocer su concentración.

Las concentraciones obtenidas por gramos de heces para los diferentes parásitos se detallan en la tabla 4. En el caso de *P. muricola* se prepararon cuatro concentraciones diferentes.

Tabla 4. Carga parasitaria por gramo de heces.

Parásito	Concentración por gramo de heces
<i>Ancylostoma</i> spp.	1,87
<i>Ascaris</i> spp.	1,25
<i>B. coli</i>	6,46
<i>Dicrocoelium</i> spp.	1,12
<i>G. duodenalis</i>	41,25
<i>Strongyloides</i> spp.	1,25
<i>P. muricola</i> 1	5,6
<i>P. muricola</i> 2	45
<i>P. muricola</i> 3	135
<i>P. muricola</i> 4	348

3.2.7.4. Infección experimental de las muestras fecales colectivas

Se seleccionaron las soluciones de *B. coli*, *G. duodenalis* y *P. muricola* para realizar la comparativa de los métodos de homogenización y filtrado por ser las soluciones con mayor concentración de formas parasitarias.

A cada una de las muestras fecales colectivas de mangabey de coronilla blanca y a los de cercopiteco de brazza, se les añadió las soluciones de *B. coli*, *G. duodenalis* y *P. muricola*.

Se removió la mezcla con una espátula de madera durante 15 min, de manera que las formas parasitarias quedaran distribuidas uniformemente en la muestra. La concentración final alcanzada fue de 6,46 quistes de *B. coli* por gramo de heces (qpg), 41,25 qpg de *G. duodenalis* y 348 huevos por gramo (hpg) de *P. muricola*.

A las muestras fecales colectivas de vervet se les añadió la solución contaminante de *P. muricola*. Se procedió del mismo modo que el descrito anteriormente y la concentración fue de 348 hpg.

Para evaluar las técnicas de recuperación de formas parasitarias a partir de heces contaminadas experimentalmente se procedió del mismo modo, pero con heces de mangabeys a las que se añadieron los huevos y quistes de *Ancylostoma* spp., *Ascaris* spp., *B. coli*, *Dicrocoelium* spp., *G. duodenalis* y *Strongyloides* spp., y con las heces de vervets a las que se le añadió huevos de *P. muricola*.

3.2.8. Métodos de homogenización y filtrado de las heces

Todas las heces fueron sometidas a un proceso de homogenización y filtrado:

Homogenización. Los quistes, huevos de parásitos u otras formas parasitarias se reparten de forma desigual a lo largo del material fecal eliminado en una sola defecación y, los de mayor tamaño pueden estar escondidos debajo del material fecal y no detectarse. Por ello, se mezclaron totalmente las diferentes muestras de heces con una varilla hasta conseguir una pasta homogénea. En el caso de las heces muy secas, tipo 1 en la escala de Bristol, era complicado llegar a conseguir que las partes se agregasen, por lo que se dividió en pequeñas partes. Para cada técnica, se elegían partes de diferentes trozos de la muestra, lo que permitía formar una muestra con fragmentos de diferentes áreas de la muestra inicial (Rousset, 1993). Para este estudio, se utilizaron varios métodos de homogenización: mortero, Uranotest copro® y Fill-flotac®.

Filtrado. Para eliminar la mayor cantidad de partículas alimentarias no digeridas, la muestra se pasa a través de un filtro. Para este estudio se eligió pasar las muestras a través de unas gasas, del filtro de Uranotest copro® o utilizar el filtro de Fill-flotac®. De este modo se seleccionaron una de las técnicas más encontradas en la literatura, una de un kit comercial y otra descrita recientemente respectivamente.

La evaluación de los métodos de homogenización y filtrado se llevó a cabo eligiendo el método de mortero y gasas y el Fill-flotac®.

3.2.8.1. Método con mortero y gasas

Para realizar este método es necesario un mortero con maza, un colador, gasas y un recipiente recolector. El protocolo utilizado para este estudio fue el siguiente:

1. Pesar 2 g de heces y ponerlas en un mortero.
2. Agregar 10 mL de solución de flotación o de agua en el caso de las sedimentaciones.
3. Disolver bien las heces con la ayuda de una varilla hasta que queden uniformes.
4. Pasar la mezcla por un par de gasas húmedas y un colador.
5. Utilizar el líquido filtrado para realizar los métodos de recuperación de formas parasitarias.

3.2.8.2. Método con Fill-flotac®

Es un recipiente de muestras que se complementa con la cámara de conteo Mini-flotac®. Para utilizar este método se siguieron las indicaciones del fabricante. El procedimiento se puede resumir como se detalla a continuación.

1. Rellenar el contenedor con la solución de flotación elegida hasta alcanzar la línea de 18 mL para llegar a una dilución 1:10.
2. Con la ayuda de una espátula, rellenar el cono destinado para la muestra, aproximadamente 2 g.
3. Cerrar el Fill-flotac®.
4. Quitar el tapón de la varilla y homogenizar la muestra realizando movimientos de rotación, elevación y descenso de la varilla unida al cono de muestra.
5. Cerrar el tapón de la varilla y abrir el tapón de vertido.
6. Poner la pipeta aplicadora.
7. Utilizar el líquido filtrado para realizar los métodos de recuperación de formas parasitarias.

3.2.9. Métodos de recuperación de formas parasitarias en heces

No existe un acuerdo internacional sobre las técnicas idóneas a utilizar para el diagnóstico parasitario, por lo que los investigadores utilizan la que estiman más conveniente, si bien existen grandes coincidencias. El número de huevos encontrados en las heces puede estar alterado por modificaciones fisiopatológicas del animal, por la alimentación, por la hora de recolección de la muestra o por la cantidad de heces producidas por día (Phiri *et al.*, 2006). Por ello, se seleccionaron distintos métodos de diagnóstico coproparasitario, que incluían el examen microscópico directo y técnicas de concentración física.

A todas las preparaciones que se iban a observar con el microscopio con objetivos de 10X y/o 40X se les añadió un cubreobjetos ya que mejora la imagen, detiene los remolinos y evita que se ensucie el objetivo del microscopio (Bowman, 2010).

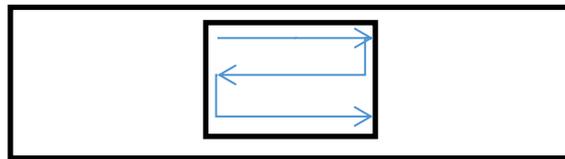
3.2.9.1. Examen directo con y sin lugol

A continuación, se detalla el protocolo seguido para para la realización del examen directo con y sin lugol basado en la descripción del protocolo publicado por Gillespie y colaboradores en 2006 con aportaciones de otros autores.

1. Con la ayuda de una varilla, colocar sobre un portaobjetos una pequeña cantidad de heces.
2. Diluir en una gota de agua hasta conseguir una mezcla homogenizada (Urquhart, 1990). A diferencia de la solución salina, el agua provoca la lisis de los trofozoítos de los protozoos alterando su imagen debido a los cambios osmóticos (Bowman, 2010). A pesar de ello, se decidió la utilización de esta última por ser de fácil acceso en todas las condiciones de trabajo (de campo o laboratorios con pocos medios). Además, el examen de la muestra se realizó de forma inmediata, por lo que permitiría observar el movimiento antes de que se produjera la lisis. La transparencia del fondo de la muestra tiene que

ser suficiente como para poder leer las letras de un periódico a través de la preparación (Rousset, 1993; Bowman, 2010).

3. Separar las partículas groseras.
4. Para la preparación con lugol, se procede del mismo modo, pero en este punto se añade una gota de lugol.
5. Posicionar el cubreobjetos procurando que no queden burbujas de aire.
6. Recorrer toda la muestra, asegurándonos la superposición de los campos de manera sistemática. Para ellos, cada vez que se alcanzaba el borde del portaobjetos, se identificaba un residuo en el borde de la periferia del campo (en la dirección del examen) y se desplazaba el portaobjetos (con ayuda de la platina metálica) hasta que el residuo quedará en la periferia del otro lado del campo.



7. Observar toda la preparación. Empezar con el objetivo 10X, ya que permite tener una visión general de la preparación y realizar una búsqueda de huevos y larvas de helmintos. Afinar el enfoque con el objetivo 40X.
8. Anotar en la hoja de registro todas las formas parasitarias encontradas.

3.2.9.2. Concentración por flotación con tubo de ensayo (Gillespie, 2006)

Se realiza a partir del líquido obtenido tras la homogenización y filtrado por uno de los dos métodos elegidos. El procedimiento de la flotación en tubo de ensayo se basó en el protocolo de Gillespie (2006) y se detalla a continuación.

1. Colocar el líquido filtrado en el tubo de ensayo.
2. Llenar con la solución de flotación hasta el borde dejando un menisco convexo.

3. Eliminar las burbujas de la superficie.
4. Colocar un cubreobjetos de 22 x 22 mm sobre el menisco.
5. Esperar 15 min para permitir la flotación y adhesión de las formas parasitarias.
6. Levantar el cubreobjetos con suavidad y colocarlo en un portaobjetos procurando que no queden burbujas de aire.
7. Recorrer toda la muestra, asegurándonos la superposición de los campos de manera sistemática.
8. Observar toda la preparación. Empezar con el objetivo 10X, ya que permite tener una visión general de la preparación y realizar una búsqueda de huevos y larvas de helmintos. Afinar el enfoque con el objetivo 40X.
9. Anotar en la hoja de registro todas las formas parasitarias encontradas.

3.2.9.3. Concentración por flotación con cilindro de Ovatector® modificada

Para la realización de esta técnica, en lugar de seguir las instrucciones del fabricante y depositar la muestra en el fondo del cilindro, se utilizó la muestra homogeneizada en el mortero y filtrada a través de gasas húmedas o en Fill-flotac®, lo que permitió ahorrar tiempo al no realizarse las cinco primeras etapas descritas. Otra de las razones por las que se tomó esta decisión fue para aumentar el número de técnicas al reducir los gramos de heces necesarios. Además, de este modo, lo único que variaba era el recipiente de flotación estandarizando y controlando por tanto las variables de las dos técnicas para poder comparar posteriormente su efectividad.

Las instrucciones de uso de Ovatector® incluyen cinco etapas, detalladas a continuación, que para este estudio no se realizaron.

1. Rellenar el contenedor destinado para la muestra, aproximadamente 2 g.
2. Colocar el cilindro encima del contenedor.
3. Llenar el cilindro, hasta la mitad con la solución de flotación elegida.
4. Homogeneizar la muestra con la varilla de madera incluida en el kit.

5. Introducir el filtro y empujarlo hasta el fondo.

El protocolo realizado para el presente estudio empezó en la sexta etapa de las instrucciones del fabricante, llenando el cilindro con la mezcla resultante de la homogenización y filtrado.

1. Añadir solución de flotación hasta crear un menisco en la parte superior del cilindro.
2. Colocar en el menisco, el cubreobjetos de 22 x 22 mm, procurando que no queden atrapadas burbujas de aire.
3. Esperar 15 min para permitir la flotación y adhesión de las formas parasitarias.
4. Levantar el cubreobjetos con un movimiento suave y colocarlo en un portaobjetos.
5. Recorrer toda la muestra, asegurando la superposición de los campos de manera sistemática
6. Observar toda la preparación. Empezar con el objetivo 10X, ya que permite tener una visión general de la preparación y realizar una búsqueda de huevos y larvas de helmintos. Afinar el enfoque con el objetivo 40X.
7. Anotar en la hoja de registro todas las formas parasitarias encontradas.

3.2.9.4. Concentración por flotación con Mini-flotac® (Barda et al., 2013)

El kit Mini-flotac® contiene tres piezas: la parte inferior que se compone de las dos cámaras, la parte superior con la gradilla de las cámaras y la pieza de giro. El protocolo utilizado para este estudio se detalla a continuación.

1. Montar el Mini-flotac®.
2. Llenar ambas cámaras con el líquido obtenido tras la homogenización y filtrado. Para facilitar la salida del aire de las cámaras y que no quede atrapado en ellas, es conveniente llenar las mismas con una leve inclinación.

3. Esperar 15 min para permitir la flotación y adhesión de las formas parasitarias.
4. Girar 90° la parte superior del kit.
5. Quitar la pieza de giro.
6. Recorrer toda la muestra de manera sistemática. Las cámaras tienen una cuadrícula que facilita el examen.
7. Observar toda la preparación. Empezar con el objetivo 10X, ya que permite tener una visión general de la preparación y realizar una búsqueda de huevos y larvas de helmintos. Afinar el enfoque con el objetivo 40X.
8. Anotar en la hoja de registro todas las formas parasitarias encontradas.

3.2.9.5. Concentración por sedimentación de etil-acetato-formalina (Ash y Oriol, 1991)

Cada vez que se utilizó la centrífuga, se colocó un contrapeso que consistía en un tubo idéntico y lleno con agua hasta el mismo nivel que el tubo a centrifugar. De este modo la fuerza ejercida por la centrifugación es homogénea en toda la centrífuga. El protocolo utilizado fue el siguiente:

1. Introducir el líquido de filtrado en un tubo de centrifugado.
2. Añadir agua hasta completar 15 mL.
3. Centrifugar a 800 – 1000 rpm (400 – 500 rpm por cada gramo de heces) durante 1 – 2 min.
4. Eliminar el sobrenadante conservando el sedimento.
5. Realizar varios lavados (etapa 3 y 4) hasta que el sobrenadante quede limpio.
6. Añadir 10 mL de formalina al 10% y 3 mL de etil-acetato.
7. Poner el tapón y agitar vigorosamente la mezcla durante 30 s.
8. Centrifugar a 800 – 1000 rpm durante 2 – 3 min.

9. Insertar una varilla para romper el tapón de grasa y verterlo junto con el sobrenadante.
10. Resuspender el sedimento con dos o tres gotas de agua.
11. Colocar una pequeña cantidad en el portaobjetos con una pipeta Pasteur.
12. Posicionar el cubreobjetos procurando que no queden burbujas de aire.
13. Recorrer toda la muestra de manera sistemática.
14. Observar toda la preparación. Empezar con el objetivo 10X, ya que permite tener una visión general de la preparación y realizar una búsqueda de huevos y larvas de helmintos. Afinar el enfoque con el objetivo 40X.
15. Anotar en la hoja de registro todas las formas parasitarias encontradas.

3.2.9.6. Sedimentación por gravedad (Gillespie, 2006)

El protocolo utilizado para la sedimentación por gravedad, fue elaborado a partir de la sedimentación descrita por Gillespie en 2006 y consistió en:

1. Introducir la muestra procedente del filtrado en un tubo de centrifugado.
2. Añadir agua hasta completar 15 mL.
3. Sedimentar por gravedad durante 5 min.
4. Eliminar el sobrenadante conservando el sedimento.
5. Realizar varios lavados (etapas 3 y 4) hasta que el sobrenadante quede limpio.
6. Resuspender el sedimento con 2 o 3 gotas de agua.
7. Colocar una pequeña cantidad de sedimento en el portaobjetos con una pipeta Pasteur.
8. Posicionar el cubreobjetos procurando que no queden burbujas de aire.
9. Recorrer toda la muestra de manera sistemática.

10. Observar toda la preparación. Empezar con el objetivo 10X, lo que permite tener una visión general de la preparación y realizar una búsqueda de huevos y larvas de helmintos. Afinar el enfoque con el objetivo 40X.
11. Anotar en la hoja de registro todas las formas parasitarias encontradas.

3.2.9.7. Sedimentación con el kit comercial Uranotest copro®

Para realizar esta sedimentación se siguieron las instrucciones del fabricante que se resumen a continuación.

1. Con la ayuda de la cucharilla del kit, tomar dos medidas de muestra fecal. En el caso de heces sólidas, utilizar el lado del cono y para heces líquidas el lado de la cucharilla.
2. Con la ayuda de la cucharilla, mezclar la muestra y el fijador en el recipiente.
3. Cerrar el recipiente y agitar hasta obtener una solución homogénea.
4. Quitar la tapa de sellado.
5. Colocar el recipiente hacia abajo, en el orificio de la caja de embalaje.
6. Dejarlo en una superficie lisa durante 15 min.
7. Desechar la primera gota y colocar una o dos en un portaobjetos.
8. Añadir una gota de lugol.
9. Posicionar el cubreobjetos procurando que no queden burbujas de aire.
10. Recorrer toda la muestra de manera sistemática.
11. Observar toda la preparación. Empezar con el objetivo 10X, lo que permite tener una visión general de la preparación y realizar una búsqueda de huevos y larvas de helmintos. Afinar el enfoque con el objetivo 40X.
12. Anotar en la hoja de registro todas las formas parasitarias encontradas.

3.2.10. Procesado de las muestras

Dependiendo de la etapa de la fase experimental a la que iba destinada la muestra se procesaron de modos diferentes:

Etapa 1: comparar dos procedimientos de homogenización y filtrado de material fecal para determinar qué procedimiento es más eficaz.

Etapa 2: evaluar métodos de recuperación de formas parasitarias con heces contaminadas de manera experimental.

Etapa 3: evaluar métodos de recuperación de formas parasitarias en una situación real de campo con heces procedentes de monos vervets infectados de manera natural.

3.2.10.1. Etapa 1. Comparación de dos procedimientos de homogenización y filtrado

Los métodos de recuperación de formas parasitarias utilizados fueron métodos de concentración físicos. La concentración por flotación se realizó en tubo, en Ovatector® y en Mini-flotac®, utilizando la solución saturada de cloruro sódico y la de sulfato de zinc. También se realizaron dos concentraciones por sedimentación, la sedimentación por gravedad y la sedimentación de etil-acetato-formalina.

La distribución de los exámenes realizados se refleja en la tabla 5. Todas las técnicas se repitieron diez veces para cada uno de los métodos de homogenización y filtrado, realizando 240 exámenes coprológicos a partir del líquido resultante de la homogenización y filtrado con mortero y gasas y otros 240 exámenes con el obtenido con Fill-flotac®.

Tabla 5. Exámenes coprológicos realizados.

	Mangabey de coronilla blanca		Cercopiteco de brazza		Vervet	
	MG	FF	MG	FF	MG	FF
FT-Na	10	10	10	10	10	10
FO-Na	10	10	10	10	10	10
FM-Na	10	10	10	10	10	10
FT-Zn	10	10	10	10	10	10
FO-Zn	10	10	10	10	10	10
FM-Zn	10	10	10	10	10	10
SC	10	10	10	10	10	10
SG	10	10	10	10	10	10
Total	80	80	80	80	80	80

MG: mortero y gasas; FF: Fill-flotac; FT-Na: flotación en tubo con cloruro sódico; FO-Na: flotación en Ovatector® con cloruro sódico; FM-Na: flotación en Mini-flotac® con cloruro sódico; FT-Zn: flotación en tubo con sulfato de zinc; FO-Zn: flotación en Ovatector® con sulfato de zinc; FM-Zn: flotación en Mini-flotac® con sulfato de zinc; SC: sedimentación etil-acetato-formalina; SG: sedimentación por gravedad.

3.2.10.2. Etapa 2. Evaluación de métodos de recuperación de formas parasitarias con heces contaminadas experimentalmente

Los diez métodos utilizados para la recuperación de formas parasitarias fueron: examen directo, examen directo con lugol, las combinaciones de los tres métodos de flotación con las dos soluciones de flotación, la sedimentación por gravedad y la sedimentación con centrífuga de etil-acetato-formalina. El método de homogenización y filtrado utilizado fue Fill-flotac® en todos los casos.

Se realizaron un total de 500 exámenes coprológicos que se detallan en la tabla siguiente (tabla 6).

Tabla 6. Resumen de los exámenes coprológicos realizados.

	Mangabey	Vervet 1	Vervet 2	Vervet 3	Vervet 4
D	10	10	10	10	10
D-L	10	10	10	10	10
FT-Na	10	10	10	10	10
FO-Na	10	10	10	10	10
FM-Na	10	10	10	10	10
FT-Zn	10	10	10	10	10
FO-Zn	10	10	10	10	10
FM-Zn	10	10	10	10	10
SC	10	10	10	10	10
SG	10	10	10	10	10
Total	100	100	100	100	100

Vervet 1: concentración de *P. muricola* con 5,6 hpg; Vervet 2: concentración de *P. muricola* con 45 hpg; Vervet 3: concentración de *P. muricola* con 135 hpg; Vervet 4: concentración de *P. muricola* con 348 hpg ;D: examen directo; D-L: examen directo con lugol; FT-Na: flotación en tubo: examen directo; D-L: examen directo con lugol; FT-Na: flotación en tubo D: examen directo; D-L: examen directo con lugol; FT-Na: flotación en tubo con cloruro sódico; FO-Na: flotación en Ovatector® con cloruro sódico; FM-Na: flotación en Mini-flotac® con cloruro sódico; FT-Zn: flotación en tubo con sulfato de zinc; FO-Zn: flotación en Ovatector® con sulfato de zinc; FM-Zn: flotación en Mini-flotac® con sulfato de zinc; SC: sedimentación etil-acetato-formalina; SG: sedimentación por gravedad.

3.2.10.3. Etapa 3. Evaluación de métodos de recuperación de formas parasitarias en una situación real de campo

Todas las muestras fueron sometidas a un proceso de homogenización y filtrado con Fill-flotac®.

Los métodos de recuperación de formas parasitarias utilizados fueron: examen directo, examen directo con lugol, sedimentación etil-acetato-formalina, sedimentación con Uranotest copro®, flotación con Ovatector® y flotación con Mini-flotac®. Las flotaciones fueron realizadas con la combinación de las dos soluciones de flotación.

Se realizaron un total de 735 exámenes coprológicos que se detallan a continuación en la tabla 7.

Tabla 7. Resumen de los exámenes coprológicos realizados.

	D	D-L	FM-Na	FM-Zn	FO-Na	FO-Zn	SC	U	Total
Royal	21	21	15	18	15	18	11	11	130
Sickbay	27	27	15	24	15	24	22	10	164
Gismo	36	36	24	30	24	30	22	10	212
Skrow	33	33	30	30	30	30	33	10	229
Total	117	117	84	102	84	102	88	41	735

D: examen directo; D-L: examen directo con lugol; FM-Na: flotación en Mini-flotac® con cloruro sódico, FM-Zn: flotación en Mini-flotac® con sulfato de zinc; FO-Na: flotación en Ovatector® con cloruro sódico; FO-Zn: flotación en Ovatector® con sulfato de zinc; SC: sedimentación etil-acetato-formalina; U: sedimentación con Uranotest copro®.

3.2.11. Análisis de los resultados

Los datos obtenidos son pareados puesto que todas las técnicas de diagnóstico se realizan a partir de una misma muestra fecal. En las infecciones experimentales, se conoce la carga parasitaria inicial, lo que permite valorar los falsos negativos. En la etapa 3, al desconocerse la carga inicial se construyeron tablas de 2 X 2 que permitieron, utilizando las fórmulas estándares, el cálculo de la sensibilidad, el índice Kappa y comparar los métodos entre sí.

Los datos se clasificaron en función del método utilizado (de homogenización y filtrado o de recuperación de formas parasitarias) y de la cantidad de formas parasitarias encontradas para cada una de las especies. Al considerarse que la cantidad de formas parasitarias puede verse afectada por el examen coprológico realizado, los resultados se compararon dos a dos a excepción de los métodos de flotación en la fase experimental que, en primer lugar, se compararon tres a tres y, si el análisis mostraba diferencias estadísticamente significativas, se procedió a su comparación dos a dos.

Para analizar los bajos porcentajes de recuperación, los datos fueron codificados como discretos para su análisis y se utilizó la prueba de Q de Cochran y/o la prueba de McNemar.

Para analizar el resto de resultados se realizó la prueba estadística de Friedman y/o la prueba de Wilcoxon, y se calculó la media, el error estándar y la desviación estándar.

Los datos se tabularon y analizaron en el programa estadístico IBM SPSS Statistic® (IBM Corporation) y el programa Excel® del paquete Microsoft Office® (Microsoft Corporation).

3.2.12. Bioseguridad

En todas las fases del proceso, el operador fue el responsable de tomar las precauciones necesarias para minimizar al máximo la dispersión de agentes patógenos viables (al ambiente o a otros animales incluido el hombre). Al entrar en el laboratorio de campo, antes de empezar el examen de las heces, los operarios siempre debían llevar una bata de laboratorio y guantes de látex. Los guantes se cambiaban entre el procesado de la muestra y el examen microscópico para no trasladar formas parasitarias de la zona sucia a la zona limpia del laboratorio. Una vez finalizado el procedimiento, se lavaban y desinfectaban todo el material y la zona de trabajo. Por último, una vez quitada la ropa de trabajo, el operario se lavaba correctamente las manos con jabón desinfectante.

La solución fijadora de formaldehído al 10% seleccionada se conservaba en un lugar fresco, lejos de fuentes de calor, sin exposición al sol y herméticamente cerrado.

Como medida preventiva se elaboró un resumen con los riesgos de exposición, cómo evitarlos, los síntomas y el modo de actuación frente a los accidentes (tabla 8).

Tabla 8. Procedimientos de primeros auxilios.

Riesgos por exposición	Medidas preventivas	Síntomas	Modo de actuación frente a accidentes
Inhalación	Utilizar mascarilla como protección respiratoria. Ventilación	Tos, sensación de quemazón en tracto respiratorio superior, náuseas, dolor de cabeza, jadeo. Obstrucción de vías respiratorias	Mover al intoxicado al aire fresco, retirar fuente de exposición. Ayuda médica inmediata.
Ingestión	Utilizar mascarilla. No comer, no beber, no fumar durante la manipulación. Marcar los instrumentos que puedan contener restos de sustancias tóxicas	Sensación de quemazón en tracto digestivo, náuseas, vómitos	El intoxicado deberá enjuagarse los labios y la boca con abundante agua. Ingerir vasos de agua con carbón activado. Ayuda médica inmediata
Piel	Utilizar guantes y vestimenta de trabajo	Irritación, sensación de quemazón, sensibilización, reacciones alérgicas, eczema	Aclarar la piel con abundante agua. Ayuda médica inmediata
Ojos	Utilizar gafas de seguridad	Enrojecimiento, visión borrosa, epífora	Enjuagar con agua durante varios minutos. Ayuda médica inmediata

Para evitar la eliminación de cualquier tipo de residuos nocivo para el medio ambiente, todos los restos biológicos pudiendo contener formas parasitarias viables se introdujeron en un recipiente con solución de Virkon® S.

Se tuvo especial precaución con la eliminación correcta de los productos químicos utilizados. Los restos de sobrenadante, de centrifugado y de soluciones con fijador, no deben ser desechados en la basura común. Se depositaron en recipientes “especiales para residuos peligrosos”, cumpliendo la legislación del país.

3.2.13. Bienestar animal

Este estudio forma parte del protocolo de prevención de zoonosis que se lleva a cabo en el santuario. No se alteró el manejo habitual de los animales.

Se evitó todo tipo de contacto físico innecesario para reducir al máximo las situaciones de estrés.

4. Resultados

4.1 Revisión bibliográfica

Se encontraron un total de 57 artículos que cumplían con todos los requisitos.

4.1.1. Distribución de primeros autores en función de la cantidad de artículos publicados

En la figura 29 se refleja la distribución de los autores en función del número de artículos que aparecen como primer firmante.

A partir de la revisión bibliográfica de artículos publicados en un periodo de tiempo de más de 40 años (1974 – 2015), se encontraron 57 artículos escritos en inglés, con más de 50 autores como primer autor. El 94% de los autores, solo tienen una publicación durante el periodo de estudio. De entre los autores que publicaron más de un artículo, se encuentra Gillespie, el investigador más productivo del periodo. Ha escrito cuatro artículos y aparece como coautor con Chapman (Chapman *et al*, 2006b). También es el autor del único artículo que hace un balance de la idoneidad de las técnicas coproparasitarias que se deberían utilizar en primates (Gillespie, 2006).

Chapman y Macinstosh son los otros autores que firman como primer autor más de un artículo, apareciendo en tres publicaciones cada uno. Al igual que Gillespie, Chapman aparece como coautor en varias publicaciones de Gillespie (2004, 2008).

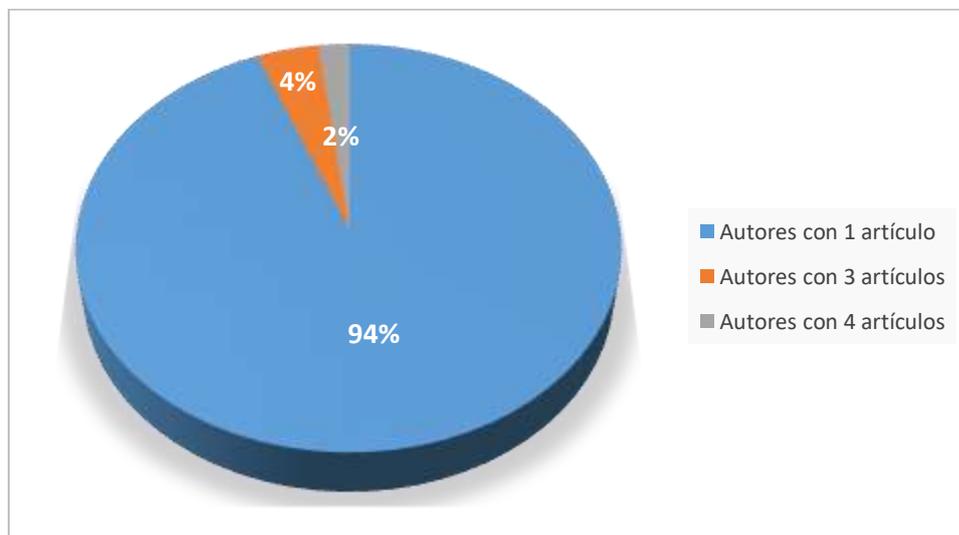


Figura 29. Distribución de los autores en función de los artículos publicados.

4.1.2. Revistas con publicaciones seleccionadas

Los artículos se catalogaron en función de la revista en la que se publicaron. Se halló un total de 22 revistas con al menos un artículo seleccionado (tabla 9). Las revistas donde se encuentran este tipo de artículos suelen ser revistas especializadas en primates como *International Journal of Primatology* y *American Journal of Primatology*, que han publicado ocho y seis artículos, respectivamente. También se encuentran en revistas cuyo principal interés es la parasitología como *The Journal of Parasitology*, que ha publicado cinco artículos, aunque los resultados muestran que el 43,5% de las revistas solo cuentan con una publicación (figura 30). Éstas fueron: *Acta Tropica*, *African Journal of Animal and Biomedical Research*, *Animal Behaviour*, *Infection & Immunity*, *Journal of Applied Ecology*, *Journal of the Royal Society Interface*, *Journal of Zoology*, *Plos Neglected Tropical Diseases*, *South African Journal of Wildlife Research* y *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*.

Tabla 9. Revistas y artículos publicados.

Nombre revista	Número de artículos
<i>Acta Tropica</i>	1
<i>African Journal of Animal and Biomedical Research</i>	1
<i>American Journal of Physical Anthropology</i>	4
<i>American Journal of Primatology</i>	6
<i>Animal Behaviour</i>	1
<i>Infection & Immunity</i>	1
<i>International Journal of Primatology</i>	8
<i>Journal of Applied Ecology</i>	1
<i>Journal of Medical Primatology</i>	3
<i>Journal of The Royal Society Interface</i>	1
<i>Journal of Wildlife Diseases</i>	4
<i>Journal of Zoo and Wildlife Medicine</i>	2
<i>Journal of Zoology</i>	1
<i>Parasitology</i>	2
<i>Parasitology Research</i>	2
<i>Plos Neglected Tropical Diseases</i>	1
<i>Plos One</i>	2
<i>Primate Parasite Ecology</i>	2
<i>Primates</i>	4

<i>South African Journal of Wildlife Research</i>	1
<i>The Journal of Parasitology</i>	5
<i>The Onderstepoort Journal of Veterinary Research</i>	1
<i>Veterinary Parasitology</i>	3

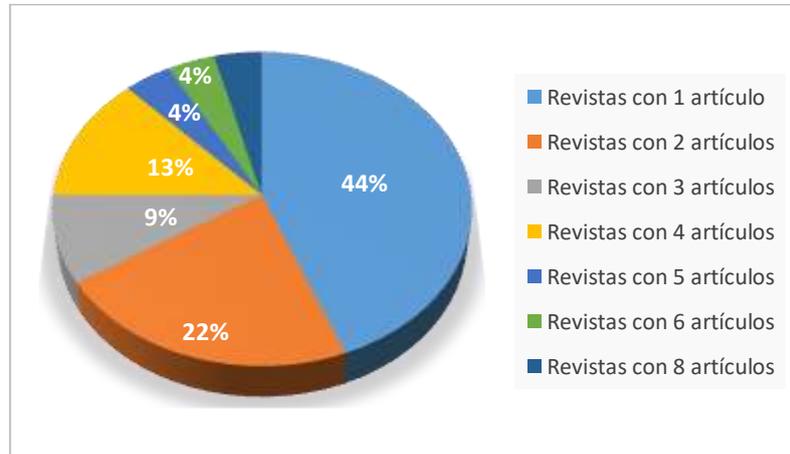


Figura 30. Porcentaje de los artículos por revistas.

4.1.3. Evolución de los artículos a lo largo del periodo de estudio

A lo largo del periodo estudiado, se observa que aumenta el número de publicaciones a partir del año 1995 hasta alcanzar su máximo en 2008, donde se mantiene con unos cuatro artículos publicados por año (figura 31).



Figura 31. Número de artículos publicados entre 1974-2015.

4.1.4. Publicaciones sobre técnicas coproparasitarias

En la tabla 10 se refleja la cantidad de artículos que utilizan o recomiendan técnicas coproparasitarias y si el diagnóstico ha sido una combinación de métodos o no.

Tabla 10. Métodos diagnósticos encontrados.

Método diagnóstico	Número de artículos	Método único	Método combinado
Directo	12 (21%)	0 (0%)	12 (100%)
Flotación	25 (43,9%)	4 (16%)	21 (84%)
Sedimentación	40 (70,2%)	23 (57,5%)	17 (42,5%)
Moleculares (IFD, PCR)	7 (12,3%)	3 (42,9%)	4 (57,1%)

Las técnicas moleculares son las menos utilizadas, apareciendo en el 12,3% de los artículos. El siguiente método es el examen directo, que aparece en el 21% de los artículos, siempre combinado con otro(s) método(s). Las flotaciones se aplicaron en 25 artículos (43,9%), apareciendo únicamente en el 16% como único método coproparasitario y en el 84% combinadas. Por último, el diagnóstico por sedimentación fue el más representado (40 artículos) habiéndose aplicado en un 70,2% de los estudios. La sedimentación aparece en más del 50% de los artículos como única técnica diagnóstica. La combinación más frecuentemente encontrada fue la asociación de la sedimentación con la flotación, apareciendo en 13 artículos.

De los 57 artículos encontrados se observa que en 26 (45,6%), el autor hace referencia a alguna técnica anterior. En la tabla 11 se recopilan todas las técnicas citadas.

Tabla 11. Procedimientos citados.

Directo	Flotación	Sedimentación
Ash y Oriel 1987 Henriksen y Polez, 1981	Ash y Oriel, 1987 García y Bruckner, 1997 Gillespie, 2006 Kemp y Zajac, 1994 Sheather 1923 Sloss y Kemp, 1978 Sloss, 1994	Allen y Ridley, 1970 Ash y Oriel, 1991 Faler y Faler, 1984 García, 1999 Gillespie, 2006 Gómez, 2000 Greineret McIntosh, 2009 Long <i>et al.</i> , 1985 Polderman y Rijpstra, 1993 Ritchie, 1948 Sloss y Kemp, 1978 Thienpont, 1986

Henriksen y Polez en 1981 y Ash y Oriel en 1987, describieron los dos protocolos de examen directo citados. Las flotaciones se basan en siete técnicas con soluciones y protocolos diferentes. La clasificación cronológica permite observar la evolución de las soluciones de flotación. En 1923, Sheather realiza una solución de flotación a base de azúcar de mesa, Sloss y Kemp (1978) utilizan cloruro sódico y Ash y Oriel (1987) introducen el sulfato de zinc para la solución de flotación. En 1994, Sloss modifica su técnica de 1978 al utilizar nitrato sódico en vez de cloruro sódico, que parece ser la definitiva. Pese a que se citan otros autores, como Kemp y Zajac (1994) y García y Bruckner (1997), se implanta la utilización de nitrato sódico y en 2006 Gillespie la recomienda como la mejor solución para PNH.

Se citan a más de diez autores para la sedimentación con éter (o etil-acetato), dos ejemplos de ello es la sedimentación por gravedad, explicada por Gillespie en 2006 y la descripción que hace Clough de la técnica de Ash y Oriel que se detalla a continuación.

1. Tomar 5 mL de material fecal homogeneizado.
2. Ponerlo en un tubo de centrifuga.
3. Añadir 5 mL formalina y 3 mL etil-acetato.
4. Agitar vigorosamente durante 30s.
5. Centrifugar a 2200 rpm durante 10 min.

6. Retirar el sobrenadante y el tapón graso.
7. Resuspender el sedimento.
8. Poner gota de sedimento resuspendido y gota de lugol.

4.1.5. Publicaciones acerca de las familias de PNH

El análisis bibliométrico muestra que, en el 77,2% de los estudios publicados el diagnóstico coproparasitario se centró en una única familia de PNH mientras que en el 12,3% se utilizó a dos familias y en el 10,5% a tres. Los parásitos intestinales más estudiados son los de la familia Cercopithecidae seguida por los de la Hominidae. En la figura 32 se observa las frecuencias en las que cada una de las familias fue estudiada sola o junto a otras familias.

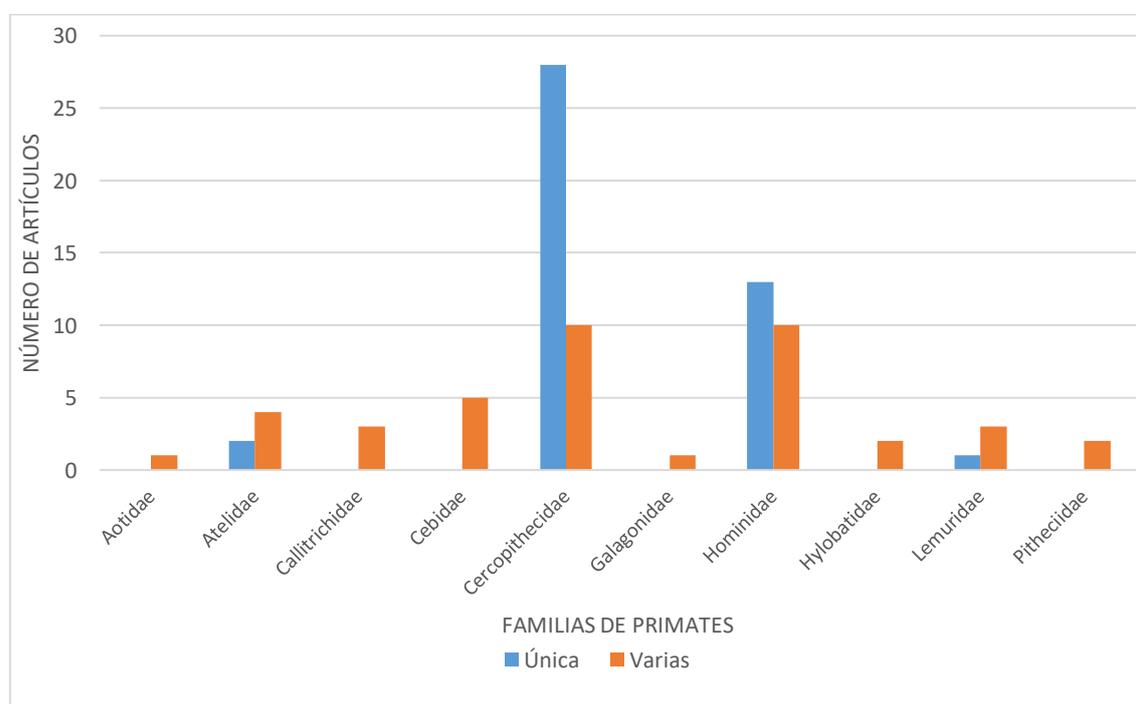


Figura 32. Frecuencia de las familias estudiadas.

4.1.6. Resultado de parásitos identificados

La tabla 12 expone los porcentajes de identificación de helmintos en los PNH. La familia más identificada en los artículos revisados fue Trichuridae (52,6%), seguida de

Strongyloididae (50,9%) y Strongylidae (47,4%). El resto de familias de helmintos aparecen en menos del 20% de los artículos.

Tabla 12. Porcentaje de familias de helmintos estudiadas.

Familia helmintos	N	%
Anoplocephalidae	7	12,3
Ascarididae	10	17,5
Capillariidae	1	1,8
Cosmocercidae	3	5,3
Dicrocoeliidae	1	1,8
Diphyllobothriidae	1	1,8
Diplostomatidae	1	1,8
Gongylonematidae	3	5,3
Hymenolepididae	1	1,8
Lecithodendriidae	1	1,8
Oxyuridae	9	15,8
Physalopteridae	5	8,8
Schistosomatidae	4	7
Spirocercidae	5	3,5
Spiruridae	3	5,3
Strongylidae	27	47,4
Strongyloididae	29	50,9
Subuluridae	1	1,8
Syngamidae	1	1,8
Taeniidae	1	1,8
Trichinellidae	1	1,8
Trichuridae	30	52,6

N: número de artículos; %: porcentaje de artículos.

La familia de protozoos más identificada fue Entamoebidae apareciendo en el 47,4% de los diagnósticos realizados, seguida de Balantiidae (26,3%). El tercer puesto lo comparten Giardiae y Hexamitidae que fueron identificadas en el 21% de los artículos. El resto de familias aparecen en menos de un 15% de los artículos (tabla 13).

Tabla 13. Porcentaje de familias de protozoos estudiadas.

Familia protozoos	N	%
Balantiidae	15	26,3
Blastocytidae	5	8,8
Cryptosporidiidae	5	8,8
Eimeriidae	3	5,3
Entamoebidae	27	47,4
Enterocytozoonidae	1	1,8
Giardiidae	12	21
Hexamitidae	12	21
Retortamonadidae	8	14
Trichomonadidae	1	1,8
Troglodytelliidae	4	7

N: número de artículos; %: porcentaje de artículos.

4.1.7. Publicaciones acerca del modo de alojamiento de los PNH

El 73% de los artículos consultados se correspondía con estudios de campo sobre animales silvestres, el 16% se realizó en parques zoológicos o centros de investigación y en el 9% de los estudios, los animales se encontraban en islas, lo que se consideró como semilibertad (figura 33). La mayoría de los artículos (98%) se centraron en un tipo de alojamiento, solo el 2% presentaba resultados sobre animales en libertad y en cautividad.

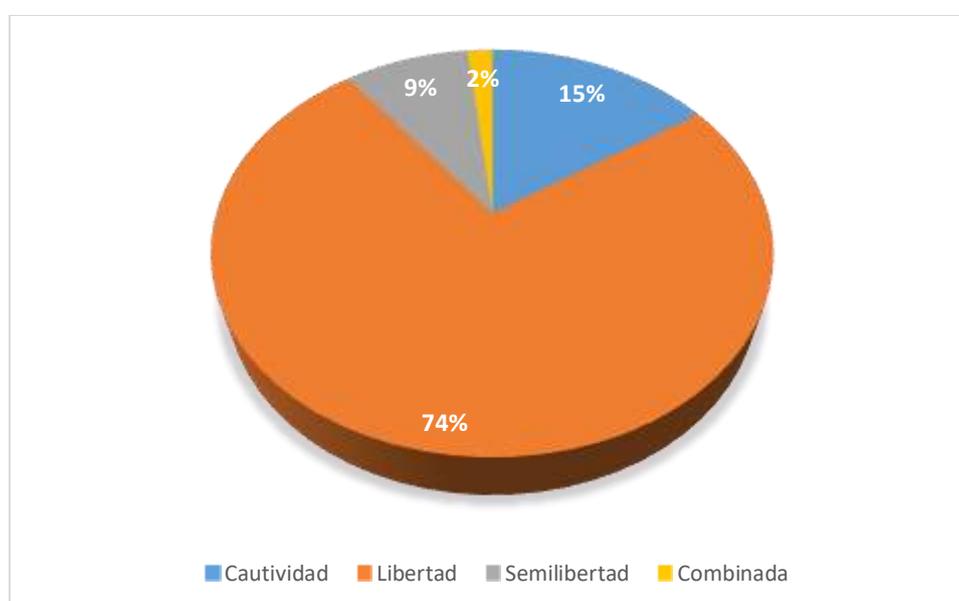


Figura 33. Proporción de alojamientos de PNH encontrados.

4.2. Fase experimental

4.2.1. Puesta a punto de las técnicas de homogenización y filtrado a partir de heces contaminadas experimentalmente

Los resultados obtenidos en este apartado del estudio, están reflejados en las tablas 14, 15, 16, 17, 18 y 19. En ellas se muestra el número de formas parasitarias recuperadas en cada una de las diez ocasiones en las que se repitió el procesado de las heces contaminadas de formas parasitarias, de mangabey y de cercopiteco, con cada una de las combinaciones de flotación y sedimentación realizadas para cada una de las tres formas parasitarias inoculadas.

En las figuras 34, 35 y 36 se observan los porcentajes de recuperación obtenidos de *B. coli*, *G. duodenalis* y *P. muricola*, respectivamente, para las dos especies de PNH y con cada una de las técnicas utilizadas. La figura 37 muestra las recuperaciones de los tres parásitos para cada una de las dos especies de PNH. En esta última, se observa que, para ambas especies de PNH, los mayores porcentajes de recuperación correspondieron a *G. duodenalis*, seguida de *B. coli*. En último lugar con porcentajes muy bajos se halló *P. muricola*.

Los porcentajes de recuperación de formas parasitarias en heces de mangabey fueron bajos para las tres especies parasitarias inoculadas. Los valores de *B. coli* obtenidos estuvieron comprendidos entre 3,9% y 25,5%, los de *G. duodenalis* entre 29,3% y 44,2% y los de *P. muricola* entre 0% y 8,9%. En el caso de las heces de cercopiteco de brazza, todos los porcentajes encontrados fueron inferiores a los hallados con heces de mangabey.

Los porcentajes de recuperación de *P. muricola* en mono vervet tampoco superaron el 10% y al comparar los dos métodos de homogenización y filtrado ninguno presentó diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 14. Resultados de recuperación de *B. coli* a partir de heces de mangabey de coronilla blanca.

	FT-Na		FO-Na		FM-Na		FT-Zn		FO-Zn		FM-Zn		SC		SG	
	FF	MG	FF	MG	FF	MG	FF	MG								
1	0	1	0	0	3	1	4	1	6	0	0	0	0	0	0	0
2	2	0	3	1	0	1	0	2	8	2	5	2	2	5	0	0
3	3	0	2	2	2	1	4	0	0	5	4	2	6	4	1	3
4	0	2	0	0	0	2	5	0	6	6	2	1	4	0	2	0
5	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	1	0	2	0	3
6	2	0	0	0	1	0	2	2	6	3	0	0	8	6	0	0
7	0	1	3	2	1	2	0	0	0	0	2	0	2	7	4	1
8	1	0	2	2	0	0	2	2	2	5	0	0	2	1	0	0
9	1	1	3	2	2	0	2	1	5	4	0	2	2	0	3	2
10	0	0	0	0	0	1	0	0	0	5	0	0	2	0	2	0
+	5	4	5	5	5	6	6	6	6	7	4	5	8	6	5	4
\bar{X}	0,90	0,50	1,30	0,90	0,90	0,80	1,90	1,00	3,30	3,00	1,30	0,80	2,80	2,50	1,20	0,90
EE	0,35	0,22	0,45	0,32	0,35	0,25	0,61	0,30	1,01	0,75	0,60	0,29	0,8	0,87	0,47	0,41
S	1,10	0,71	1,42	0,99	1,10	0,79	1,91	0,94	3,20	2,36	1,89	0,92	2,53	2,76	1,48	1,29
Re	6,97	3,87	10,06	6,97	6,97	6,19	14,71	7,74	25,54	23,22	10,06	6,19	21,67	19,35	9,29	6,97
%	50	40	50	50	50	60	60	60	60	70	40	50	80	60	50	40

FT-Na: flotación en tubo con solución de cloruro sódico; FO-Na: flotación en Ovatecor® con solución de cloruro sódico; FM-Na: flotación en Mini-flotac® con solución de cloruro sódico; FT-Zn: flotación en tubo con solución de sulfato de zinc; FO-Zn: flotación en Ovatecor® con solución de sulfato de zinc; FM-Zn: flotación en Mini-flotac® con solución de sulfato de zinc; SC: sedimentación con etil-acetato-formalina; SG: sedimentación por gravedad; FF: método de homogenización y filtrado con Fill-flotac®; MG: Método de homogenización con mortero y gasas; +: cantidad de muestras positivas; X: Promedio del número de formas parasitarias recuperadas; EE: error estándar; S: desviación estándar; Re: Recuperación de formas parasitarias; %: Porcentaje de muestras positivas con una concentración de 6,46 ppg.

Tabla 15. Resultados de recuperación de *B. coli* a partir de heces de cercopiteco de brazza.

	FT-Na		FO-Na		FM-Na		FT-Zn		FO-Zn		FM-Zn		SC		SG	
	FF	MG	FF	MG	FF	MG										
1	0	0	0	1	1	1	1	0	2	0	1	1	0	0	0	0
2	1	0	1	1	1	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
3	2	1	2	0	0	1	0	2	1	1	1	0	0	0	0	0
4	1	0	0	0	0	0	2	0	1	1	0	0	1	0	0	0
5	0	2	0	1	2	2	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
6	1	0	0	1	0	1	1	2	1	1	0	0	0	0	0	0
7	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0
8	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0
9	1	1	2	0	0	0	2	2	0	1	1	1	0	0	0	0
10	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
+	5	5	4	5	5	5	6	5	6	6	4	4	1	1	0	0
\bar{X}	0,60	0,60	0,60	0,50	0,60	0,60	0,90	0,80	0,70	0,60	0,40	0,40	0,10	0,10	0	0
EE	0,22	0,22	0,27	0,17	0,22	0,22	0,28	0,29	0,21	0,16	0,16	0,16	0,1	0,1	0	0
S	0,70	0,70	0,84	0,53	0,70	0,70	0,88	0,92	0,68	0,52	0,52	0,52	0,32	0,32	0	0
Re	4,64	4,64	4,64	3,87	4,64	4,64	6,97	6,19	5,42	4,64	3,10	3,10	0,77	0,77	0	0
%	50	50	40	50	50	50	60	50	60	60	40	40	10	10	0	0

FT-Na: flotación en tubo con solución de cloruro sódico; FO-Na: flotación en Ovatecor® con solución de cloruro sódico; FM-Na: flotación en Mini-flotac® con solución de cloruro sódico; FT-Zn: flotación en tubo con solución de sulfato de zinc; FO-Zn: flotación en Ovatecor® con solución de sulfato de zinc; FM-Zn: flotación en Mini-flotac® con solución de sulfato de zinc; SC: sedimentación con etil-acetato-formalina; SG: sedimentación por gravedad; FF: método de homogenización y filtrado con Fill-flotac®; MG: Método de homogenización con mortero y gasas; +: cantidad de muestras positivas; X: Promedio del número de formas parasitarias recuperadas; EE: error estándar; S: desviación estándar; Re: Recuperación de formas parasitarias; %: Porcentaje de muestras positivas con una concentración de 6,46 ppg.

Tabla 16. Resultados de recuperación de *G. duodenalis* a partir de heces de mangabey de coronilla blanca.

	FT-Na		FO-Na		FM-Na		FT-Zn		FO-Zn		FM-Zn		SC		SG	
	FF	MG														
1	27	25	28	27	26	36	33	31	27	30	40	33	25	26	19	19
2	30	27	27	26	29	23	32	28	36	32	35	35	28	25	22	18
3	32	19	26	25	27	30	38	28	24	33	36	32	31	28	24	24
4	26	28	24	19	26	28	27	30	32	25	32	38	30	27	27	24
5	25	22	27	24	29	27	30	31	28	27	39	39	28	28	22	26
6	28	28	31	28	30	26	19	25	29	28	37	36	29	28	29	25
7	29	19	19	27	23	28	32	29	33	36	36	37	25	24	32	27
8	22	25	24	26	24	22	31	34	32	31	34	36	28	26	20	28
9	21	28	27	29	28	21	35	36	37	36	35	38	26	25	21	27
10	19	29	29	29	37	36	37	36	40	39	41	37	26	27	26	25
+	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
X	25,90	25,00	26,20	26,00	27,90	27,70	31,40	30,80	31,80	31,70	36,50	36,10	27,60	26,40	24,20	24,30
EE	1,32	1,19	1,04	0,93	1,23	1,65	1,72	1,14	1,56	1,4	0,88	0,71	0,65	0,45	1,33	1,05
S	4,17	3,77	3,29	2,94	3,90	5,23	5,44	3,62	4,93	4,42	2,80	2,23	2,07	1,43	2,07	3,34
Re	31,39	30,30	31,76	31,52	33,82	33,58	38,06	37,33	38,55	38,42	44,24	43,76	33,45	32	29,33	29,45
%	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

FT-Na: flotación en tubo con solución de cloruro sódico; FO-Na: flotación en Ovatecor® con solución de cloruro sódico; FM-Na: flotación en Mini-flotac® con solución de cloruro sódico; FT-Zn: flotación en tubo con solución de sulfato de zinc; FO-Zn: flotación en Ovatecor® con solución de sulfato de zinc; FM-Zn: flotación en Mini-flotac® con solución de sulfato de zinc; SC: sedimentación con etil-acetato-formalina; SG: sedimentación por gravedad; FF: método de homogenización y filtrado con Fill-flotac®; MG: Método de homogenización con mortero y gasas; +: cantidad de muestras positivas; X: Promedio del número de formas parasitarias recuperadas; EE: error estándar; S: desviación estándar; Re: Recuperación de formas parasitarias; %: Porcentaje de muestras positivas con una concentración de 41,25 qpg.

Tabla 17. Resultados de recuperación de *G. duodenalis* a partir de heces de cercopiteco de brazza.

	FT-Na		FO-Na		FM-Na		FT-Zn		FO-Zn		FM-Zn		SC		SG	
	FF	MG														
1	11	25	10	28	24	23	31	30	29	27	30	22	20	25	24	16
2	20	20	16	20	22	24	33	26	28	30	32	28	12	26	28	24
3	12	23	14	23	25	19	28	27	28	28	29	32	25	28	22	23
4	15	18	17	26	18	20	27	25	30	27	28	26	20	23	27	27
5	18	18	18	27	23	25	29	26	25	31	27	29	26	20	26	24
6	26	20	29	17	25	18	31	30	22	27	30	32	28	23	27	18
7	29	26	17	12	19	23	27	28	22	30	23	25	26	22	20	29
8	27	26	22	10	20	17	25	34	27	23	25	27	19	23	19	26
9	25	25	28	15	23	22	32	30	30	26	27	29	30	24	26	28
10	20	12	27	16	19	22	30	35	38	27	32	32	26	23	15	23
+	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
X	20,30	21,30	19,80	19,40	21,80	21,30	29,30	29,10	27,90	27,60	28,30	28,20	23,20	23,70	23,40	23,80
EE	2,01	1,44	2,03	2,02	0,83	0,84	0,80	1,07	1,46	0,73	0,92	1,05	1,7	0,7	1,35	1,32
S	6,36	4,55	6,43	6,40	2,62	2,67	2,54	3,38	4,61	2,32	2,91	3,33	5,37	2,21	4,27	4,16
Re	24,61	25,82	24,00	23,52	26,42	25,82	35,52	35,27	33,82	33,45	34,30	34,18	28,12	28,73	28,36	28,85
%	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

FT-Na: flotación en tubo con solución de cloruro sódico; FO-Na: flotación en Ovatecor® con solución de cloruro sódico; FM-Na: flotación en Mini-flotac® con solución de cloruro sódico; FT-Zn: flotación en tubo con solución de sulfato de zinc; FO-Zn: flotación en Ovatecor® con solución de sulfato de zinc; FM-Zn: flotación en Mini-flotac® con solución de sulfato de zinc; SC: sedimentación con etil-acetato-formalina; SG: sedimentación por gravedad; FF: método de homogenización y filtrado con Fill-flotac®; MG: Método de homogenización con mortero y gasas; +: cantidad de muestras positivas; X: Promedio del número de formas parasitarias recuperadas; EE: error estándar; S: desviación estándar; Re: Recuperación de formas parasitarias; %: Porcentaje de muestras positivas con una concentración de 41,25 qpg.

Tabla 18. Resultados de recuperación de *P. muricola* a partir de heces de mangabey de coronilla blanca.

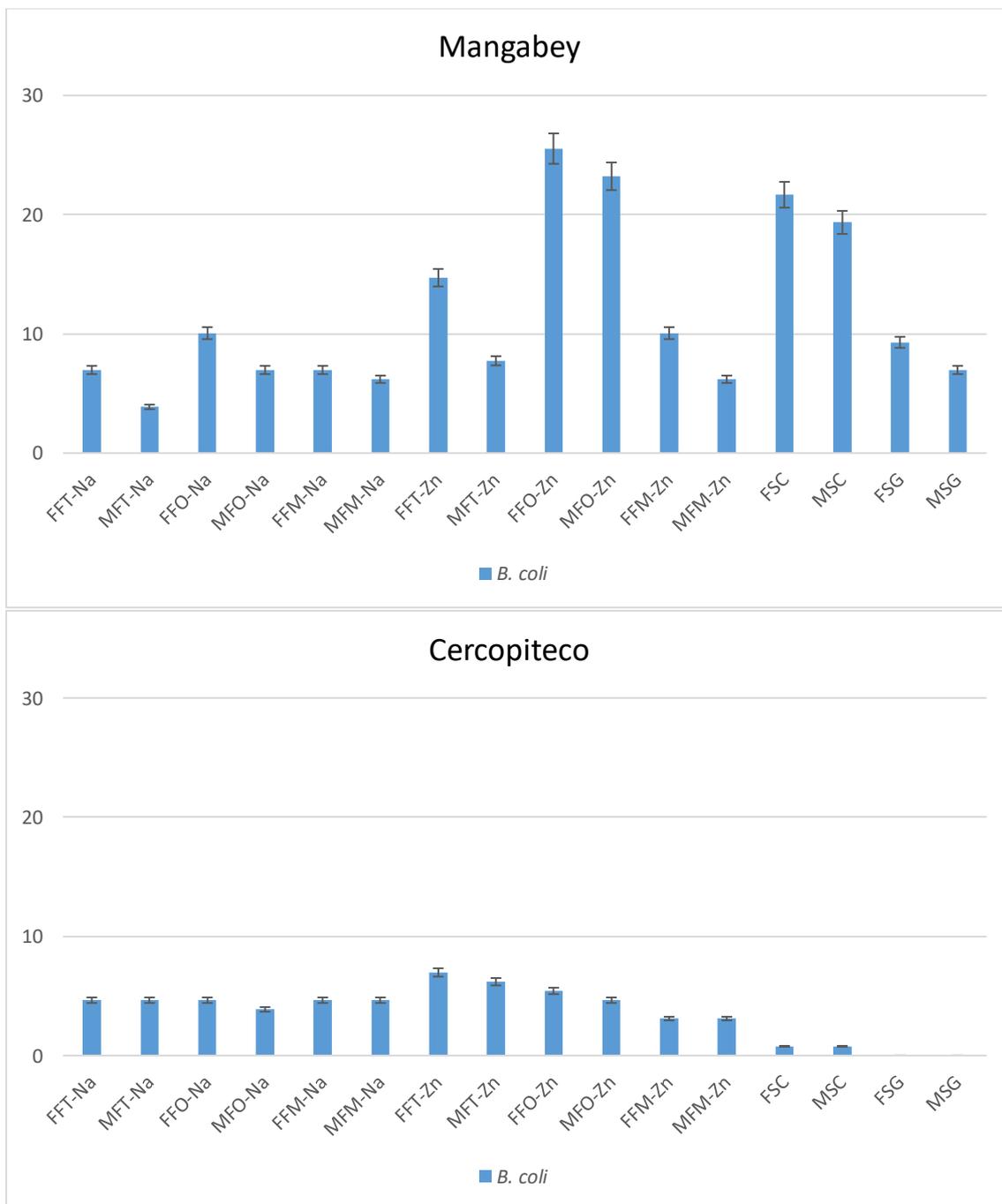
	FT-Na		FO-Na		FM-Na		FT-Zn		FO-Zn		FM-Zn		SC		SG	
	FF	MG	FF	MG	FF	MG	FF	MG	FF	MG	FF	MG	FF	MG	FF	MG
1	0	0	0	0	0	0	7	3	7	7	10	8	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	7	5	4	5	5	7	0	0	0	0
3	0	0	1	0	0	0	3	8	5	4	8	7	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	5	6	5	7	8	10	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	2	2	2	3	10	8	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	4	5	5	5	11	9	1	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	5	4	4	4	7	8	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	5	6	7	5	8	10	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	4	3	7	6	10	10	2	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	5	5	6	5	12	9	0	1	0	0
+	0	0	1	0	0	0	10	10	10	10	10	10	2	1	0	0
X	0	0	0,10	0	0	0	4,70	4,70	5,20	5,10	8,90	8,60	0,30	0,10	0	0
EE	0	0	1	0	0	0	0,5	0,56	0,51	0,41	0,66	0,37	0,21	0,1	0	0
S	0	0	0,30	1,51	2,11	0,30	1,86	1,68	1,58	1,27	2,66	2,82	0,65	0,30	0	0
Re	0	0	0,01	0,00	0,00	0,00	0,68	0,68	0,75	0,73	1,28	1,24	0,04	0,01	0	0
%	0	0	10	0	0	0	100	100	100	100	100	100	20	10	0	0

FT-Na: flotación en tubo con solución de cloruro sódico; FO-Na: flotación en Ovatector® con solución de cloruro sódico; FM-Na: flotación en Mini-flotac® con solución de cloruro sódico; FT-Zn: flotación en tubo con solución de sulfato de zinc; FO-Zn: flotación en Ovatector® con solución de sulfato de zinc; FM-Zn: flotación en Mini-flotac® con solución de sulfato de zinc; SC: sedimentación con etil-acetato-formalina; SG: sedimentación por gravedad; FF: método de homogenización y filtrado con Fill-flotac®; MG: Método de homogenización con mortero y gasas; +: cantidad de muestras positivas; X: Promedio del número de formas parasitarias recuperadas; EE: error estándar; S: desviación estándar; Re: Recuperación de formas parasitarias; %: Porcentaje de muestras positivas con una concentración de 348 hpg.

Tabla 19. Resultados de recuperación de *P. muricola* a partir de heces de cercopiteco de brazza.

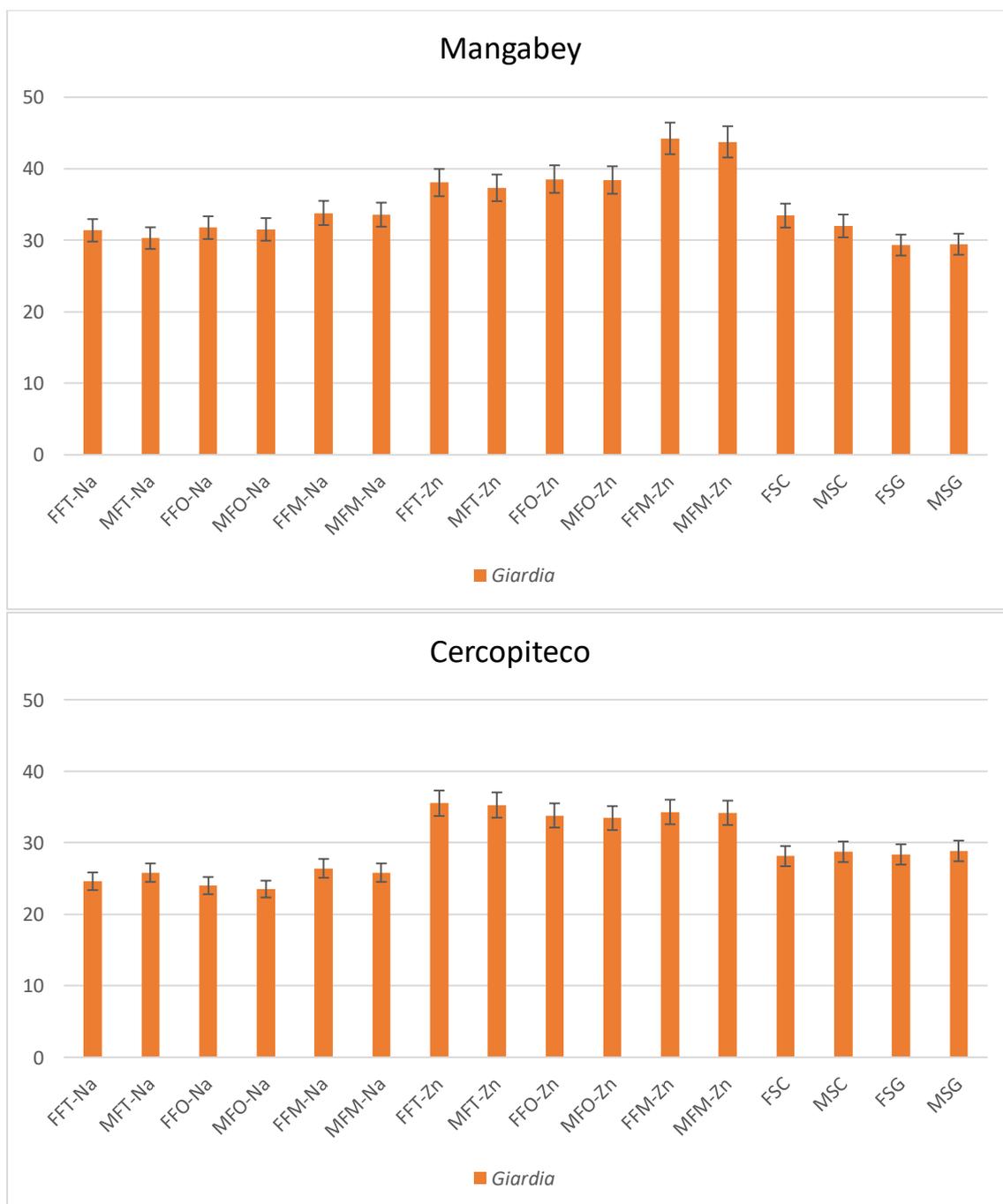
	FT-Na		FO-Na		FM-Na		FT-Zn		FO-Zn		FM-Zn		SC		SG	
	FF	MG	FF	MG	FF	MG	FF	MG	FF	MG	FF	MG	FF	MG	FF	MG
1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	2	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	1	1	0	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
5	0	0	1	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
7	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	1	0	0	3	0	1	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	1	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
+	0	0	5	5	7	1	1	5	4	4	0	0	0	0	0	0
X	0	0	0,60	0,70	0,10	0,10	0,90	0,60	0,50	0,40	0	0	0	0	0	0
EE	0	0	0,22	0,15	0,10	0,10	0,35	0,27	0,22	0,22	0	0	0	0	0	0
S	0	0	0,69	0,48	0,32	0,32	1,10	0,84	0,71	0,70	0	0	0	0	0	0
Re	0	0	0,09	0,10	0,01	0,01	0,13	0,09	0,07	0,06	0	0	0	0	0	0
%	0	0	50	50	70	10	10	50	40	40	0	0	0	0	0	0

FT-Na: flotación en tubo con solución de cloruro sódico; FO-Na: flotación en Ovatector® con solución de cloruro sódico; FM-Na: flotación en Mini-flotac® con solución de cloruro sódico; FT-Zn: flotación en tubo con solución de sulfato de zinc; FO-Zn: flotación en Ovatector® con solución de sulfato de zinc; FM-Zn: flotación en Mini-flotac® con solución de sulfato de zinc; SC: sedimentación con etil-acetato-formalina; SG: sedimentación por gravedad; FF: método de homogenización y filtrado con Fill-flotac®; MG: Método de homogenización con mortero y gasas; +: cantidad de muestras positivas; X: Promedio del número de formas parasitarias recuperadas; EE: error estándar; S: desviación estándar; Re: Recuperación de formas parasitarias; %: Porcentaje de muestras positivas con una concentración de 348 hpg.



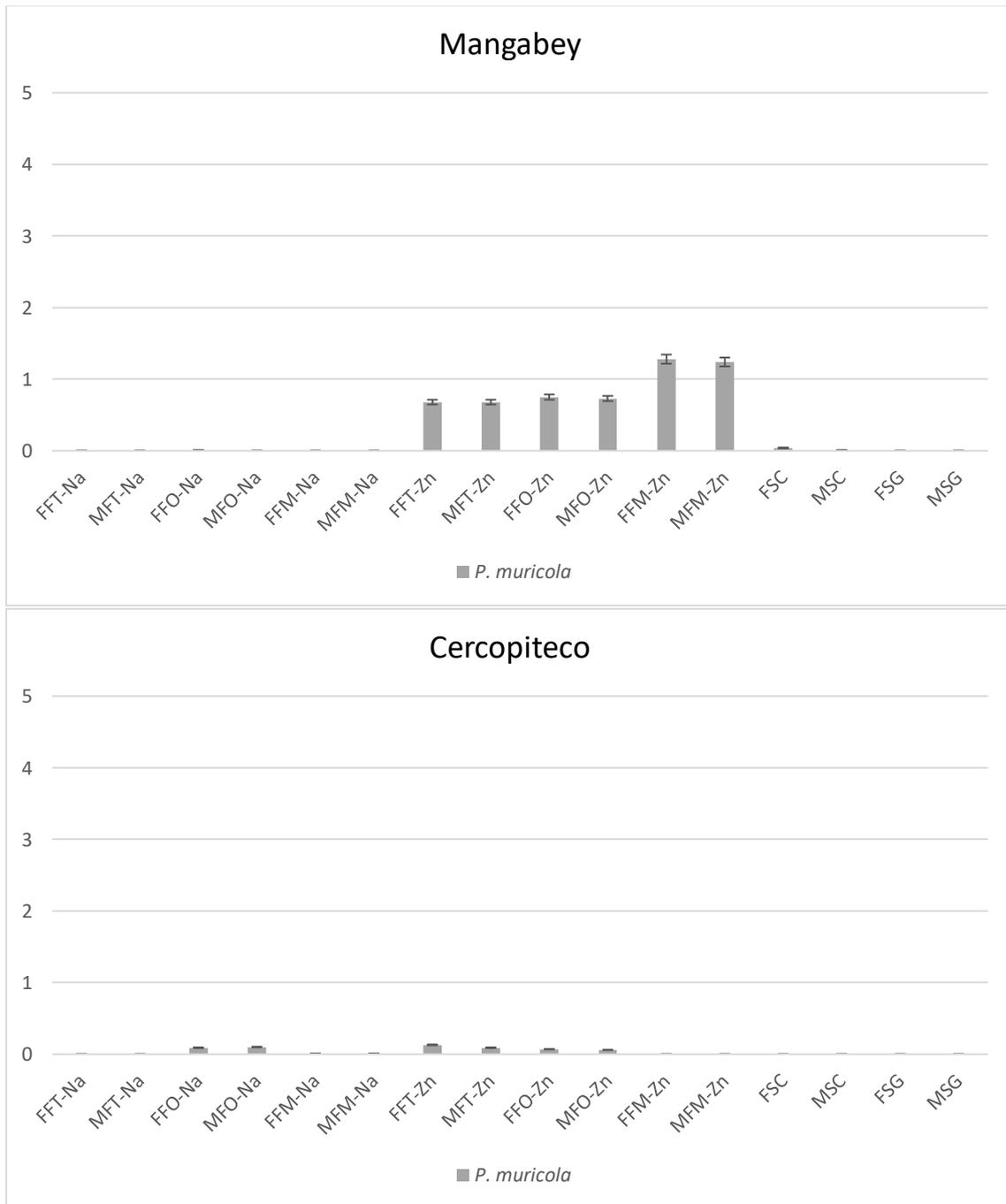
FFT-Na: flotación en tubo con solución de cloruro sódico procesada con Fill-flotac®; MFT-Na: flotación en tubo con solución de cloruro sódico procesada con mortero y gasas; FFO-Na: flotación en Ovatector® con solución de cloruro sódico procesada con Fill-flotac®; MFO-Na: flotación en Ovatector® con solución de cloruro sódico procesada con mortero y gasas; FFM-Na: flotación en Mini-flotac® con solución de cloruro sódico procesada con mortero y gasas; MFM-Na: flotación en Mini-flotac® con solución de cloruro sódico procesada con mortero y gasas; FFT-Zn: flotación en tubo con solución de sulfato de zinc procesada con Fill-flotac®; MFT-Zn: flotación en tubo con solución de sulfato de zinc procesada con mortero y gasas; FFO-Zn: flotación en Ovatector® con solución de sulfato de zinc procesada con Fill-flotac®; MFO-Zn: flotación en Ovatector® con solución de sulfato de zinc procesada con mortero y gasas; FFM-Zn: flotación en Mini-flotac® con solución de sulfato de zinc procesada con mortero y gasas; MFM-Zn: flotación en Mini-flotac® con solución de sulfato de zinc procesada con mortero y gasas; FSC: sedimentación con etil-acetato-formalina procesada con Fill-flotac®; MSC: sedimentación con etil-acetato-formalina procesada con mortero y gasas; FSG: sedimentación por gravedad procesada con Fill-flotac®; MSG: sedimentación por gravedad procesada con mortero y gasas.

Figura 34. Porcentaje de recuperación de *B. coli* para mangabey de coronilla blanca (arriba) y para cercopiteco de brazza (abajo).



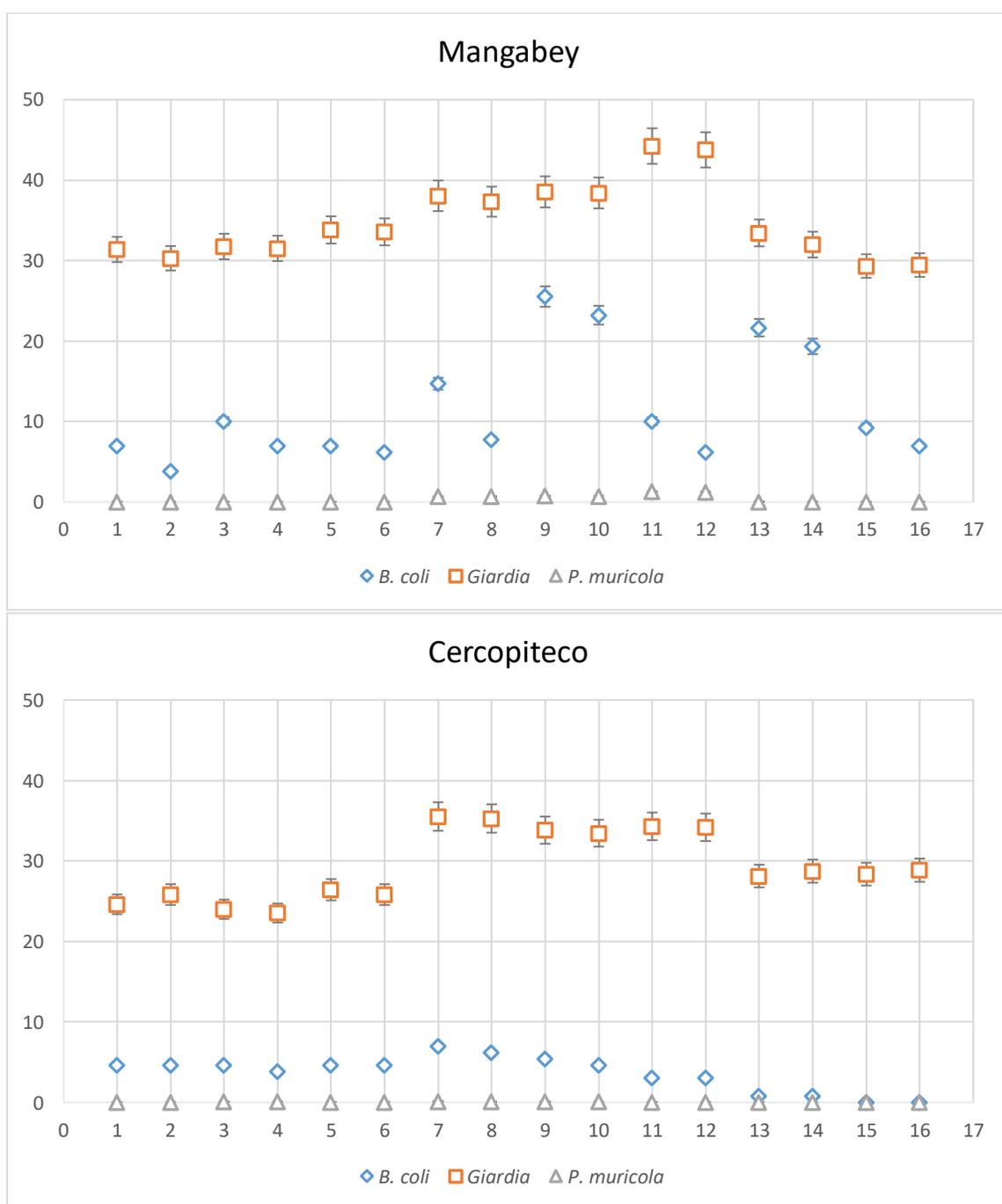
FFT-Na: flotación en tubo con solución de cloruro sódico procesada con Fill-flotac®; MFT-Na: flotación en tubo con solución de cloruro sódico procesada con mortero y gasas; FFO-Na: flotación en Ovatector® con solución de cloruro sódico procesada con Fill-flotac®; MFO-Na: flotación en Ovatector® con solución de cloruro sódico procesada con mortero y gasas; FFM-Na: flotación en Mini-flotac® con solución de cloruro sódico procesada con mortero y gasas; MFM-Na: flotación en Mini-flotac® con solución de cloruro sódico procesada con mortero y gasas; FFT-Zn: flotación en tubo con solución de sulfato de zinc procesada con Fill-flotac®; MFT-Zn: flotación en tubo con solución de sulfato de zinc procesada con mortero y gasas; FFO-Zn: flotación en Ovatector® con solución de sulfato de zinc procesada con Fill-flotac®; MFO-Zn: flotación en Ovatector® con solución de sulfato de zinc procesada con mortero y gasas; FFM-Zn: flotación en Mini-flotac® con solución de sulfato de zinc procesada con mortero y gasas; MFM-Zn: flotación en Mini-flotac® con solución de sulfato de zinc procesada con mortero y gasas; FSC: sedimentación con etil-acetato-formalina procesada con Fill-flotac®; MSC: sedimentación con etil-acetato-formalina procesada con mortero y gasas; FSG: sedimentación por gravedad procesada con Fill-flotac®; MSG: sedimentación por gravedad procesada con mortero y gasas.

Figura 35. Porcentaje de recuperación de *G. duodenalis*. para mangabey de coronilla blanca (arriba) y para cercopiteco de brazza (abajo).



FFT-Na: flotación en tubo con solución de cloruro sódico procesada con Fill-flotac®; MFT-Na: flotación en tubo con solución de cloruro sódico procesada con mortero y gasas; FFO-Na: flotación en Ovatecor® con solución de cloruro sódico procesada con Fill-flotac®; MFO-Na: flotación en Ovatecor® con solución de cloruro sódico procesada con mortero y gasas; FFM-Na: flotación en Mini-flotac® con solución de cloruro sódico procesada con Fill-flotac®; MFM-Na: flotación en Mini-flotac® con solución de cloruro sódico procesada con mortero y gasas; FFT-Zn: flotación en tubo con solución de sulfato de zinc procesada con Fill-flotac®; MFT-Zn: flotación en tubo con solución de sulfato de zinc procesada con mortero y gasas; FFO-Zn: flotación en Ovatecor® con solución de sulfato de zinc procesada con Fill-flotac®; MFO-Zn: flotación en Ovatecor® con solución de sulfato de zinc procesada con mortero y gasas; FFM-Zn: flotación en Mini-flotac® con solución de sulfato de zinc procesada con Fill-flotac®; MFM-Zn: flotación en Mini-flotac® con solución de sulfato de zinc procesada con mortero y gasas; FSC: sedimentación con etil-acetato-formalina procesada con Fill-flotac®; MSC: sedimentación con etil-acetato-formalina procesada con mortero y gasas; FSG: sedimentación por gravedad procesada con Fill-flotac®; MSG: sedimentación por gravedad procesada con mortero y gasas.

Figura 36. Porcentaje de recuperación de *P. muricola* para mangabey de coronilla blanca (arriba) y para cercopiteco de brazza (abajo).



1: flotación en tubo con solución de cloruro sódico procesada con Fill-flotac®; 2: flotación en tubo con solución de cloruro sódico procesada con mortero y gasas; 3: flotación en Ovatector® con solución de cloruro sódico procesada con Fill-flotac®; 4: flotación en Ovatector® con solución de cloruro sódico procesada con mortero y gasas; 5: flotación en Mini-flotac® con solución de cloruro sódico procesada con Fill-flotac®; 6: flotación en Mini-flotac® con solución de cloruro sódico procesada con mortero y gasas; 7: flotación en tubo con solución de sulfato de zinc procesada con Fill-flotac®; 8: flotación en tubo con solución de sulfato de zinc procesada con mortero y gasas; 9: flotación en Ovatector® con solución de sulfato de zinc procesada con Fill-flotac®; 10: flotación en Ovatector® con solución de sulfato de zinc procesada con mortero y gasas; 11: flotación en Mini-flotac® con solución de sulfato de zinc procesada con Fill-flotac®; 12: flotación en Mini-flotac® con solución de sulfato de zinc procesada con mortero y gasas; 13: sedimentación con etil-acetato-formalina procesada con Fill-flotac®; 14: sedimentación con etil-acetato-formalina procesada con mortero y gasas; 15: sedimentación por gravedad procesada con Fill-flotac®; 16: sedimentación por gravedad procesada con mortero y gasas.

Figura 37. Porcentaje de recuperación de las formas parasitarias para mangabey de coronilla blanca (arriba) y para cercopiteco de brazza (abajo).

El análisis estadístico (tabla 20) mostró únicamente diferencias significativas entre la comparación del procesado mediante mortero y gasas y el Fill-flotac® en mangabey, para la recuperación de formas parasitarias de *G. duodenalis* con sedimentación de etil-acetato ($p=0,046$), siendo la recuperación superior mediante Fill-flotac® (32%) que con el procedimiento de mortero y gasas (29,33%).

Tabla 20. Comparación de Fill-flotac® y mortero y gasas utilizando los p-valores de los tests de Wilcoxon y McNemar.

		<i>B. coli</i>	<i>G. duodenalis</i>	<i>P. muricola</i>
FT-Na	Mangabey	0,391	0,677	1
	Cercopiteco	1	0,799	1
FO-Na	Mangabey	0,102	0,592	0,317
	Cercopiteco	0,725	0,645	0,655
FM-Na	Mangabey	0,773	0,798	1
	Cercopiteco	1	0,918	1
FT-Zn	Mangabey	0,248	0,798	0,886
	Cercopiteco	0,792	0,472	0,587
FO-Zn	Mangabey	0,671	0,642	0,792
	Cercopiteco	0,705	1	0,783
FM-Zn	Mangabey	0,288	0,726	0,582
	Cercopiteco	1	0,807	1
SC	Mangabey	0,763	0,046	0,414
	Cercopiteco	1	0,798	1
SG	Mangabey	0,671	0,888	1
	Cercopiteco	1	0,905	1

FT-Na: flotación en tubo con solución de cloruro sódico; FO-Na: flotación en Ovatector® con solución de cloruro sódico; FM-Na: flotación en Mini-flotac® con solución de cloruro sódico; FT-Zn: flotación en tubo con solución de sulfato de zinc; FO-Zn: flotación en Ovatector® con solución de sulfato de zinc; FM-Zn: flotación en Mini-flotac® con solución de sulfato de zinc; SC: sedimentación con etil-acetato-formalina; SG: sedimentación por gravedad.

4.2.2. Puesta a punto de las técnicas de recuperación de formas parasitarias a partir de heces inoculadas experimentalmente

4.2.2.1 Recuperación de las formas parasitarias y muestras positivas de formas parasitarias

En las figuras 38 y 39 se reflejan los porcentajes de las muestras positivas y el porcentaje de recuperación de formas parasitarias de helmintos respectivamente.

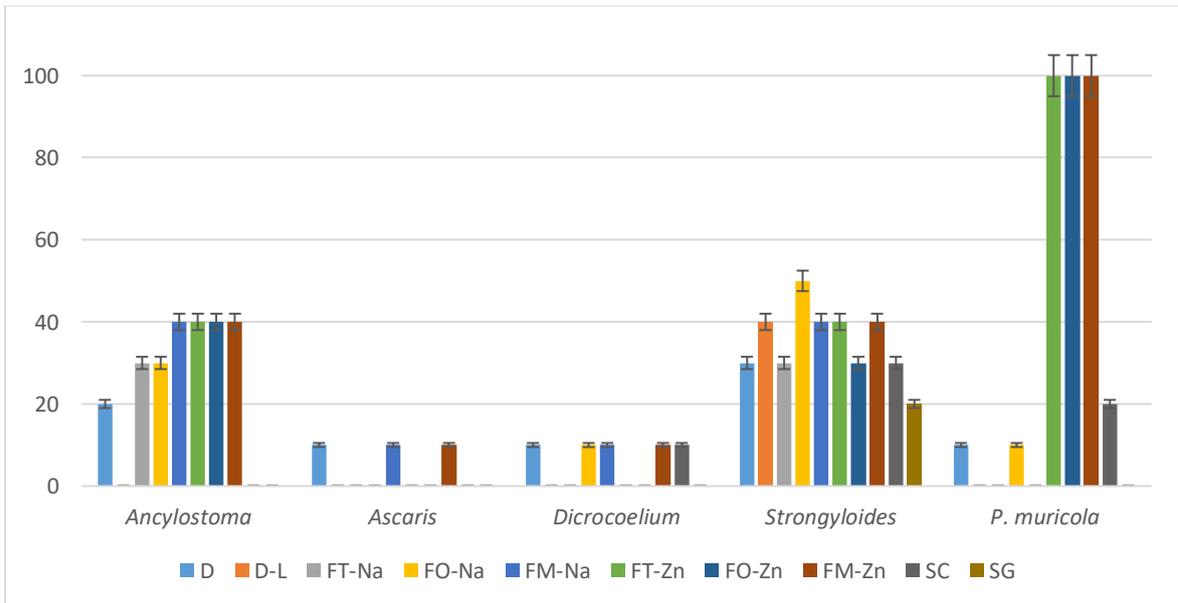
Los resultados obtenidos de muestras positivas para el género *Ancylostoma* fueron del 40% para las tres flotaciones con sulfato de zinc y para la flotación en Mini-flotac® con cloruro sódico, 30% para las flotaciones en tubo y en Ovatector® con cloruro sódico, 20% para el examen directo y 0% para el examen directo con lugol.

La tabla 21 muestra los p-valores obtenidos al comparar los métodos dos a dos, se puede observar que no hubo ninguna diferencia estadísticamente significativa.

Tabla 21. Comparación de la recuperación de *Ancylostoma* spp. con las distintas técnicas empleadas, utilizando los p-valores obtenidos del análisis estadístico.

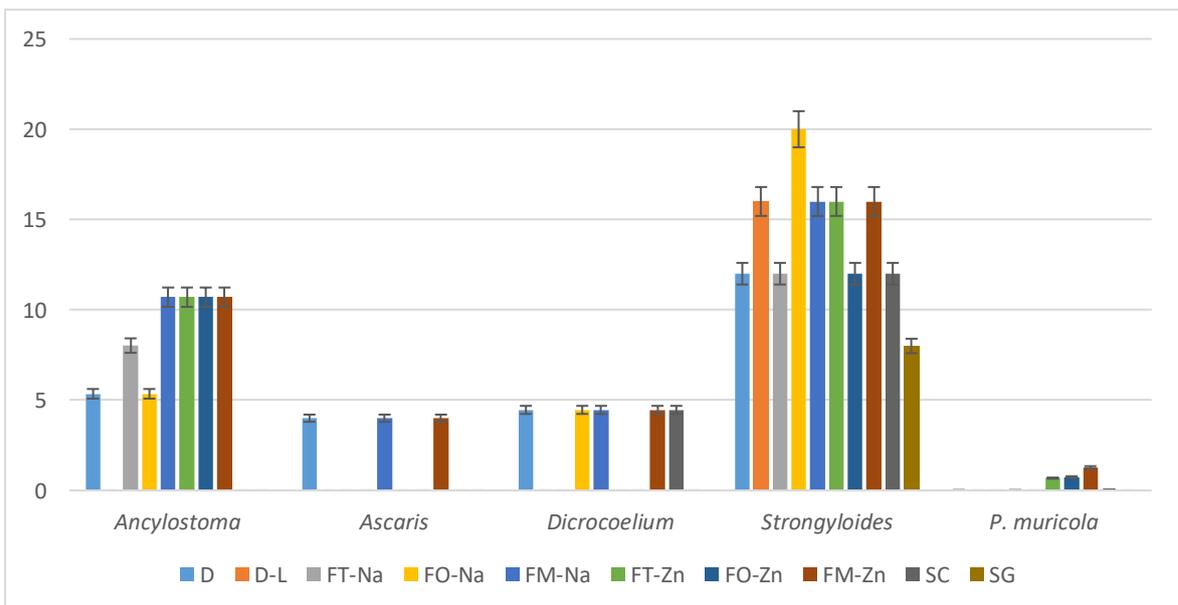
	D	DL	FT-NA	FO-NA	FM-NA	FT-ZN	FO-ZN	FM-ZN	SC	SG
DL	0,48	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FT-NA	1	0,25	-	-	-	-	-	-	-	-
FO-NA	1	0,25	1	-	-	-	-	-	-	-
FM-NA	0,62	0,25	1	1	-	-	-	-	-	-
FT-ZN	0,62	0,13	1	1	1	-	-	-	-	-
FO-ZN	0,68	0,13	1	1	1	1	-	-	-	-
FM-ZN	0,62	0,13	1	1	1	1	1	-	-	-
SC	0,48	-	0,25	0,25	0,13	0,13	0,13	0,13	-	-
SG	0,48	-	0,25	0,25	0,13	0,13	0,13	0,13	-	-

D: examen directo sin lugol; DL: examen directo con lugol; FT-Na: flotación en tubo con solución de cloruro sódico; FO-Na: flotación en Ovatector® con solución de cloruro sódico; FM-Na: flotación en Mini-flotac® con solución de cloruro sódico; FT-Zn: flotación en tubo con solución de sulfato de zinc; FO-Zn: flotación en Ovatector® con solución de sulfato de zinc; FM-Zn: flotación en Mini-flotac® con solución de sulfato de zinc; SC: sedimentación con etil-acetato-formalina; SG: sedimentación por gravedad.



D: examen directo; D-L: examen directo con lugol; FT-Na: flotación en tubo con solución de cloruro sódico; FO-Na: flotación en Ovatector® con solución de cloruro sódico; FM-Na: flotación en Mini-flotac® con solución de cloruro sódico; FT-Zn: flotación en tubo con solución de sulfato de zinc; FO-Zn: flotación en Ovatector® con solución de sulfato de zinc; FM-Zn: flotación en Mini-flotac® con solución de sulfato de zinc; SC: sedimentación con etil-acetato-formalina; SG: sedimentación por gravedad.

Figura 38. Porcentaje de muestras positivas a helmintos con las distintas técnicas empleadas.



D: examen directo; D-L: examen directo con lugol; FT-Na: flotación en tubo con solución de cloruro sódico; FO-Na: flotación en Ovatector® con solución de cloruro sódico; FM-Na: flotación en Mini-flotac® con solución de cloruro sódico; FT-Zn: flotación en tubo con solución de sulfato de zinc; FO-Zn: flotación en Ovatector® con solución de sulfato de zinc; FM-Zn: flotación en Mini-flotac® con solución de sulfato de zinc; SC: sedimentación con etil-acetato-formalina; SG: sedimentación por gravedad.

Figura 39. Porcentaje de recuperación de formas parasitarias de helmintos con las distintas técnicas empleadas.

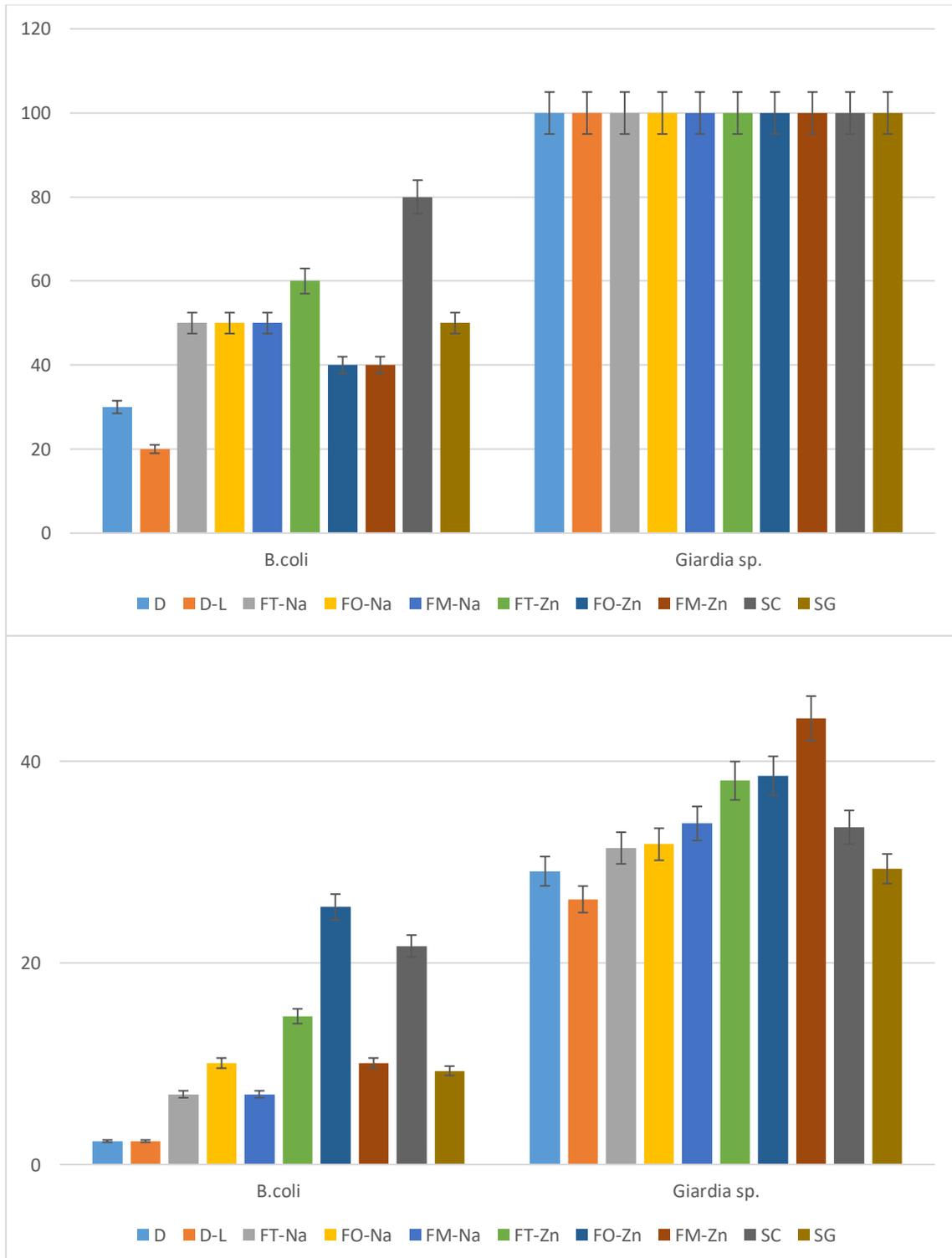
Los resultados obtenidos para el género *Ascaris* no superaron el 10%. Las técnicas de examen directo con lugol, las flotaciones en tubo y en Ovatector® con ambas soluciones y las dos sedimentaciones no recuperaron ninguna forma parasitaria. Por su parte, mediante el examen directo sin lugol y las flotaciones en Mini-flotac® con ambas soluciones se obtuvo un 10% de muestras positivas con un porcentaje de recuperación de 2,7%.

Los resultados obtenidos para el género *Dicrocoelium* fueron similares a los del género *Ascaris*. Las únicas técnicas que recuperaron formas parasitarias fueron el examen directo, la flotación en Ovatector® con cloruro sódico, ambas flotaciones en Mini-flotac® y la sedimentación con etil-acetato-formalina registrando un 10% de muestras positivas con un porcentaje de recuperación del 2,7%.

Para el género *Strongyloides*, el examen directo sin lugol, la flotación en tubo con cloruro sódico y la flotación Ovatector® con sulfato de zinc mostraron un 30% de muestras positivas con una recuperación del 8%. El examen directo con lugol, la flotación en tubo con cloruro sódico y ambas flotaciones con Mini-flotac® obtuvieron un 40% de muestras positivas y una recuperación del 10,7%. La flotación en Ovatector® con cloruro sódico, fue la que obtuvo un mayor porcentaje de muestras positivas alcanzando el 50% con una recuperación del 13,4%.

El examen directo con lugol, la sedimentación por gravedad y la flotación con cloruro sódico en tubo y en Mini-flotac® no obtuvieron resultados positivos a *P. muricola*. El examen directo sin lugol y la flotación en Ovatector® con cloruro sódico, obtuvieron un 10% de muestras positivas. Las tres flotaciones con sulfato de zinc resultaron positivas a todas las muestras contaminadas experimentalmente, mientras que la sedimentación con etil-acetato-formalina obtuvo un 20% de positivas.

En la figura 40, se reflejan los porcentajes de las muestras positivas y de recuperación de formas parasitarias de protozoos. Los resultados de muestras positivas obtenidas para protozoos son superiores que en helmintos.



D: examen directo; D-L: examen directo con lugol; FT-Na: flotación en tubo con solución de cloruro sódico; FO-Na: flotación en Ovatector® con solución de cloruro sódico; FM-Na: flotación en Mini-flotac® con solución de cloruro sódico; FT-Zn: flotación en tubo con solución de sulfato de zinc; FO-Zn: flotación en Ovatector® con solución de sulfato de zinc; FM-Zn: flotación en Mini-flotac® con solución de sulfato de zinc; SC: sedimentación con etil-acetato-formalina; SG: sedimentación por gravedad.

Figura 40. Porcentaje de muestras positivas (arriba) y porcentaje de recuperación de formas parasitarias de protozoos (abajo).

Los dos exámenes directos (con y sin lugol) obtuvieron el mismo porcentaje de recuperación de *B. coli*, 2,3%. Tanto la flotación en tubo como la flotación en Mini-flotac® con cloruro sódico recuperaron un 7% de las formas parasitarias. La flotación en Ovatector® con cloruro sódico y la flotación en Mini-flotac® con sulfato de zinc recuperaron el 10,1%. Las flotaciones en tubo y en Mini-flotac® con sulfato de zinc, recuperaron el 14,71% y 10,1% de las formas parasitarias respectivamente. Por último, la sedimentación con etil-acetato obtuvo una mayor recuperación (21,7%) que la sedimentación por gravedad (9,3%).

En ningún caso las diferencias encontradas en la recuperación de *B. coli* por las distintas técnicas fue estadísticamente significativa (tabla 22).

Tabla 22. Comparación de la recuperación de *B. coli* utilizando los p-valores obtenidos del análisis estadístico.

	D	DL	FT-Na	FO-Na	FM-Na	FT-Zn	FO-Zn	FM-Zn	SC	SG
DL	0,97	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FT-Na	0,39	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-
FO-Na	0,97	0,97	0,39	-	-	-	-	-	-	-
FM-Na	1,00	1,00	1,00	1,00	-	-	-	-	-	-
FT-Zn	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	-	-	-	-	-
FO-Zn	1,00	1,00	0,58	1,00	1,00	1,00	-	-	-	-
FM-Zn	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	-	-	-
SC	0,38	1,00	1,00	0,38	1,00	1,00	1,00	1,00	-	-
SG	1,00	1,00	0,64	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,57	-

D: examen directo sin lugol; DL: examen directo con lugol; FT-Na: flotación en tubo con solución de cloruro sódico; FO-Na: flotación en Ovatector® con solución de cloruro sódico; FM-Na: flotación en Mini-flotac® con solución de cloruro sódico; FT-Zn: flotación en tubo con solución de sulfato de zinc; FO-Zn: flotación en Ovatector® con solución de sulfato de zinc; FM-Zn: flotación en Mini-flotac® con solución de sulfato de zinc; SC: sedimentación con etil-acetato-formalina; SG: sedimentación por gravedad.

El análisis estadístico de los resultados obtenidos para *G. duodenalis* (tabla 23) mostró diferencias significativas. Al comparar la flotación en Mini-flotac® con cualquiera de las otras nueve técnicas, ésta obtuvo siempre un mayor porcentaje de recuperación (44,2%). Del mismo modo, los resultados que a continuación se detallan también presentaron diferencias significativas en la cantidad de formas parasitarias recuperadas. Los exámenes

directos obtuvieron una menor recuperación de *G. duodenalis* que las flotaciones en tubo (38,1%) y Ovatector® (38,6%) con sulfato de zinc y que la sedimentación de etil-acetato (33,5%). Además, el examen directo con lugol obtuvo una recuperación del 26,3% frente al 33,8% de la flotación en Mini-flotac® con cloruro sódico. La flotación en tubo con sulfato de zinc recuperó más cantidad de formas parasitarias que la sedimentación por gravedad (29,3%) y la flotación en tubo con cloruro sódico (31,4%). Por último, el porcentaje recuperado por la flotación en Ovatector® con sulfato de zinc fue superior al de la sedimentación por gravedad.

Tabla 23. Comparación de la recuperación de *G. duodenalis* utilizando los p-valores obtenidos con el análisis estadístico.

	D	DL	FT- Na	FO- Na	FM- Na	FT- Zn	FO- Zn	FM- Zn	SC	SG
DL	0,33	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FT-Na	0,36	0,12	-	-	-	-	-	-	-	-
FO-Na	0,08	0,06	0,87	-	-	-	-	-	-	-
FM-Na	0,05	0,04	0,47	0,08	-	-	-	-	-	-
FT-Zn	0,02	0,01	0,04	0,06	0,11	-	-	-	-	-
FO-Zn	0,01	0,00	0,06	0,06	0,06	0,57	-	-	-	-
FM-Zn	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,04	-	-	-
SC	0,04	0,02	0,22	0,31	0,88	0,11	0,06	0,01	-	-
SG	1	0,18	0,31	0,17	0,09	0,03	0,01	0,01	0,12	-

D: examen directo sin lugol; DL: examen directo con lugol; FT-Na: flotación en tubo con solución de cloruro sódico; FO-Na: flotación en Ovatector® con solución de cloruro sódico; FM-Na: flotación en Mini-flotac® con solución de cloruro sódico; FT-Zn: flotación en tubo con solución de sulfato de zinc; FO-Zn: flotación en Ovatector® con solución de sulfato de zinc; FM-Zn: flotación en Mini-flotac® con solución de sulfato de zinc; SC: sedimentación con etil-acetato-formalina; SG: sedimentación por gravedad.

4.2.2.2. Evaluación de recuperación de huevos de *P. muricola* a diferentes concentraciones

En la tabla 24 se expone el porcentaje de las muestras positivas y el porcentaje de la recuperación para cada una de las diez técnicas realizadas con distintas concentraciones de huevos de *P. muricola*.

Tabla 24. Porcentaje de muestras positivas y de recuperación de huevos de *P. muricola*.

C	D		D-L		FT-Na		FO-Na		FM-Na		FT-Zn		FO-Zn		FM-Zn		SC		SG		
	R	%	R	%	R	%	R	%	R	%	R	%	R	%	R	%	R	%	R	%	
5,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,11	10	0	0	0	0	0
135	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,04	10	0,04	10	0,04	10	0	0	0	0	0
348	0,01	10	0	0	0	0	0,01	10	0	0	0,68	100	0,75	100	1,28	100	0,04	20	0	0	0

D: examen directo sin lugol; DL: examen directo con lugol; FT-Na: flotación en tubo con solución de cloruro sódico; FO-Na: flotación en Ovatector® con solución de cloruro sódico; FM-Na: flotación en Mini-flotac® con solución de cloruro sódico; FT-Zn: flotación en tubo con solución de sulfato de zinc; FO-Zn: flotación en Ovatector® con solución de sulfato de zinc; FM-Zn: flotación en Mini-flotac® con solución de sulfato de zinc; SC: sedimentación con etil-acetato-formalina; SG: sedimentación por gravedad; C: concentración de *P. muricola* en hpg; R: recuperación de huevos de *P. muricola*; %: porcentaje de muestras positivas a *P. muricola*.

Los resultados muestran que las recuperaciones obtenidas son muy bajas para todas las concentraciones. Se observa que a medida que aumenta la concentración de *P. muricola*, aumentan las técnicas que lo identifican. Con una concentración de 5,6 hpg ninguna de las técnicas detectó ni un solo huevo, al aumentarla a 45 hpg únicamente la flotación en Mini-flotac® con sulfato de zinc recuperó 0,11% de las formas parasitarias presentes. Con una concentración de 135 hpg las tres flotaciones con sulfato de zinc tuvieron una recuperación de 0,04%. Es al alcanzar una concentración de 348 hpg que las flotaciones con sulfato de zinc determinaron que todas las muestras eran positivas, pero con un porcentaje de recuperación entre 0,68% y 1,28%. A esa concentración, otras técnicas como el examen directo sin lugol, la flotación en Ovatector® con cloruro sódico y la sedimentación de etil-acetato empiezan a recuperar alguna forma parasitaria.

4.2.2.3. Evaluación de soluciones de flotación a partir de heces inoculadas experimentalmente

En la tabla 25 se refleja los resultados obtenidos con la solución de cloruro sódico y con la de sulfato de zinc. La tabla muestra las veces que las soluciones fueron positivas o negativas. Tanto en el caso de *P. muricola* como en el de *G. duodenalis* la solución de sulfato de zinc presentó mejor recuperación de formas parasitarias que la de cloruro sódico.

Tabla 25. Comparación de soluciones de flotación para cada parásito.

	Ambas -	Ambas +	Na +, Zn -	Na -, Zn +	p-valor
<i>Strongyloides</i> spp.	10	3	9	8	1
<i>P. muricola</i>	0	1	0	29	0
<i>B. coli</i>	11	12	3	4	1
<i>G. duodenalis</i>	0	30	0	0	0

Ambas -: número de veces que ambas soluciones dieron muestras negativas; ambas +: número de veces que ambas soluciones dieron resultados positivos; Na+, Zn-: número de veces que la solución de cloruro sódico dio positivo y la solución de sulfato de zinc negativo; Na-, Zn+: número de veces que la solución de cloruro sódico dio negativo y la de sulfato de zinc positivo.

4.2.2.4 Evaluación de los distintos recipientes de flotación a partir de heces inoculadas experimentalmente

La valoración de los tres recipientes se realizó para los dos helmintos con mayor porcentaje de recuperación obtenido (*Strongyloides* spp. y *P. muricola*) y para los dos protozoos. Los resultados obtenidos están representados en la tabla 26.

El análisis estadístico mediante la prueba de Q de Cochran para la recuperación de *Strongyloides* spp. mediante los tres recipientes de flotación no presentó diferencia estadísticamente significativa ($p=0,926$) por lo que no se compararon dos a dos.

La prueba de Friedman detectó una diferencia estadísticamente significativa entre los tres recipientes para la recuperación de *P. muricola* y para *G. duodenalis*. Al compararlos dos a dos se observó que el Mini- flotac® obtuvo mayor recuperación de formas parasitarias y que estas diferencias fueron estadísticamente significativas tanto al compararlo con la flotación en tubo ($p=0,008$) como con en Ovatector® ($p=0,005$).

En el caso de *B. coli*, aunque la prueba de Friedman encontró una diferencia entre las técnicas, al compararlas dos a dos no sucedió lo mismo.

Tabla 26. Comparación de tres recipientes de flotación utilizando el p-valor del análisis estadístico.

Helminetos	Recipientes comparados	p-valor
<i>Strongyloides</i> spp.	Tubo, Ovatector® y Mini-flotac®	0,926
	Tubo vs Ovatector®	-
	Tubo vs Mini-flotac®	-
	Ovatector® vs Mini-flotac®	-
<i>P. muricola</i>	Tubo, Ovatector® y Mini-flotac®	0,003
	Tubo vs Ovatector®	0,256
	Tubo vs Mini-flotac®	0,008
	Ovatector® vs Mini-flotac®	0,005
Protozoos		
<i>B. coli</i>	Tubo, Ovatector® y Mini-flotac®	0,04
	Tubo vs Ovatector®	0,277
	Tubo vs Mini-flotac®	0,28
	Ovatector® vs Mini-flotac®	0,017
<i>G. duodenalis</i>	Tubo, Ovatector® y Mini-flotac®	0,029
	Tubo vs Ovatector®	0,574
	Tubo vs Mini-flotac®	0,019
	Ovatector® vs Mini-flotac®	0,006

4.2.3. Técnicas de recuperación de formas parasitarias en un estudio de campo

4.2.3.1. Formas parasitarias encontradas

En la figura 41 se observan los porcentajes de muestras positivas obtenidas para los helmintos (estrongilados, *Strongyloides* spp. y *P. muricola*) y protozoos (*B. coli* y *Entamoeba* spp.) más identificados.

La tabla 27 muestra el número de muestras positivas y el porcentaje de cada parásito identificado.

Tabla 27. Número y porcentaje de muestras positivas a cada parásito.

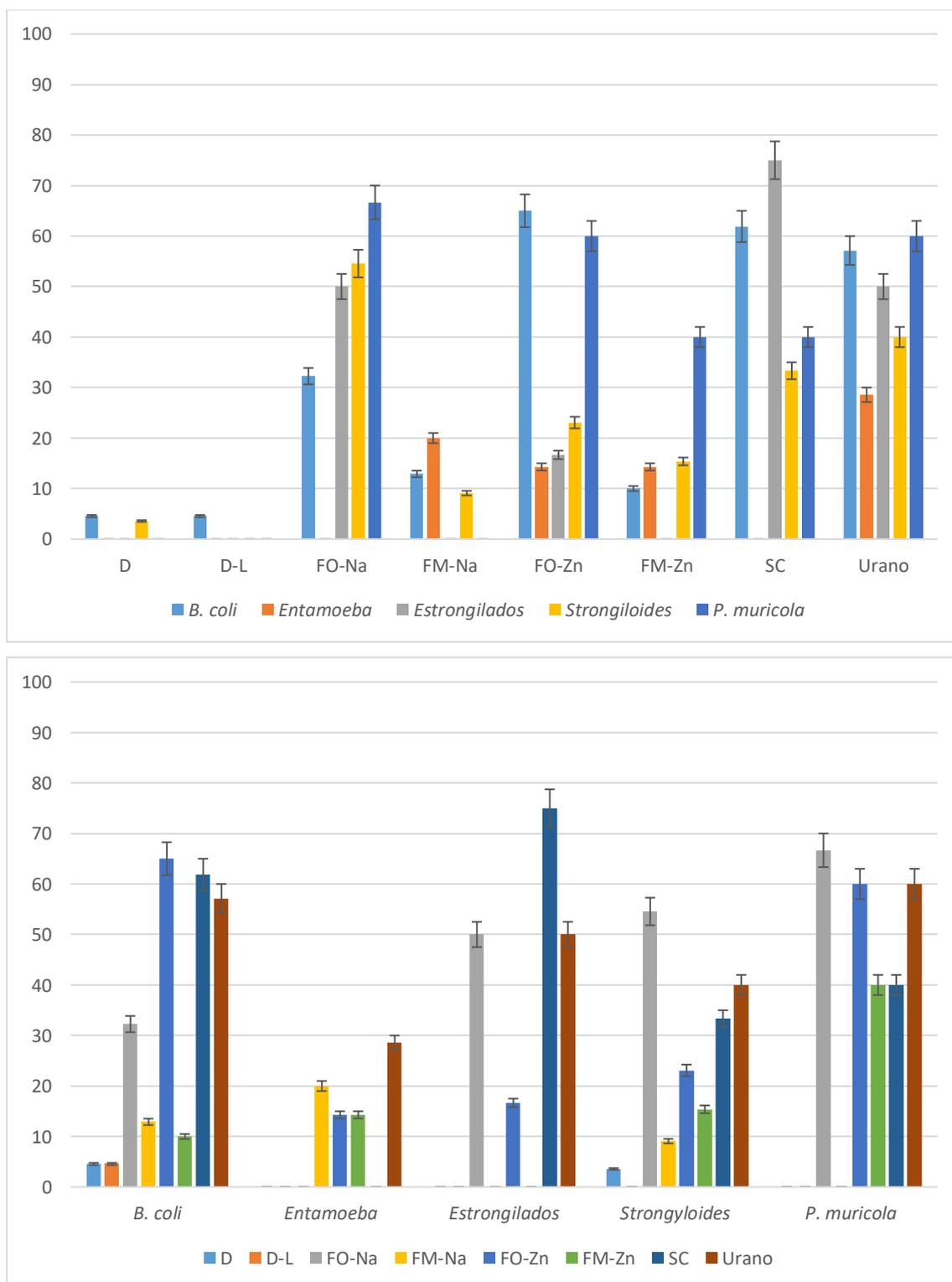
Parásito	Número de muestras positivas	%
<i>B. coli</i>	44	37,6
<i>Chilomastix</i> spp.	1	0,9
<i>Entamoeba</i> spp.	15	12,8
<i>G. duodenalis</i>	1	0,9
Estrongilados	7	6,0
<i>Strongyloides</i> spp.	28	23,9
<i>P. muricola</i>	10	8,6

%; porcentaje de muestras positivas identificadas sobre el total de muestras diagnosticadas como infectadas.

De las 117 muestras analizadas 60 fueron positivas a al menos un parásito gastrointestinal por alguna de las técnicas utilizadas. Los parásitos identificados fueron clasificados en siete grupos. El parásito más identificado fue *B. coli* apareciendo en 37,6% de las muestras analizadas, seguido de *Strongyloides* spp. (23,9%), *Entamoeba* spp. (12,8%) y *P. muricola* (8,6%). El resto de los parásitos encontrados fueron estrongilados (6%), *Chilomastix* spp. (0,9%) y *G. duodenalis* (0,9%).

En la tabla 28 se representan los porcentajes de muestras identificadas como positivas mediante el examen directo con y sin lugol. Se obtuvieron porcentajes entre 0 y 4,55%.

El análisis del índice kappa entre la técnica con lugol y sin lugol ofreció un acuerdo casi perfecto ($k=0,9$) para *B. coli* y moderado para *P. muricola* ($k=0,6$).



D: examen directo; D-L: examen directo con lugol; FT-Na: flotación en tubo con solución de cloruro sódico; FO-Na: flotación en Ovatecor® con solución de cloruro sódico; FM-Na: flotación en Mini-flotac® con solución de cloruro sódico; FT-Zn: flotación en tubo con solución de sulfato de zinc; FO-Zn: flotación en Ovatecor® con solución de sulfato de zinc; FM-Zn: flotación en Mini-flotac® con solución de sulfato de zinc; SC: sedimentación con etil-acetato-formalina; SG: sedimentación por gravedad.

Figura 41. Porcentaje de muestras positivas para cada parásito por técnicas (arriba) y por parásitos (abajo).

Tabla 28. Parásitos identificados por examen directo con y sin lugol.

	N	Directo sin lugol		Directo Lugol	
		n	%	n	%
<i>B. coli</i>	44	2	4,55	2	4,55
<i>Chilomastix</i> spp.	1	0	0	0	0
<i>Entamoeba</i> spp.	15	0	0	0	0
<i>G. duodenalis</i>	1	0	0	0	0
<i>Estrongilados</i>	7	0	0	0	0
<i>Strongyloides</i> spp.	28	1	3,57	0	0
<i>P. muricola</i>	10	0	0	0	0

N: número de muestras identificadas positivas con cualquiera de las técnicas diagnósticas parasitarias; n: número de muestras identificadas positivas por una técnica, %: porcentaje de muestras positivas identificadas sobre el total de muestras diagnosticadas como infectadas.

La tabla 29 refleja los resultados obtenidos en las flotaciones con cloruro sódico.

La flotación con cloruro sódico en Ovatector® catalogó 10 muestras positivas de las 31 (32,3%) infectadas con *B. coli*, mientras que la flotación en Mini-flotac® obtuvo cuatro resultados positivos (12,9%) para este parásito. Esta diferencia resultó estadísticamente significativa.

En el caso del género *Entamoeba*, la técnica en Ovatector® con cloruro de sodio no se encontró ninguna forma parasitaria, mientras que la realizada en Mini-flotac® encontró dos de las diez positivas (20%).

Para *Strongyloides* spp., existió una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,002$). La flotación con cloruro de sodio en Ovatector® obtuvo 12 positivos (54,6%) mientras que en Mini-Flotac® dos (9,1%). Y en el caso de *P. muricola*, también se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa entre el porcentaje de muestras identificadas positivas con Ovatector® (66,7%) y Mini-flotac® (0%).

Al analizar el índice Kappa para la flotación con cloruro sódico, se observó que la técnica Ovatector® ofrecía una concordancia insignificante con Mini-flotac® para los cinco parásitos analizados.

Tabla 29. Parásitos identificados por flotación con cloruro sódico.

	N	FO-Na		FM-Na		p-valor
		n	%	n	%	
<i>B. coli</i>	31	10	32,3	4	12,9	0,031
<i>Chilomastix</i> spp.	1	0	0	0	0	-
<i>Entamoeba</i> spp.	10	0	0	2	20	0,5
<i>G. duodenalis</i>	0	-	-	-	-	-
<i>Estrongilados</i>	4	2	50	0	0	0,5
<i>Strongyloides</i> spp.	22	12	54,6	2	9,1	0,002
<i>P. muricola</i>	6	4	66,7	0	0	0,125

FO-Na: flotación en Ovatector® con solución de cloruro sódico; FM-Na: flotación en Mini-flotac® con solución de cloruro sódico; N: número de muestras identificadas positivas con cualquiera de las técnicas diagnósticas parasitarias; n: número de muestras identificadas positivas por una técnica. %: porcentaje de muestras positivas identificadas sobre el total de muestras diagnosticadas como infectadas.

La tabla 30 refleja los resultados obtenidos en las flotaciones con sulfato de zinc mediante la flotación en Ovatector® y en Mini-flotac®.

Las dos técnicas de flotación con sulfato de zinc como solución de flotación encontraron el mismo número de muestras positivas para *Chilomastix* spp. (100%) y para el género *Entamoeba* (14,3%). En cambio, en el caso de *B. coli* la diferencia fue estadísticamente significativa, la técnica realizada con Ovatector® dio como positivas 26 muestras (65%) y la realizada con Mini-flotac cuatro (10%).

La flotación en Ovatector® encontró 23,08% de *Strongyloides* spp. y 60% de *P. muricola* mientras que los resultados con Mini-flotac® fueron 15,4% y 40% respectivamente. En el caso de los estrongilados, Ovatector® identificó seis muestras como positivas (16,7%), mientras que el Mini-flotac® ninguna.

Las técnicas de flotación con sulfato de zinc tuvieron una concordancia perfecta ($k=1$) para *Strongyloides* spp. y *P. muricola*, discreta para *Entamoeba* spp. ($k=0,28$) e insignificante para *Entamoeba* spp. y estrongilados.

Tabla 30. Parásitos identificados por flotación con sulfato de zinc.

	N	FO-Zn		FM-Zn		p-valor
		n	%	n	%	
<i>B. coli</i>	40	26	65	4	10	0,00
<i>Chilomastix</i> spp.	1	1	100	1	100	-
<i>Entamoeba</i> spp.	14	2	14,3	2	14,3	-
<i>G. duodenalis</i>	1	0	0	0	0	-
Estrongilados	6	1	16,7	0	0	1
<i>Strongyloides</i> spp.	26	6	23,1	4	15,4	1
<i>P. muricola</i>	10	6	60	4	40	0,5

FO-Zn: flotación en Ovatecor® con solución de sulfato de zinc; FM-Zn: flotación en Mini-flotac® con solución de sulfato de zinc; N: número de muestras identificadas positivas con cualquiera de las técnicas diagnósticas parasitarias; n: número de muestras identificadas positivas por una técnica, %: porcentaje de muestras positivas identificadas sobre el total de muestras diagnosticadas como infectadas.

La relación de los resultados obtenidos para la sedimentación de etil-acetato y la sedimentación con el kit comercial Uranotest copro® realizado el mismo día de la recolección de la muestra, se muestran en la tabla 31.

En el caso del protozoo *B. coli* la sedimentación Uranotest copro® obtuvo 12 muestras positivas (57,1%) y la sedimentación con etil-acetato-formalina 13 (61,9%). Para *Entamoeba* spp. el kit comercial encontró dos muestras positivas (28,6%), mientras que la sedimentación con etil-acetato-formalina ninguna.

En el caso de los estrongilados, de las cuatro muestras infectadas el Uranotest copro® dio como positivas dos (50%) y la sedimentación etil-acetato-formalina tres (75%). Para *Strongyloides* spp. se compararon 15 muestras positivas, Uranotest copro® detectó seis (40%) y la sedimentación etil-acetato-formalina cinco (33,3%). Finalmente *P. muricola* dio positivo en cinco muestras, Uranotest copro® lo detectó en tres (60%) y la sedimentación con etil-acetato-formalina en dos (40%). Ninguna de estas diferencias fue estadísticamente significativa ($p > 0,05$).

Entre las técnicas de sedimentación existe una concordancia discreta para *B. coli* ($k=0,31$) y *Strongyloides* spp. ($k=0,29$), insignificante para *Entamoeba* spp. y moderada para estrongilados ($k=0,5$) y *P. muricola* ($k=0,52$).

Tabla 31. Parásitos identificados por sedimentación.

	N	Urano		Sc		p-valor
		n	%	n	%	
<i>B. coli</i>	21	12	57,1	13	61,9	1
<i>Chilomastix</i> spp.	1	1	100	1	100	-
<i>Entamoeba</i> spp.	7	2	28,6	0	0	0,5
<i>G. duodenalis</i>	1	0	0	0	0	-
Estrongilados	4	2	50	3	75	1
<i>Strongyloides</i> spp.	15	6	40	5	33,3	1
<i>P. muricola</i>	5	3	60	2	40	1

Urano: sedimentación Uranotest copro®; SC: sedimentación con etil-acetato-formalina; N: número de muestras identificadas positivas con cualquiera de las técnicas diagnósticas parasitarias; n: número de muestras identificadas positivas por una técnica, %: porcentaje de muestras positivas identificadas sobre el total de muestras diagnosticadas como infectadas.

4.2.3.2. Evaluación de soluciones de flotación a partir de heces de mono vervet.

En la tabla 32 se refleja si la cantidad de muestras positivas y negativas para cada una de las dos soluciones y si la diferencia es estadísticamente significativa. Como se observa en la tabla, tanto *Strongyloides* spp. como *B. coli* presentaron diferencias estadísticamente significativas, siendo mayor el porcentaje de identificación en la solución de cloruro sódico para *Strongyloides* spp. y en la de sulfato de zinc para *B. coli*.

Tabla 32. Comparación de soluciones de flotación.

	Ambas -	Ambas +	Na +, Zn -	Na -, Zn +	p-valor
Estrongilados	154	0	2	0	0,5
<i>Strongyloides</i> spp.	140	4	10	2	0,04
<i>P. muricola</i>	152	2	2	0	0,5
<i>B. coli</i>	134	6	2	14	0,004
<i>Entamoeba</i> spp.	152	0	2	2	1

-: muestras negativas; +: muestras positivas; Na: solución de cloruro sódico; Zn: solución de sulfato de zinc.

4.2.3.3. Evaluación de los distintos recipientes de flotación a partir de heces de mono vervet

La tabla 33 refleja los resultados obtenidos con el análisis estadístico que comparó las 156 muestras realizadas en Ovatector® y en Mini-flotac®.

La identificación de muestras positivas a *Strongyloides* spp., *P. muricola* y *B. coli* presentaron una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) al comparar los dos recipientes de flotación, siendo superior en Ovatector®.

Tabla 33. Comparación de dos recipientes de flotación.

Helmintos	Recipientes comparados	p-valor
Estrongilados	Ovatector® vs Mini-flotac®	0,5
<i>Strongyloides</i> spp.	Ovatector® vs Mini-flotac®	0,004
<i>P. muricola</i>	Ovatector® vs Mini-flotac®	0,031
Protozoos		
<i>B. coli</i>	Ovatector® vs Mini-flotac®	0,001
Entamoeba spp.	Ovatector® vs Mini-flotac®	1

4.2.3.4. Comparación Uranotest copro® realizado en los días 0, 10 y 20

La tabla 34 ilustra la concordancia entre los resultados obtenidos por Uranotest copro® sin conservación y con 10 y 20 días de conservación.

Los resultados obtenidos para *B. coli* muestran un grado de acuerdo perfecto al comparar por Uranotest copro® sin conservación y con 20 días de conservación. Por Uranotest copro® sin conservación con diez días de conservación, el acuerdo es sustancial ($k=0,79$). Para estrongilados el acuerdo es perfecto para una conservación de diez días y moderado ($k=0,5$) para una conservación de 20 días. El grado de acuerdo se invierte al comparar la concordancia para *P. muricola*, obteniéndolo moderado ($k=0,55$) para una conservación de diez días y perfecto para 20 días. En el caso de *Strongyloides* spp. el grado es casi perfecto ($k=0,86$) para ambas conservaciones mientras que *Entamoeba* spp. no presentó acuerdo.

Tabla 34. Resultados del grado de concordancia obtenido por Uranotest copro® sin conservación y con 10 y 20 días de conservación.

Parásito	Prueba referencia	Prueba diagnóstica	Proporción acuerdo observado	Proporción acuerdo esperado	Índice Kappa
<i>B. coli</i>	Urano 0	Urano 10	0,90	0,55	0,79
		Urano 20	1	0,53	1
<i>Entamoeba</i> spp.	Urano 0	Urano 10	0,71	0,71	0
		Urano 20	0,71	0,71	0
Estrongilados	Urano 0	Urano 10	1	0,50	1
		Urano 20	0,75	0,5	0,5
<i>Strongyloides</i> spp.	Urano 0	Urano 10	0,93	0,51	0,86
		Urano 20	0,93	0,53	0,86
<i>P. muricola</i>	Urano 0	Urano 10	0,80	0,56	0,55
		Urano 20	1	0,52	1

5. Discusión

La falta de información sobre el diagnóstico coproparasitario en *C. pygerythrus* ha sido el impulsor de este trabajo. Con él, se pretende conocer cómo influyen una serie de factores en el diagnóstico parasitario, con el objetivo de optimizar el uso de las técnicas diagnósticas coproparasitarias. La mayoría de los procedimientos utilizados en la actualidad, suelen ser modificaciones de procedimientos descritos hace décadas. Los primeros se demostraron eficaces en un hospedador determinado para una o varias formas parasitarias y, posteriormente, se amplió su utilización a otras especies añadiendo ciertas modificaciones incluidas por los autores. Con el tiempo, muchas de estas técnicas se han convertido en la técnica de referencia y otras se consideran equivalentes entre sí. Aunque en algunas ocasiones se ha corroborado, en otras muchas, nunca se ha comprobado ninguno de los dos hechos, o incluso, se ha demostrado lo contrario (Núñez-Fernández *et al.*, 1991; Díaz, 1995; Navone *et al.*, 2005; Pajuelo *et al.*, 2006; Del Coco *et al.*, 2008; Brandeli *et al.*, 2011; Leveck *et al.*, 2011; Carvalho *et al.*, 2012; Kooriyama *et al.*, 2012; Ballweber *et al.*, 2014; Zanzani *et al.*, 2015).

En este estudio, se decidió evaluar el uso de técnicas coproparasitarias ampliamente descritas en la literatura científica y por ello en primer lugar, se realizó una revisión bibliográfica de un periodo superior a 40 años (1974-2015), que se centró en investigaciones que utilizaran algún tipo de técnica coproparasitaria como método diagnóstico en el grupo de los PNH. Esto permitió obtener una visión completa de la producción científica sobre el tema. Se observó que a partir de 2001 existe un gran incremento del número de artículos publicados acerca de ello. Este aumento no demuestra necesariamente un interés creciente, ya que también puede deberse al aumento del total de artículos publicados digitalmente por el auge de la difusión digital de la ciencia (Almeida y Almeida, 2013). El diagnóstico coproparasitario en PNH es un tema muy específico que publica una media de cuatro artículos por año desde 2002, pero que está disperso en varias revistas centradas en la primatología o en la parasitología principalmente. En el futuro, es posible que las revistas que publiquen esta información cambien debido al auge de las digitales de acceso libre como *Plos One*, que ya contiene dos artículos sobre este tema (Pomajbíková *et al.*, 2010; Sak *et al.*, 2014). Por otro lado, la revisión bibliográfica no permitió conocer los motivos de elección de las técnicas, ni aprender la metodología a seguir para adecuar las técnicas a nuevas

especies. Tampoco permitió valorar si los resultados obtenidos son extrapolables a *C. pygerythrus*, ni decidir los procedimientos más adecuados para el diagnóstico coproparasitario en esta especie. La mayoría de los autores utilizan técnicas de diagnóstico parasitario, pero el objetivo de estos artículos no es valorar la eficacia de éstas ni compararlas entre sí, por lo que no justifican su elección (Pomajbíková *et al.*, 2010).

Como cabía esperar, los resultados obtenidos muestran que el 45,61% de los autores eligen una técnica ya descrita para otra especie, que en ocasiones modifican sin justificar la decisión. Bajo el nombre de una misma técnica se desarrollan múltiples protocolos que varían en el material, en la cantidad de muestra utilizada y/o en algunas de sus etapas. Por ejemplo, cuando un autor escribe que realiza un examen microscópico directo de las heces, en muy pocas ocasiones indica cómo lleva a cabo el procedimiento. De los 12 artículos encontrados donde se utiliza este método, únicamente dos de ellos citan a Henriksen y Polez (1981) y Ash y Oriel (1987) que sí detallaron el proceso. Esto muestra que en la mayoría de artículos no se van a encontrar técnicas validadas ni descritas con detalle que permitan su replicabilidad ni una comparación de los resultados obtenidos (Ballweber *et al.*, 2014).

Los procedimientos más utilizados para el diagnóstico de parasitosis digestivas siguen siendo la observación de una porción de heces al microscopio después de ser procesada de una determinada manera. Pese a que el estudio se centra en estos procedimientos, en el 12,3% de los artículos aparecen técnicas de diagnóstico moleculares que gracias a los avances tecnológicos y científicos están complementando al diagnóstico microscópico (Grazyck *et al.*, 2009; Sak *et al.*, 2014; Butel *et al.*, 2015; Amato *et al.*, 2016). Hay que considerar que la mayoría de estudios consultados (73,7%) se desarrollaron en condiciones de campo, lo que implica un menor acceso a medios laboratoriales y técnicas de diagnóstico avanzado. Por tanto, es muy difícil que las técnicas moleculares sustituyan completamente a las tradicionales, ya que, una PCR o un ELISA convencional es muy complicado de realizar en un laboratorio de campo. En cambio, las investigaciones de campo se pueden beneficiar de ciertos avances como los tests rápidos desarrollados a partir de técnicas moleculares, ofreciendo una alternativa de diagnóstico más específica y fiable que las técnicas de diagnóstico coproparasitario con microscopio (Johnston *et al.*, 2003).

La especie de elección para el estudio pertenece a la familia de PNH más utilizada para este tipo de trabajos apareciendo en el 65,5% de los artículos consultados. Parte del estudio experimental se tuvo que realizar en España por cuestiones logísticas y resultó imposible acceder a heces de *C. pygerythrus*, por lo que se sustituyó por heces de otras especies que, aunque pertenecen a la familia Cercopithecidae, pueden haber alterado los resultados obtenidos.

La destreza del operario se podría clasificar en la destreza manual a la hora de realizar los procedimientos y la diligencia de identificación de las formas parasitarias. No se trata de técnicas complicadas y la destreza manual es relativamente sencilla de adquirir. La segunda parte, se trata de la habilidad en la identificación, que resulta un poco más complicada de conseguir. Cuando un operario se enfrenta a un examen microscópico fecal, lo primero que debe saber es diferenciar las formas parasitarias de los artefactos (esporas, restos de comida, cristales de sal, etc...). En segundo lugar, debe identificar los parásitos, lo que requiere más tiempo de formación. Gracias al avance de la comunicación digital, se pueden realizar fotografías de la forma parasitaria a identificar y enviarlas a un experto para solicitar su ayuda. Para este estudio los dos operarios que realizaron las muestras fueron veterinarios con experiencia previa en la identificación de parásitos de *C. pygerythrus* y de otras especies de PNH. Para evitar desviaciones en cuanto a la identificación parasitaria, se llevó a cabo una prueba para valorar la fiabilidad interobservador obteniendo un 100% de concordancia entre los dos (Martin *et al.*, 1993).

Sigue habiendo estudios contradictorios sobre la influencia del tiempo de conservación de la muestra y el efecto que tiene sobre los resultados. Hay muchos autores que han comprobado que la conservación de la muestra puede influir en los resultados del porcentaje de formas parasitarias recuperadas por distintas técnicas diagnósticas (Foreyt, 1986; Van Wyk y Van Wyk, 2002; Rinaldi *et al.*, 2011; Cringoli *et al.*, 2011). Por el contrario, en otros estudios realizados en caballos no se encontraron diferencias en los resultados al analizar las muestras 12 horas y 50 días después (Foreyt, 1986; Nielsen *et al.*, 2010). Como precaución, y para evitar este hecho, las muestras se analizaron lo más rápido posible disminuyendo al máximo el tiempo de conservación.

En 2011, Levecke y sus colaboradores pusieron de manifiesto que para la comparación de resultados obtenidos es importante verificar que las técnicas sean equiparables y por ello, en la fase experimental de este estudio, se evaluó cómo afectan a los resultados algunos factores como la solución de flotación y el recipiente utilizado.

5.1. Homogenización y filtrado.

La fase de homogenización y filtrado es la primera etapa que se sometió a evaluación por ser considerada un momento crucial del procesado de las muestras que podía influir en los resultados finales.

Se ha demostrado que la excreción de formas parasitarias en las heces no es constante y que se distribuyen de manera desigual en la materia fecal. Para minimizar este efecto se debe homogeneizar la distribución parasitaria. Una buena mezcla de las heces debería asegurar una distribución uniforme de las formas parasitarias, pero la consistencia de las heces no diarreicas no facilita su mezcla, por lo que se aconseja añadir un medio líquido hasta conseguir una mezcla maleable. Lo habitual es añadir suficiente líquido como para crear una solución donde las formas parasitarias se disgreguen de los restos fecales. Por ello, la elección de la solución de homogenización utilizada debe ser la misma si se quiere equiparar dos procedimientos (Ye *et al.*, 1998; De Carli, 2007; Krauth *et al.*, 2012). Es importante conocer también la cantidad de solución que se añade puesto que actúa como factor de dilución de las formas parasitarias y, en caso de querer obtener resultados cuantificables, será importante corregirlo. Este factor apenas ha sido considerado en la literatura consultada (Stoll, 1930; Cringoli *et al.*, 2004). La forma de homogenización más utilizada es la que se realiza con la ayuda de un mortero.

El material fecal está compuesto por restos sin digerir que pueden enmascarar la presencia de parásitos y hacen más dificultoso su diagnóstico. Para eliminar las partículas de gran tamaño la mezcla obtenida de la homogenización se pasa a través de un filtro. Como filtros, se utilizan diferentes materiales. Los más empleados han sido gasas húmedas y/o un colador. En el caso de los coladores se han utilizado los de cocina o los de té. Las gasas

utilizadas suelen ser gasas médicas de hilo colocadas en doble capa. En todos los casos, el filtrado se hace por gravedad y el resultante se recoge en un recipiente limpio.

Se comparó el método que realiza una homogenización de la muestra en mortero y una posterior filtración con gasas húmedas sobre un colador con un kit comercial llamado Fill-flotac®. En el primer caso, se seleccionó esta técnica por ser el método más utilizado, y en segundo lugar por tener características que podían ser útiles a la hora de procesar muestras de PNH. El Fill-flotac® tiene dos variantes, el Fill-flotac® para herbívoros adaptado para muestras de 5 g, y el utilizado en este estudio para muestras de 2 g que se aconseja utilizar para el diagnóstico coproparasitario de perros, gatos y primates.

Dado que para evaluar diferentes procedimientos de homogenización y filtrado es imprescindible realizar posteriormente métodos de recuperación y concentración de las formas parasitarias y, para comparar diferentes métodos de recuperación es prácticamente obligado realizar una homogenización y filtrado, es complicado analizar la eficacia ofrecida por estos factores independientemente y hay que ser cautelosos a la hora de interpretar los resultados.

Los métodos no presentaron diferencias estadísticamente significativas a excepción de la identificación de *G. duodenalis* mediante la sedimentación de etil-acetato con heces de mangabey de coronilla blanca ($p=0,046$), donde la recuperación con mortero y gasas fue el 32% de las formas parasitarias presentes, frente al 33,5% que se obtuvo con Fill-flotac®.

Algunos estudios sobre la sedimentación han llegado a la conclusión de que la velocidad de sedimentación de las formas parasitarias depende de la capacidad que poseen éstas para adherirse a las superficies y que la naturaleza del filtro puede influir en la adherencia (Gaspard *et al.*, 1994; Brandelli *et al.*, 2011; Sengupta *et al.*, 2011). Una hipótesis que explicaría la diferencia encontrada puede ser la combinación de la naturaleza de la solución y el contacto con el plástico. Para este estudio, en las sedimentaciones se utilizó únicamente agua del grifo para homogenizar, mientras que en las flotaciones se empleó agua del grifo con cloruro sódico o con sulfato de zinc que les otorgaba una gravedad específica superior a la del agua. Se deberían realizar más estudios incluyendo *G. duodenalis* para comprobar si el material con el que está fabricado el filtro puede justificar la diferencia

encontrada, y si existe variabilidad entre parásitos, lo que ayudaría a entender por qué no ha habido diferencia en el resto de procedimientos evaluados ni en otros parásitos.

El Fill-flotac® además tiene ciertas características que el mortero y gasas no ofrece y pueden ser beneficioso en determinadas circunstancias. El cono de la muestra está dotado de ranuras longitudinales que favorecen la salida de la materia fecal al acoplarse con el fondo convexo del recipiente, lo que ayuda la homogenización de la muestra, siendo más rápido que el mortero y gasas.

Está compuesto por un contenedor de 7 cm, con una capacidad de hasta 60 mL y una tapa roscada, haciendo de él un recipiente adecuado para conservar las muestras hasta llegar al laboratorio, si se añade alguna solución conservante. Por otra parte, aísla al operario de las posibles salpicaduras durante la homogenización de la muestra.

El Fill-flotac® también está compuesto por un filtro de plástico, con un diámetro de 4,3 cm y con agujeros de 0,25 mm que permite el filtrado sin necesidad de abrir el contenedor. Además, el agujero de vertido en el cual se enrosca la punta de pipeta, minimiza el contacto del operario con las heces y facilita el vertido de la mezcla evitando la contaminación de las superficies de trabajo. Por último, al ser un recipiente de plástico se puede presionar con mayor o menor fuerza, lo que aumenta o disminuye la velocidad de vertido y lo hace más preciso.

Todas sus piezas se desmontan facilitando la limpieza. Pese a que ésta es más ardua que la del mortero y el colador, se pueden reutilizar todas sus piezas varias veces y el único desecho que produce es la solución sobrante mientras que, con el uso del mortero, las gasas deben ser desechadas cada vez.

El Fill-flotac® puede ser por tanto un buen sistema de homogenización y filtrado especialmente en heces que puedan contener agentes zoonóticos como lo son todas las de PNH. Ser un recipiente ligero, de pequeño tamaño y hermético le convierten en un instrumento ideal para la recogida de muestras en el campo o lejos de un laboratorio. Se puede utilizar como recipiente de transporte y una vez procesada la muestra se puede volver a utilizar tras una buena limpieza y desinfección.

5.2. Examen directo

El examen microscópico directo de las heces fue el primer método utilizado para la detección de formas parasitarias con microscopio (Parona y Parona, 1878). Se describen principalmente dos formas de realizarlo, la primera es tomando una pequeña muestra de material fecal para suspenderlo en una solución antes de mirarlo al microscopio (Gillespie, 2006); y la segunda, en la que se toman dos gramos de material fecal homogenizado en una suspensión y a continuación se toma una pequeña gota de la mezcla resultante. En ambos casos se puede añadir un colorante (Ash y Orihel, 1987; Karere y Munene, 2002). Para este estudio se eligió la primera por el tamaño de las defecaciones de los vervets.

La mayoría de los autores coinciden en que se trata de una técnica ruda con una elevada tasa de falsos negativos, pero los positivos son exactamente igual de válidos que los obtenidos por otras técnicas más eficaces. No es un método adecuado para cuantificar la cantidad de parásitos, ni los resultados que se obtienen son representativos de la muestra. Por ello, solo se debe utilizar junto con otras técnicas diagnósticas. Los resultados extraídos de la revisión bibliográfica confirman que ningún autor utilizó el examen directo como único método diagnóstico. Además, en ninguno de los más de 300 exámenes directos realizados para este estudio se identificó algún parásito que no hubiera sido diagnosticado por alguna de las otras técnicas evaluadas.

Por ello, se trata de una técnica obsoleta y se puede prescindir de ella. En cambio, se sigue utilizando ya que aparece en el 21% de los artículos de la revisión bibliográfica como parte del diagnóstico (Barbosa *et al.*, 2015; Zanzani *et al.*, 2015). Como curiosidad, cabe destacar que se trata del método más utilizado en combinación con técnicas moleculares (Nizeyi *et al.*, 1999; Verweij *et al.*, 2003; Ghai *et al.*, 2014). Este hecho se podría justificar por su sencillez. Además, en el presente trabajo, los porcentajes de muestras contaminadas con *Ancylostoma* spp. y con *B. coli* no revelaron diferencias estadísticamente significativas entre ninguna de las técnicas. Hay que tener cuidado con estos datos puesto que en estas condiciones las técnicas ofrecieron muy pocos positivos y ninguna de las técnicas ha obtenido buenos resultados.

La recuperación de quistes de *G. duodenalis* en heces de mangabeys de coronilla blanca mediante examen directo, con o sin lugol, no presentó diferencias estadísticamente significativas respecto a las flotaciones en tubo y en Ovatector® con la solución de flotación de cloruro sódico, ni con la sedimentación por gravedad. En cambio, sí se encontraron diferencias ($p < 0,05$) al compararlo con las tres flotaciones de sulfato de zinc y con la sedimentación de etil-acetato-formalina, siendo éstas últimas más eficaces.

En la fase experimental de campo, los resultados obtenidos por los exámenes directos con y sin lugol fueron negativos para *Chilomastix* spp., *Entamoeba* spp., *G. duodenalis*, estrongilados y *P. muricola*. Mientras que ambos diagnosticaron 4,6% de las heces infectadas con *B. coli* y el examen directo sin lugol, 3,6% de las heces infectadas con *Strongyloides* spp.

Por tanto, los resultados del estudio apoyan que el examen directo posee una eficacia limitada e indican que el añadir un colorante (lugol), no mejora su sensibilidad ni la recuperación de *B. coli*, *Chilomastix* sp., *Entamoeba* spp., *G. duodenalis*, *Ancylostoma* spp., *Ascaris* spp., *Dicrocoelium* spp., *Strongyloides* spp. o *P. muricola*.

Se recomienda que el examen directo solo se utilice como apoyo a otras técnicas ya que únicamente obtiene positivos si la concentración de formas parasitarias es muy alta. Además, acumula muchos detritus fecales que dificultan la identificación de huevos (Fincham y Seier, 1981; Murray *et al.*, 2000; Gillespie, 2006). Sin embargo, tiene ciertas ventajas frente a las demás técnicas que hace que siga siendo utilizado. Se trata de una técnica muy sencilla, rápida y de bajo coste. Además, conserva el movimiento de las formas parasitarias, como larvas de nematodos y trofozoítos de protozoos, lo que facilita su identificación y puede ser de gran utilidad para los operarios poco experimentados (Karere y Munene, 2002; Barbosa *et al.*, 2015; Zanzani *et al.*, 2014, 2015).

El segundo grupo de técnicas de diagnóstico coproparasitario evaluado fue el que engloba a los métodos de concentración física y que ha sido muy utilizado en primates (Lilly *et al.*, 2002; Petrželková *et al.*, 2006; Labes *et al.*, 2010). Estos métodos resultan más efectivos que los exámenes directos, sobre todo cuando la excreción parasitaria es escasa o intermitente, ya que aumenta la sensibilidad de la observación microscópica (Gillespie,

2006). Para este estudio, se analizaron por separado las flotaciones de las sedimentaciones.

5.3. Flotación

Bajo el término “flotación” se esconden una multitud de protocolos que combinan diferentes soluciones, recipientes y procedimientos utilizados. Probablemente sea el grupo de técnicas que más modificaciones ha sufrido y más variedad presenta. Desde que apareció se han desarrollado diferentes métodos con distinto grado de dificultad (Hall, 1919; Stoll, 1930; Gordon y Whitlock, 1939; Seghetti, 1950; Slocombe, 1973; Rossanigo y Gruner, 1991; Presland *et al.*, 2005; Cringoli, 2006; Gillespie, 2006; Barbosa *et al.*, 2015).

Se trata de una técnica muy utilizada en parasitología, tanto en personas como en animales (Foerster *et al.*, 2005, Christie *et al.*, 2011). En los artículos analizados para la revisión bibliográfica se observa que el diagnóstico por flotación aparece en el 43,9% de los artículos, pero que en su mayoría (84%) se combina con otras técnicas (Gómez *et al.*, 1996; Kilbourn *et al.*, 2003; Sestak *et al.*, 2003; Gillespie *et al.*, 2005b; Krief *et al.*, 2005; Bezjian *et al.*, 2008; Pomajbíková *et al.*, 2010). Probablemente las técnicas de flotación sean las más comparadas por la literatura debido a la cantidad de factores que pueden ser modificados.

5.3.1. Soluciones de flotación

La importancia de la densidad de la solución de flotación ya ha sido demostrada en la literatura (Williamson *et al.*, 1998; Wolf *et al.*, 2014). Por ello, tanto la solución de cloruro de sodio como la de sulfato de zinc utilizadas en el estudio, tienen la misma gravedad específica. El objetivo del estudio era, además de conocer la eficacia de las dos soluciones para cada parásito, valorar si existen características (a parte de la densidad) que puedan alterar los resultados del diagnóstico coproparasitario en el mono vervet. También se consideró interesante evaluar algunos de los recipientes de flotación disponibles en el mercado y observar si se alteraba la sensibilidad y/o la recuperación de varios parásitos.

Existen características propias de las soluciones de flotación que las hacen “mejores” frente a otras, pero en ocasiones hay otros factores que también afectan en su elección.

Para realizar este estudio, se dudaba entre la elección de cuatro soluciones: la de Sheather o la de cloruro sódico y la de nitrato sódico o sulfato de zinc. Se pretendía comparar soluciones comunes de flotación que ya hubieran sido utilizadas en primates. Además, se quería realizar protocolos con el mismo tiempo de reposo, por lo que se buscó entre los procedimientos descritos aquellos que tuvieran un mismo tiempo tanto para las dos soluciones elegidas como para los tres recipientes. Se decidió de 1,2 por ser la más utilizada en primates (Gómez *et al.*, 1996; Vitazkova y Wade, 2006; Barbosa *et al.*, 2016).

La solución de Sheather ya ha sido empleada en primates, se puede elaborar a partir de azúcar de mesa por lo que su disponibilidad es alta en casi cualquier parte del mundo y es relativamente barata (Michaud *et al.*, 2003; Teichroev *et al.*, 2009; Lane *et al.*, 2011), pero se descartó para este estudio por presentar algunos inconvenientes. Por ejemplo, se aconseja calentar el agua para su preparación, lo que complica su elaboración en el campo; una vez preparada es una solución muy viscosa; y se ha demostrado que los huevos flotan peor y requieren más tiempo de reposo para obtener los mismos resultados que otras soluciones (Hendrix, 1999; Dryden *et al.*, 2005; Bowman, 2010). También fue descartada por tener una característica indeseable en una situación de campo, su gran capacidad de atraer a ciertos animales, especialmente a los insectos. Por último, aunque se ha utilizado en varias especies de primates, ha dado peores resultados que otras soluciones (Vitazkova y Wade, 2006; Sleeman *et al.*, 2009; Petrášová *et al.*, 2010; Barbosa *et al.*, 2016).

La solución de cloruro sódico fue incluida en este estudio al haber descartado la de Sheather. Se pretendía incluir una solución barata, de fácil preparación, ampliamente disponible, que no fuese peligrosa para los usuarios sin experiencia, ni nociva para el medio ambiente (Dryden *et al.*, 2005). En los laboratorios de campo, el vertido de los reactivos suele ser un factor limitante a la hora de elegir una solución. Por ejemplo, durante la fase experimental hecha en África, se utilizaron pilas para lavar el material que no están conectadas a un alcantarillado de aguas residuales.

La solución de cloruro sódico no se ha utilizado tanto en primates como la de Sheather y quizás por eso no se hayan demostrado tantos inconvenientes, pero a diferencia de la de Sheather, no necesita calentarse para su preparación, no atrae a insectos y requiere de 10-15 minutos de tiempo de reposo (Gillespie, 2006; Foerster *et al.*, 2015).

La solución de nitrato sódico es sencilla de preparar y, aunque se aconseja calentar la solución, no es estrictamente necesario. Un tiempo de reposo de diez minutos es suficiente, pero es más cara que las anteriores y puede resultar difícil de adquirir. Probablemente haya sido la solución de flotación más descrita en primates, ya que es utilizada por Gillespie y Chapman, siendo considerada por el primero como la mejor solución para realizar flotaciones en PNH (Gillespie *et al.*, 2004, 2005a; Gillespie, 2006; Chapman *et al.*, 2006a, 2009; Gillespie y Chapman, 2008; Howells *et al.*, 2011; Hassell *et al.*, 2013). Lamentablemente no se pudo acceder a ella en Sudáfrica a tiempo para realizar el estudio y quedó descartada.

La solución de sulfato de zinc tiene a su favor que es una solución fácil de preparar, necesita un tiempo de reposo de 10 – 15 minutos. Aunque Gillespie (2006) desaconseja su utilización, ha sido empleada en primates y los resultados obtenidos al compararla con otras técnicas han sido relativamente buenos (Murray *et al.*, 2000; Chapman *et al.*, 2006b; Sleeman *et al.*, 2009; Barbosa *et al.*, 2016). Es una solución más cara que las dos primeras y su disponibilidad no es tan amplia, pero en este caso fue más fácil de conseguir que la de nitrato sódico.

Los resultados obtenidos para *Strongyloides* spp. en la infección experimental y en la situación de campo fueron similares para ambas soluciones. Por el contrario, en la prueba de campo, la solución de sulfato de zinc fue la que más muestras positivas obtuvo para *B. coli* ($p=0,004$). En cambio, en la infección experimental no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$).

La infección experimental con *P. muricola* tuvo una mayor tasa de recuperación de huevos con la solución de sulfato de zinc, pero en la de campo no hubo diferencia entre las dos soluciones.

En el caso de *G. duodenalis*, los resultados obtenidos muestran que la solución de sulfato de zinc es más adecuada. Estos resultados apoyan los descritos por Zajac y Conboy en 2012.

Algunas de las explicaciones que pueden justificar las diferencias observadas para *B. coli* son que en la situación de campo la nitidez de la solución de cloruro sódico era inferior

a la del sulfato de zinc, probablemente debido a la distorsión causada por la sal. En España no se observó tanta diferencia de nitidez entre las soluciones. Otra explicación puede estar en las muestras utilizadas, ya que existen varios factores que difieren entre la situación de campo y la infección experimental. En el caso de la infección experimental se utilizaron heces de mangabeys de coronilla blanca alimentados principalmente con granulado (pienso comercial), mientras que la alimentación de los monos vervets en Sudáfrica era de una gran variedad de frutas, verduras y semillas. Puede ser que las características físicas de las heces sean diferentes debido a la alimentación y/o a la especie y que este hecho justifique las diferencias observadas para *B. coli*. Además, se ha demostrado que el contenido en grasa influye en la identificación de ciertas formas parasitarias (Ballweber, 2014). Otro factor a tener en cuenta es que la solución contaminante utilizada en la fase experimental, estaba constituida casi exclusivamente por quistes y en la situación de campo se detectó un gran número de trofozoítos. No obstante, Bowman (2010) dijo que las etapas quísticas de los protozoos intestinales se concentraban especialmente bien en comparación con los trofozoítos. Debido a todas las diferencias citadas, sería mejor considerar los resultados de la contaminación experimental y la infección de campo por separado y no dar mucha validez a las comparaciones entre las dos situaciones.

En la inoculación de huevos de *P. muricola*, la especie de PNH y la alimentación recibida era la misma, pero existen factores que difieren entre la infección experimental y la de campo. Los resultados de los porcentajes de recuperaciones parasitarias obtenidos a distintas concentraciones de este parásito demuestran que la carga parasitaria afecta la sensibilidad y el porcentaje de recuperación de la solución. Al desconocer la concentración de formas parasitarias de las heces de campo, no es posible comparar los resultados.

A parte de las diferencias ya citadas, también difieren los factores detallados a continuación.

Mientras que en la infección experimental el tamaño muestral es de 20 muestras procesadas con sulfato de zinc y 20 con cloruro sódico, en la infección de campo es de 156 muestras para cada solución. Otra diferencia muestral es que, las 20 muestras fecales de laboratorio son positivas y tienen la misma concentración de formas parasitarias distribuidas homogéneamente. En la situación de campo, se desconoce si las heces están infectadas. Ya

se ha mencionado que la proporción de las formas parasitarias de un mismo parásito pueden diferir entre la situación de laboratorio y la de campo, lo mismo puede suceder entre las distintas muestras utilizadas de los monos vervets. Tanto la carga parasitaria como el tipo de formas parasitarias excretadas es muy poco probable que sean iguales en todas las heces analizadas. Además, la conservación de las formas parasitarias para la infección experimental puede alterar también el resultado. En el caso de los huevos larvados, podría ser que el movimiento de la larva o su estado de desarrollo influyan en la facilidad de recuperación.

5.3.2. Recipientes de flotación

En el caso de la evaluación de los recipientes para la flotación, se compararon tres disponibles en el mercado. En primer lugar, se eligió un tubo de ensayo por considerar que su disponibilidad es relativamente sencilla en todo el mundo. En segundo lugar, se eligieron dos kits comerciales Ovatector® y Mini-flotac® por presentar características físicas diferentes entre sí.

El recipiente de Ovatector® es más bajo y más ancho que el tubo, pero mantiene la misma capacidad y forma que el tubo de ensayo, siendo ambos cilíndricos.

El Mini-flotac® no guarda ninguna similitud con los otros métodos. Es una modificación de Flotac® que no necesita centrífuga. Dispone de dos cámaras de flotación con capacidad para un mililitro de muestra cada una. Se trata de un método cuantitativo que se asemeja a la cámara de Mc Master. Se decidió probar Mini-flotac® en vez de Mc Master, porque la primera puede independizar la zona de visualización de la cámara de flotación evitando que los huevos vuelvan a hundirse y dejen de ser detectables.

Una de las limitaciones de este estudio fue no poder realizar las tres técnicas de flotación de la fase experimental en la fase de campo, debido al pequeño volumen de las defecaciones de los monos vervets. Por este motivo, se decidió comparar únicamente Ovatector® y Mini-flotac® eliminando la flotación en tubo de ensayo. Se tomó esta decisión porque el tubo tiene una menor superficie de contacto que el Ovatector®.

Para intentar valorar únicamente el efecto del recipiente sobre la recuperación de formas parasitarias, la homogenización y la filtración siempre se realizaron mediante el mismo método, el Fill-flotac®. Además, las técnicas se realizaron a partir de una misma muestra de heces y con la misma solución de flotación (Foerster *et al.*, 2015). La recuperación de formas parasitarias de *P. muricola* y *G. duodenalis* en la contaminación experimental fue superior en Mini-flotac®. Las diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$) al comparar este método con la flotación en tubo y en Ovatector®.

Los resultados obtenidos de los tres recipientes de flotación para *Strongyloides* spp. en la fase experimental no presentaron diferencias estadísticamente significativas mientras que en situación de campo la flotación en Ovatector® tuvo una mejor sensibilidad que Mini-flotac® ($p = 0,004$). Este mismo hecho sucedió para *P. muricola* y *B. coli* ($p = 0,001$).

Aparte de las diferencias ya expuestas anteriormente entre la situación de campo y la laboratorial, hay otra razón más plausible que explica la diferencia encontrada para *Strongyloides* spp. y *B. coli*. Las variables temperatura exterior y humedad relativa no fueron similares. Aunque se tardaba el mismo tiempo para analizar las muestras, en Sudáfrica, la solución de cloruro sódico presentó más inconvenientes, pues la cantidad de cristales y su tamaño fueron considerablemente superiores a los que se formaron en España.

Al comparar Ovatector® y Mini-flotac® se constató que los cristales eran de mayor tamaño y más numerosos en el primero. Durante el tiempo de reposo de la flotación con cloruro sódico en Ovatector®, se crearon muchos cristales en el borde del recipiente, que quedaban adheridos al cubreobjetos. Esto provocaba que al retirar el cubreobjetos muchos de esos cristales fueran transportados con la muestra a analizar al microscopio y dificultaran la identificación de formas parasitarias. En algunas ocasiones las adherencias creadas por la sal entre el cubreobjetos y el borde del Ovatector® dificultaron la separación del cubreobjetos, llegando en una ocasión a romperse el cubreobjetos antes de separarlo.

La cristalización de la solución de cloruro sódico también se observó en la flotación con Mini-flotac®. Si al rellenar las cámaras se derrama parte de la solución sobre la superficie de éstas se forman cristales de gran tamaño como en Ovatector®, pero al estar en el exterior del recipiente, con cuidado se pudo limpiar con un paño empapado en agua. Este hecho es

poco frecuente cuando se tiene un algo de experiencia con Mini-flotac® y se procede con cuidado. Si la solución no se derrama por fuera, el tamaño de los cristales es considerablemente menor al de Ovatector®, pero la nitidez de la solución también parece alterada, haciendo más complicada la identificación de las formas parasitarias.

5.4. Sedimentación

En el diagnóstico coproparasitario de rutina, los métodos de sedimentación son los más implementados (Del Coco *et al.*, 2008) y en el caso de los primates parece confirmarse (Petrželková *et al.*, 2006; Levecke *et al.*, 2007; Labes *et al.*, 2010; Kooriyama *et al.*, 2012; Barbosa *et al.*, 2016). En el 70,2% se utiliza la sedimentación como método de recuperación de formas parasitarias, ya sea como único método diagnóstico (57,5%) o con otras técnicas (42,5%).

Al igual que sucede con el examen directo y con la flotación, cuando aparece el concepto de sedimentación en la literatura, no siempre se trata de la misma técnica con el mismo procedimiento. Aunque no son tan abundantes las variantes como en el caso de la flotación, también se encuentran muchos procedimientos con un mismo nombre.

Entre los artículos sobre primates revisados, una de las sedimentaciones que más aparece es la sedimentación con éter. Bajo este nombre aparecen muchas modificaciones de la técnica (McConnell *et al.*, 1974; Müller-Graf *et al.*, 1997; Munene *et al.*, 1998; Gracenea *et al.*, 2002; Hahn *et al.*, 2003; Legesse y Erko, 2004; Weyher *et al.*, 2006; Kooriyama *et al.*, 2012; Macinstosh *et al.*, 2012; Ravasi *et al.*, 2012). Aunque algunos científicos siguen utilizando el éter, ha habido varias recomendaciones para cambiarlo por un reactivo más seguro, el etil-acetato (Stuart *et al.*, 1990; Muehlenbein, 2005; Mul *et al.*, 2007; Snaith *et al.*, 2008; Clough *et al.*, 2010; MacInstosh *et al.*, 2010, 2011). Por ello, en esta investigación se decidió realizar un procedimiento con éter o etil-acetato. Se eligió el etil-acetato por ser más seguro. Como procedimiento se utilizó el propuesto por Ash y Oriel en 1991 por haber sido utilizado tal cual en primates (Muehlenbein, 2005; Rothman *et al.*, 2009; Clough *et al.*, 2010).

El método a comparar debía ser un método con el que no fuera necesaria la utilización de la centrífuga, ya que en las investigaciones de campo puede resultar complicado tener electricidad. Existen las centrífugas manuales, pero calcular las revoluciones por minuto durante el tiempo de centrifugado iba a resultar demasiado laborioso al igual que hacerla girar a una velocidad constante.

En el caso de la infección experimental se seleccionó la sedimentación por gravedad ya que, aunque en menor cantidad que las sedimentaciones de éter y etil-acetato, también ha sido utilizada en primates (Phillips *et al.*, 2004; Friant *et al.*, 2016). El protocolo elegido para realizar esta técnica fue el descrito por Gillespie en 2006 por haber sido tratado como la sedimentación más idónea para utilizar en PNH. Se trata de una técnica de bajo coste, ya que no requiere ningún tipo de reactivo ni centrífuga.

Para la infección de campo se utilizó un kit comercial Uranotest copro[®]. No había sido utilizado en PNH, pero su diseño está basado en un kit de sedimentación de humana. Además, no necesita centrífuga, el protocolo es sencillo y permite el almacenamiento de las muestras durante unos días hasta ser procesado, aunque al no ser reutilizable, el coste es elevado y su disponibilidad no siempre es posible. La utilización de este kit permitió a su vez comprobar su capacidad de conservación. Para evaluarla, de cada kit comercial se realizaron tres exámenes microscópicos. El primero se realizó el día de la defecación y los resultados obtenidos fueron los que se compararon con la sedimentación con centrífuga.

En todos los casos de la infección experimental, la recuperación de la sedimentación por gravedad fue inferior a la sedimentación con etil-acetato, aunque no se pudo confirmar en ningún caso que las diferencias fueran estadísticamente significativas. En la infección de campo, la sedimentación con centrífuga de etil-acetato-formalina detectó en mayor número de ocasiones formas parasitarias de *B. coli* y de estrongilados. Por su parte, fue el kit comercial Uranotest copro[®] el que detectó más muestras positivas para *Entamoeba* spp., *Strongyloides* spp. y *P. muricola*. Pero, al igual que sucede en la infección experimental ninguna presentó diferencia estadísticamente significativa. El grado de concordancia fue calculado mediante el índice Kappa para *B. coli* y *Strongyloides* spp., dando un acuerdo

discreto y moderado para estrogilados ($k=0,5$) y *P. muricola* ($k=0,52$). El escaso número de muestras positivas hace complicada la comparación de los resultados, se debería realizar un estudio con más muestras infectadas con objeto de disminuir los efectos del azar.

Al comparar la efectividad de los kits de sedimentación realizados en diferentes días, se observaron grados de acuerdo casi perfectos para varios de los parásitos, pero al igual que pasa con los resultados anteriores, se debería realizar un posterior estudio para comprobar con mayor seguridad la efectividad de Uranotest copro® en el diagnóstico copoparasitario del mono vervet.

5.5. Diagnóstico copoparasitario en mono vervet

Se ha demostrado que la sensibilidad de una técnica depende del parásito, por lo que, de manera ideal, se deberían conocer los parásitos de interés para el diagnóstico. No es lo mismo elaborar un protocolo para buscar todos los parásitos presentes en una colección de primates, que para conocer si en esa colección de primates hay un parásito en particular. Para este estudio, se quería diagnosticar el máximo de las especies de parásitos presentes en la colección de *C. pygerythrus* y evaluar algunas de las posibles técnicas disponibles para adecuar el plan sanitario. Todos los parásitos encontrados pertenecen a familias ya identificadas en primates. En cuanto a los helmintos, se encontraron familias muy diagnosticadas en PNH, como Strongylidae que apareció en el 47,4% de los artículos analizados y Strongyloididae (50,9%). Una familia también identificada fue Spiruridae, pero al contrario que las dos anteriores, se trata de una familia pocas veces diagnosticada en PNH, apareciendo en el 5,26% de los artículos. Pese a que la familia Trichuridae aparece en más de la mitad de los artículos del análisis bibliométrico (52,6%), no se identificó durante este estudio, pero sí se ha diagnosticado anteriormente en el santuario.

De las familias pertenecientes al grupo de los protozoos, se encontraron algunas de las que más aparecen en el análisis de la literatura científica: Entamoebidae (47,4%), Balantiididae (26,3%), Giardiidae (21%) y Retortamonadidae (14%).

No hubo una técnica ideal para la identificación de todos estos parásitos. La técnica que presentó un mayor porcentaje de muestras positivas identificadas para *B. coli* fue la flotación en Ovatector® con sulfato de zinc (65%), seguida por la sedimentación de etil-acetato-formalina (61,9%) y Uranotest copro® (57,1%). La flotación en Ovatector® empleando la solución de cloruro sódico fue la que obtuvo un mayor porcentaje de muestras positivas para *Strongyloides* spp. (54,6%) y *P. muricola* (66,7%). Por otro lado, la sedimentación de etil-acetato-formalina fue la que más muestras positivas infectadas por estrongilados identificó (75%), y la sedimentación Uranotest copro® la que dio un mayor porcentaje para *Entamoeba* spp. (28,6%). Al comparar la recuperación de formas parasitarias en la infección experimental parece haber parásitos que se identifican con mayor facilidad que otros aún a concentraciones mayores. Por ejemplo, *P. muricola* necesitó concentraciones muy superiores para ser recuperado.

En los últimos años, se han publicado varios estudios acerca del diagnóstico coproparasitario comparando técnicas de flotación, de sedimentación y combinadas en caballos (Tomczuk *et al.*, 2014), en reptiles (Wolf *et al.*, 2014) y en primates (Marinella *et al.*, 2014; Queiroga *et al.*, 2014; Zanzani *et al.*, 2015). Si se quiere realizar un diagnóstico coproparasitario para una determinada especie de PNH, se deben tener en cuenta varios factores a la hora de elegir una técnica descrita en la literatura. Los resultados no son comparables si se van a realizar modificaciones, por lo que es muy importante asegurarse de que el procedimiento está muy detallado (Ballweber *et al.*, 2014). A continuación, se explican algunas de las diferencias más habitualmente encontradas entre protocolos con el mismo nombre:

La solución de flotación. A la hora de elegir la solución es importante conocer su disponibilidad comercial, su coste, su simplicidad de elaboración, su toxicidad, su posible impacto ambiental, las densidades que puede alcanzar y las ventajas e inconvenientes de sus características físicas. Por ejemplo, para este estudio, además de las razones por las que se eligieron las dos soluciones de flotación, aparecieron otros motivos a tener en cuenta para su utilización. La solución de cloruro sódico cristaliza mucho más rápido que la de sulfato de zinc, por lo que puede no dar los resultados esperados a temperaturas altas al formar cristales de gran tamaño y distorsionar mucho los huevos. Además, resulta corrosiva

para el material de laboratorio como el microscopio (o la centrifuga si se utiliza). Debido a que alcanza una densidad máxima de 1,2, algunos huevos pesados pueden no flotar (Bello, 1961; Parfitt, 1969; Cringoli *et al.*, 2004; Cebra y Stang, 2008; Vadlejch *et al.*, 2011). Todas las soluciones se realizaron a partir de agua del grifo y no se tuvo en cuenta si la composición de ésta pudo ser diferente como para afectar en los resultados.

El recipiente utilizado. Las características físicas del recipiente pueden alterar los resultados obtenidos. Este factor tiene especial importancia en las técnicas de flotación. Tomando el tubo de ensayo como referencia, el recipiente de Ovatector® es un cilindro de mayor diámetro y de menor altura. El borde es ancho y liso lo que ayuda a la formación del menisco y favorece el contacto del cubreobjetos con la solución y a que se acumulen las formas parasitarias (Stoll, 1930; Egwang y Slocombe, 1981).

También es importante el llenado del recipiente y su procesado hasta la observación. Se debe formar bien el menisco en los recipientes cilíndricos y no dejar burbujas de aire entre el cubreobjetos y la solución. Este hecho disminuiría la superficie de contacto y podría alterar el resultado obtenido. La técnica puede perder eficacia en el traslado del cubreobjetos sobre el portaobjetos. Se debe realizar con un movimiento suave para asegurar que las formas parasitarias no se “despeguen” y caigan. Como ya se ha nombrado anteriormente, hay que tener especial cuidado al elegir el tamaño del cilindro, especialmente el diámetro de contacto. Cilindros de diámetro pequeño crean una mayor adherencia del cubreobjetos con los cristales de cloruro sódico. En el caso del Ovatector®, el efecto no fue tan marcado. En el caso de Mini-flotac®, hay que asegurarse de que no queden burbujas de aire en las cámaras en el momento de girarlas.

En cuanto a la limpieza, el tubo de ensayo es el más complicado si no se dispone del material adecuado mientras que, la limpieza de Ovatector® o de Mini-flotac® es muy simple gracias a que se desmonta en varias piezas. Hay que tener cuidado de no utilizar material abrasivo que pueda rayar el plástico del Mini-flotac®. Las características de los recipientes hacen que el tiempo de reposo requerido no sea el mismo. En las cámaras como Mc Master o Mini-flotac®, las formas se pegarán más rápidamente que en recipientes más altos (MAFF, 1977; Thienpont *et al.*, 1986). En los cilindros, también se ha observado diferencia entre la

cantidad de huevos encontrados y el tiempo de reposo transcurrido (Koutz, 1941; Dunn y Keymer, 1986; Dryden *et al.*, 2005). Tiempos cortos harán que las formas parasitarias no tengan tiempo a ascender y pegarse, mientras que tiempos demasiado largos pueden provocar la deshidratación de los huevos y que éstos caigan al fondo. Se deberían llevar a cabo más estudios para conocer el tiempo óptimo de reposo e intentar disminuirlo con la solución de cloruro sódico, con el fin de obtener menor formación de cristales. El tiempo también será diferente si se utiliza una centrífuga o la flotación es gravitacional (Koutz, 1941).

Fase de centrifugación. En el caso del presente estudio, solo se utilizó en la sedimentación de etil-acetato-formalina. Es importante que la centrifugación sea estable y la aceleración y la deceleración sean suaves, de lo contrario pueden empeorar los resultados finales. Es importante asegurarse que la centrífuga esté nivelada a la hora de utilizarla. No hay consenso sobre el tiempo de centrifugado necesario, en parte porque se ve influenciado por el medio utilizado y por la fuerza centrífuga ejercida sobre la muestra. La fuerza no es un valor que se indique en los protocolos, se suele sustituir por la velocidad indicada en revoluciones por minuto; el problema radica en que los rotores de las centrífugas no son iguales y, por tanto, a la misma velocidad, la fuerza centrífuga es diferente entre centrífugas con distinto diámetro de rotor. Para realizar este estudio, se aplicaron las revoluciones por minuto indicadas en el protocolo seguido, aunque se desconoce la fuerza centrífuga real. Se utilizó la misma centrífuga durante toda la fase experimental, tanto en España como en Sudáfrica. Se decidió elegir una centrífuga eléctrica por la imposibilidad de asegurar una velocidad constante en todas las ocasiones que se utilizó. Sería adecuado realizar estudios comparando la sedimentación gravitacional y sedimentaciones con centrífugas manuales, para ver si existe diferencia de resultados.

El microscopio utilizado. Si el estudio se quiere realizar en situaciones de campo, sin acceso a electricidad, se puede utilizar algún microscopio de campo como el Newton Nm1®. En estos microscopios se disminuye al máximo el tamaño de sus componentes. Por un lado, es una ventaja puesto que disminuye considerablemente el peso y el volumen del equipo, pero imposibilita la utilización de las cámaras de flotación.

Para el diagnóstico de coproparásitos en *C. pygerythrus* se aconseja combinar técnicas de flotación y sedimentación como otros autores ya han indicado (Katagiri y Oliveira-Sequeira, 2010; Pomajbíková *et al.*, 2010). Entre todos los factores expuestos se deberán elegir los métodos que mejor se adapten a la situación personal del investigador. Se debe tener en consideración, el propósito del análisis, así como los medios económicos y tecnológicos disponibles.

6. Conclusiones

Las conclusiones del presente trabajo son:

1. El análisis bibliográfico ha demostrado que los estudios se realizan principalmente con primates no humanos en libertad, de la familia Cercopithecidae, y que el diagnóstico se basa en la combinación de técnicas coprológicas al microscopio, si bien las técnicas moleculares empiezan a cobrar importancia.
2. Los resultados obtenidos al procesar las muestras con Fill-flotac® no presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al procesado con mortero y gasas. Esto, unido a la simplicidad de realización determina la recomendación de Fill-flotac® para llevar a cabo estudios de campo.
3. De los métodos evaluados no existe uno que sea más eficaz que el resto, por lo que se recomienda la combinación de técnicas de flotación y sedimentación para el diagnóstico coproparasitario en mono vervet.
4. La solución de flotación debe ser sulfato de zinc y el recipiente adecuado para utilizar en laboratorio es Mini-flotac®, mientras que para estudios de campo es mejor Ovatector®.
5. Debido a los resultados obtenidos y a su capacidad de conservación, la sedimentación con Uranotest copro® es apta para realizar estudios de campo.
6. Los métodos utilizados en la situación de campo han permitido identificar *Strongyloides* spp., *Protospirura muricola*, *Balantidium coli*, *Chilomastix* sp., *Entamoeba* spp. y *Giardia duodenalis* en el mono vervet alojado en este santuario.

7. Bibliografía

- Abbott, D. P., & Majeed, S. K. (1984). A survey of parasitic lesions in wild-caught, laboratory-maintained primates: (rhesus, cynomolgus, and baboon). *Veterinary Pathology*, 21(2), 198–207.
- Abee, C. R., Mansfield, K., Tardif, S. D., & Morris, T. (2012). Nonhuman Primates in Biomedical Research. *Elsevier Ed (USA)*, 11-51; 111-179, 590.
- Aldeen, W. E., Hale, D., Robison, A. J., Carroll, K. (1995). Evaluation of a commercially available ELISA assay for detection of *Giardia lamblia* in fecal specimens. *Parasitology*, 21(2), 77-79.
- Almeida, E. C. E., & Almeida, J. (2013). Brazil's growing production of scientific articles—how are we doing with review articles and other qualitative indicators? *Scientometrics*, 97(2), 287–315.
- Amarenco, G. (2014). Bristol Stool Chart: Prospective and monocentric study of 'stools introspection' in healthy subjects. *Progrès En Urologie*, 24(11), 708–713.
- Amato, K. R., Martínez-Mota, R., Righini, N., Raguette-Schofield, M., Corcione, F. P., Marini, E., ... Leigh, S. R. (2016). Phylogenetic and ecological factors impact the gut microbiota of two Neotropical primate species. *Oecologia*, 180(3), 717–733.
- Amory, J. T., Plessis, W. M. du, Beierschmitt, A., Beeler-Marfisi, J., Palmour, R. M., & Beths, T. (2013). Abdominal ultrasonography of the normal St. Kitts vervet monkey (*Chlorocebus sabaues*). *Journal of Medical Primatology*, 42(1), 28–38.
- Andelman, S. J. (1985). Ecology and reproductive strategies of vervet monkeys (*Cercopithecus aethiops*) in Amboseli National Park, Kenya. *University of Washington Ed (USA)*.
- Anderson, N., Luong, T. T., Vo, N. G., Bui, K. L., Smooker, P. M., & Spithill, T. W. (1999). The sensitivity and specificity of two methods for detecting *Fasciola* infections in cattle. *Veterinary Parasitology*, 83(1), 15–24.
- Ashford, R. W., & Reid, G. (2000). Intestinal parasites of the chimpanzee *Pan troglodytes* in Kibale Forest, Uganda. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 94(2), 173-179.
- Ash, L. R., & Orihel, T. C. (1987). Parasites a guide to laboratory procedures and identification. *American Society of Clinical Pathologists Ed*.
- Ash, L. R., & Orihel, T. C. (2010). Atlas de Parasitología Humana/ Atlas of Human Parasitology. *Médica Panamericana Ed (USA)*.
- Bailenger, J. J., & Faraggi, G. (1973). Coprologie parasitaire et fonctionnelle. *Drouillard Ed (France)*.
- Baldellou, M., & Henzi, S. P. (1992). Vigilance, predator detection and the presence of supernumerary males in vervet monkey troops. *Animal Behaviour*, 43(3), 451–461.

- Ballweber, L. R., Beugnet, F., Marchiondo, A. A., & Payne, P. A. (2014). American Association of Veterinary Parasitologists' review of veterinary fecal flotation methods and factors influencing their accuracy and use—Is there really one best technique? *Veterinary Parasitology*, *204*(1), 73–80.
- Barbosa, A. D. S., Bastos, O. M. P., Uchôa, C. M. A., Pissinatti, A., Bastos, A. C. M. P., Souza, I. V. de, et al. (2016). Comparison of five parasitological techniques for laboratory diagnosis of *Balantidium coli* cysts. *Revista Brasileira De Parasitologia Veterinária*, *25*(3), 286–292.
- Barda, B. D., Rinaldi, L., Ianniello, D., Zepherine, H., Salvo, F., Sadutshang, T., ... Albonico, M. (2013). Mini-FLOTAC, an innovative direct diagnostic technique for intestinal parasitic infections: experience from the field. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *7*(8), e2344.
- Barrett, L., Brown, L. R., Henzi, S. P., & za, djagegjj unisa ac. (2005). Foraging ecology of the vervet monkey (*Chlorocebus aethiops*) in mixed lowveld bushveld and sour lowveld bushveld of the blydeberg conservancy, Northern Province, South Africa. *University of South Africa (South Africa)*.
- Beaver, P. C., Jung, R. C., Cupp, E. W., & Craig, C. F. (1984). *Clinical parasitology*. Lea & Febiger Ed (USA).
- Becker, S. L., Lohourignon, L. K., Speich, B., Rinaldi, L., Knopp, S., N'goran, E. K., ... Utzinger, J. (2011). Comparison of the Flotac-400 dual technique and the formalin-ether concentration technique for diagnosis of human intestinal protozoon infection. *Journal of Clinical Microbiology*, *49*(6), 2183–2190.
- Behnke, J. M., Barnard, C. J., Mason, N., Harris, P. D., Sherif, N. E., Zalat, S., & Gilbert, F. S. (2000). Intestinal helminths of spiny mice (*Acomys cahirinus dimidiatus*) from St Katherine's Protectorate in the Sinai, Egypt. *Journal of Helminthology*, *74*(1), 31–43.
- Bello, T. R. (1961). Comparison of the flotation of *Metastrongylus* and *Ascaris* eggs in 3 different levitation solutions. *American Journal of Veterinary Research*. *22*(88), 597-600.
- Bello, T. R., Allen, T. M. (2009). Comparison of two fecal egg recovery techniques and larval culture for cyathostomins in horses. *American Journal of Veterinary Research*, *70*(5), 571-573.
- Bezjian, M., Gillespie, T. R., Chapman, C. A., & Greiner, E. C. (2008). Coprologic evidence of gastrointestinal helminths of forest baboons, *Papio anubis*, in Kibale National Park, Uganda. *Journal of Wildlife Diseases*, *44*(4), 878–887.
- Bogitsh, B. J., Carter, C. E., & Oeltmann, T. N. (2013). *Human parasitology*. Academic Press Ed (USA), 53-73, 199-211, 292-320.
- Boray, J. C. (1969). Experimental fascioliasis in Australia. *Advances in Parasitology*, *7*, 95–210.

- Boulton, A. M., Horrocks, J. A., & Baulu, J. (1996). The barbados vervet monkey (*Cercopithecus aethiops sabaens*): Changes in population size and crop damage, 1980–1994. *International Journal of Primatology*, 17(5), 831–844.
- Bowman, D. (2010). Parasitología para Veterinarios. *Elsevier Ed (USA)*. 301-373.
- Boyd, R., & Silk, J. B. (2001). Cómo evolucionaron los humanos. *Ariel Ciencia Ed (España)*.
- Brandelli, C. L. C., Carginin, S. T., Willers, D. M. C., Oliveira, K. R. P., & Tasca, T. (2011). Comparison between spontaneous sedimentation method and Paratest® for the diagnosis of intestinal parasitic infections. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 105(10), 604–606.
- Brandsma, R., Vos, H. W. J. D., Bakker, S., de Heer, D. L. B., Often, R. H. J., & Pinatsis, A. (1990). A comparison of the coverage of clinical medicine provided by BIOSIS Previews and Medline. *Online Review*, 14(6), 367–377.
- Broadhurst, M.J., Ardeshir, A., Kanwar, B., Mirpuri, J., Gundra, U. M., Leung, J.M., ... Loke, P. (2012). Therapeutic helminth infection of macaques with idiopathic chronic diarrhea alters the inflammatory signature and mucosal microbiota of the colon. *PLoS Parhog*, 8(11), e1003000.
- Bruorton, M. R., Davis, C. L., & Perrin, M. R. (1991). Gut microflora of vervet and samango monkeys in relation to diet. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(2), 573–578.
- Butel, C., Mundeke, S. A., Drakulovski, P., Krasteva, D., Ngole, E. M., Mallié, M., ... Locatelli, S. (2015). Assessment of Infections with *Microsporidia* and *Cryptosporidium* spp. in Fecal Samples from Wild Primate Populations from Cameroon and Democratic Republic of Congo. *International Journal of Primatology*, 36(2), 227–243.
- Carvalho, G. L. X. de, Moreira, L. E., Pena, J. L., Marinho, C. C., Bahia, M. T., & Machado-Coelho, G. L. L. (2012). A comparative study of the TF-Test®, Kato-Katz, Hoffman-Pons-Janer, Willis and Baermann-Moraes coprologic methods for the detection of human parasitosis. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(1), 80–84.
- Cebra, C. K., & Stang, B. V. (2008). Comparison of methods to detect gastrointestinal parasites in llamas and alpacas. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 232(5), 733–741.
- Chakrabarti, B. K., Kong, W., Wu, B., Yang, Z.-Y., Friborg, J., Ling, X., ... Nabel, G. J. (2002). Modifications of the Human Immunodeficiency Virus Envelope Glycoprotein Enhance Immunogenicity for Genetic Immunization. *Journal of Virology*, 76(11), 5357– 5368.
- Chapman, C. A., Rothman, J. M., & Hodder, S. (2009). Can parasite infections be a selective force influencing primate group size? A test with red colobus. *Primate Parasite Ecology, Cambridge University Press Ed*. 423-440.

- Chapman, C. A., Speirs, M. L., Gillespie, T. R., Holland, T., & Austad, K. M. (2006a). Life on the edge: gastrointestinal parasites from the forest edge and interior primate groups. *American Journal of Primatology*, *68*(4), 397–409.
- Chapman, C. A., Wasserman, M. D., Gillespie, T. R., Speirs, M. L., Lawes, M. J., Saj, T. L., & Ziegler, T. E. (2006b). Do food availability, parasitism, and stress have synergistic effects on red colobus populations living in forest fragments? *American Journal of Physical Anthropology*, *131*(4), 525–534.
- Charlier, J., De Meulemeester, L., Claerebout, E., Williams, D., & Vercruyse, J. (2008). Qualitative and quantitative evaluation of coprological and serological techniques for the diagnosis of fasciolosis in cattle. *Veterinary Parasitology*, *153*(1), 44–51.
- Cheney, D. L. (1983a). Proximate and ultimate factors related to the distribution of male migration. *Hinde Ed (USA)*, 241-249.
- Cheney, D. L., & Seyfarth, R. M. (1983b). Nonrandom dispersal in free-ranging vervet monkeys: social and genetic consequences. *The American Naturalist*. *122*(3), 392-412.
- Cheney, D. L., & Seyfarth, R. M. (1987). The influence of intergroup competition on the survival and reproduction of female vervet monkeys. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *21*(6), 375–386.
- Cheney, D. L., & Seyfarth, R. M. (1990). How monkeys see the world: Inside the mind of another specie. *University of Chicago Press Ed (USA)*. 19-79.
- Christeller, E. (1922). Über die Balantidienruhr bei den Schimpansen des Berliner zoologischen Gartens. *Virchows Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin*. *238*(3), 396-422.
- Christie, J., Schwan, E. V., Bodenstern, L. L., Sommerville, J. E. M., & 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.
- Clough, D., Heistermann, M., & Kappeler, P. M. (2010). Host intrinsic determinants and potential consequences of parasite infection in free-ranging red-fronted lemurs (*Eulemur fulvus rufus*). *American Journal of Physical Anthropology*, *142*(3), 441–452.
- Cockburn, T. A. (1948). *Balantidium* infection associated with diarrhoea in primates. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *42*(3), 291–293.
- Cox, D. D., Todd, A. C. (1962). Survey of gastrointestinal parasitism in Wisconsin dairy cattle. *Journal of de Veterinary Medical Association*, *141*, 706–709.
- Cringoli, G. (2006). FLOTAC, a novel apparatus for a multivalent faecal egg count technique. *Parassitologia*, *48*(3), 381–384.

- Cringoli, G., Rinaldi, L., Maurelli, M. P., Morgoglione, M. E., Musella, V., & Utzinger, J. (2011). *Ancylostoma caninum*: calibration and comparison of diagnostic accuracy of flotation in tube, McMaster and FLOTAC in faecal samples of dogs. *Experimental Parasitology*, 128(1), 32–37.
- Cringoli, G., Rinaldi, L., Veneziano, V., Capelli, G., & Scala, A. (2004). The influence of flotation solution, sample dilution and the choice of McMaster slide area (volume) on the reliability of the McMaster technique in estimating the faecal egg counts of gastrointestinal strongyles and *Dicrocoelium dendriticum* in sheep. *Veterinary Parasitology*, 123(1), 121–131.
- Da Silva Barbosa, A., Pissinatti, A., Dib, L. V., de Siqueira, M. P., Cardozo, M. L., Fonseca, A. B. M., ... Amendoeira, M. R. R. (2015). *Balantidium coli* and other gastrointestinal parasites in captives non-human primates of the Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Medical Primatology*, 44(1), 18–26.
- David, E. D., & Lindquist, W. D. (1982). Determination of the Specific Gravity of Certain Helminth Eggs Using Sucrose Density Gradient Centrifugation. *The Journal of Parasitology*, 68(5), 916.
- De Carli, G. A. (2001). Colheita e preservação da amostra fecal. *Atheneu Ed (Brasil)*. 29.
- Del Coco, V. F., & Córdoba, M. A. (2008). Comparación de tres técnicas de concentración de heces para recuperar ooquistes de *Cryptosporidium*. *Acta Bioquím Clínica Latinoamericana*. 42(3), 333-338.
- DePaoli, A., & Johnsen, D. O. (1978). Fatal Strongyloidiasis in Gibbons (*Hylobates lar*). *Veterinary Pathology*, 15(1), 31–39.
- Diamond, L. S., & Clark, C. G. (1993). A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (Emended Walker, 1911) separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 40(3), 340–344.
- Díaz, A., Morales, G., Pino, L., Chourio, L., & Calchi, M. (1995). Eficacia comparada de técnicas coproscópicas empleadas en la determinación de la intensidad geohelmíntica. *Kasmera*, 23(2).
- Diederichs, N., O'Regan, D., Sullivan, C., & Fry, M. (2005). Orange River Basin. *New Approaches to Adaptive Water Management under Uncertainty*. November 2005.
- Dorchies, P. (2007). Réchauffement climatique et parasitisme. *ProdINRA (Bulletin des G.T.V.)*. 15-22.
- Dresser, B. L., Reece, R. H., & Maruska, E. J. (1988). Conservation of Asian Rhinos: Problems and Challenges. *Cincinnati Zoo and Botanical Garden*. Conference proceedings.
- Dryden, M. W., Payne, P. A., Ridley, R., & Smith, V. (2005). Comparison of common fecal flotation techniques for the recovery of parasite eggs and oocysts. *Veterinary Therapeutics: Research in Applied Veterinary Medicine*, 6(1), 15–28.

- Dunbar, R., & Barrett, L. (2000). Cousins: Our primate relatives. *BBC Ed (UK)*, 100-120, 425-441.
- Dunbar, R. I. M. (1974). Observations on the ecology and social organization of the green monkey, *Cercopithecus sabaeus*, in Senegal. *Primates; Journal of Primatology*, 15(4), 341–350.
- Dunn, A., & Keymer, A. (1986). Factors affecting the reliability of the McMaster technique. *Journal of Helminthology*, 60(4), 260–262.
- Duszynski, D. W., Wilson, W. D., Upton, S. J., & Levine, N. D. (2002). Coccidia (Apicomplexa: Eimeriidae) in the Primates and the Scandetia. *International Journal of Primatology*, 20(5), 761-797.
- Egwang, T. G., & Slocombe, J. O. (1981). Efficiency and sensitivity of techniques for recovering nematode eggs from bovine feces. *Canadian Journal of Comparative Medicine: Revue Canadienne de Medecine Comparee*, 45(3), 243–248.
- Ehrlinger, D. (1993). The Cincinnati Zoo and Botanical Garden: From Past to Present. *Cincinnati Zoo and Botanical Garden Ed*, 23-29.
- Epstein, G. W., & Awakian, A. (1937). Studies on the intestinal protozoa of rats. I.—Rats as carriers of dysenteric entamoebae. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 31(1), 87–8892.
- Erickson, M. C., & Ortega, Y. R. (2006). Inactivation of protozoan parasites in food, water, and environmental systems. *Journal of Food Protection*, 69(11), 2786–2808.
- Erwin, J., & Landon, J. C. (1992). Chimpanzee conservation and public health: environments for the future. 1st ed. *Tennessee University Ed (USA)*, 21-27.
- Fagbemi, B. O., Aderibigbe, O. A., Guobadia, E. E. (1997). The use of monoclonal antibody for the immunodiagnosis of *Fasciola gigantica* infection in cattle. *Veterinary Parasitology*, 69(3-4), 231-240.
- Fairbanks, L. A., & McGuire, M. T. (1984). Determinants of fecundity and reproductive success in captive vervet monkeys. *American Journal of Primatology*, 7(1), 27-38.
- Fairbanks, L. A., & McGuire, M. T. (1986). Age, reproductive value, and dominance-related behaviour in vervet monkey females: cross- generational influences on social relationships and reproduction. *Animal Behaviour*, 34(6), 1710–1721.
- Farr, M. M., & Luttermoser, G. W. (1941). Comparative efficiency of zinc sulfate and sugar solutions for the simultaneous flotation of coccidial oöcysts and helminth eggs. *The Journal of Parasitology*, 27(5), 417-424.
- Fedigan, L., & Fedigan, L. M. (1988). *Cercopithecus aethiops*: a review of field studies. *Cambridge University Press Ed (UK)*, 389-441.

- Fedigan, L. M., Fedigan, L., Chapman, C., & McGuire, M. T. (1984). A Demographic Model of Colonization by a Population of St. Kitts Vervets. *Folia Primatologica*, 42(3), 194–202.
- Fedullo, J. D. L., Rossi, C. N., Walderez, G., Germano, P. M. L., Larsson, C. E. (2013). Skin mycoflora of Cebus primates kept in captivity and semicaptivity. *Journal of Medical Primatology*, 42(6), 293-299.
- Ferrie, G. M., Farmer, K. H., Kuhar, C. W., Grand, A. P., Sherman, J., & Bettinger, T. L. (2014). The social, economic, and environmental contributions of Pan African Sanctuary Alliance primate sanctuaries in Africa. *Biodiversity and Conservation*, 23(1), 187–201.
- Ferry, T., Bouhour, D., De Monbrison, F., Laurent, F., Dumouchel-Champagne, H., Picot, S., ... Granier, P. (2004). Severe peritonitis due to *Balantidium coli* acquired in France. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 23(5), 393–395.
- Fincham, J. E., & Seier, J. V. (1981). Endemic enteric disease in vervet monkeys. *Journal of the South African Veterinary Association*, 52(3), 177–179.
- Flynn, R. J. (2007). Parasites of laboratory animals. 2nd Edition. *Blackwell Ed (UK)*, 2-11, 694-715.
- Foerster, S., Kithome, K., Cords, M., & Monfort, S. L. (2015). Social status and helminth infections in female forest guenons (*Cercopithecus mitis*). *American Journal of Physical Anthropology*, 158(1), 55–66.
- Foreyt, W. J. (1986). Recovery of nematode eggs and larvae in deer: evaluation of fecal preservation methods. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 189(9), 1065–1067.
- Foreyt, W. J. (2001). Veterinary parasitology reference manual. *Blackwell Ed (UK)*, 50.
- Friant, S., Ziegler, T. E., & Goldberg, T. L. (2016). Primate reinfection with gastrointestinal parasites: behavioural and physiological predictors of parasite acquisition. *Animal Behaviour*, 117, 105–113.
- Gaspard, P. G., Wiart, J., & Schwartzbrod, J. (1994). Experimental study of the helminth eggs adhesion (*Ascaris suum*). Analysis of the environmental implications. *Revue Des Sciences de L'eau / Journal of Water Science*. 7(4), 367-376.
- Ghai, R. R., Chapman, C. A., Omeja, P. A., Davies, T. J., & Goldberg, T. L. (2014). Nodule Worm Infection in Humans and Wild Primates in Uganda: Cryptic Species in a Newly Identified Region of Human Transmission. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(1), e2641.
- Gillespie, T. R., Greiner, E. C., & Chapman, C. A. (2004). Gastrointestinal parasites of the guenons of western Uganda. *The Journal of Parasitology*, 90(6), 1356–1360.
- Gillespie, T. R., Chapman, C. A., & Greiner, E. C. (2005a). Effects of logging on gastrointestinal parasite infections and infection risk in African primates. *Journal of Applied Ecology*, 42(4), 699–707.

- Gillespie, T. R., Greiner, E. C., & Chapman, C. A. (2005b). Gastrointestinal parasites of the colobus monkeys of Uganda. *The Journal of Parasitology*, *91*(3), 569–573.
- Gillespie, T. R. (2006). Noninvasive Assessment of Gastrointestinal Parasite Infections in Free-Ranging Primates. *International Journal of Primatology*, *27*(4), 1129–1143.
- Gillespie, T. R., & Chapman, C. A. (2008). Forest fragmentation, the decline of an endangered primate, and changes in host-parasite interactions relative to an unfragmented forest. *American Journal of Primatology*, *70*(3), 222–230.
- Gimard, G. (2001). Fasciolose bovine: enquête épidémiologique en abattoir et évaluation de la sensibilité des tests sérologiques. *École nationale vétérinaire, Nantes Ed (France)*.
- Gómez, M. S., Gracenea, M., Montoliu, I., Feliu, C., Monleon, A., Fernandez, J., & Enseñat, C. (1996). Intestinal parasitism-- protozoa and helminths--in primates at the Barcelona Zoo. *Journal of Medical Primatology*, *25*(6), 419–423.
- Gonedelé, S. B., Bené, J. C. K., Bitty, E. A., Koné, I., & Zinner, D. (2010). Distribution of the Green Monkey (*Chlorocebus sabaues*) in the Coastal Zone of Côte d'Ivoire. *Primate Conservation*, *24*(1), 91–97.
- Goodman, S., & Check, E. (2002). Animal experiments : The great primate debate. *Nature*, *417*, 684-687.
- Goodman, M., Porter, C. A., Czelusniak, J., Page, S. L., Schneider, H., Shoshani, J., ... Groves, C. P. (1998). Toward a phylogenetic classification of Primates based on DNA evidence complemented by fossil evidence. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *9*(3), 585– 598.
- Gordon, H., & Whitlock, H. V. (1939). A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *Journal of the Council for Scientific and Industrial Research*. *12*(1), 50-52.
- Gotoh, S. (2000). Regional differences in the infection of wild Japanese macaques by gastrointestinal helminth parasites. *Primates; Journal of Primatology*, *41*(3), 291–298.
- Gracenea, M., Gómez, M. S., Torres, J., Carné, E., & Fernández-Morán, J. (2002). Transmission dynamics of *Cryptosporidium* in primates and herbivores at the Barcelona zoo: a long-term study. *Veterinary Parasitology*, *104*(1), 19–26.
- Graczyk, T. K., Bosco-Nizeyi, J., Ssebide, B., Thompson, R. C. A., Read, C., & Cranfield, M. R. (2009). Anthropozoonotic *Giardia duodenalis* genotype (assemblage) an infections in habitats of free-ranging human-habituated gorillas, Uganda. *Journal of Parasitology*, *88*(5), 905–909.
- Greiner, K., Bettencourt, J., & Semolic, C. (2008). Strongyloidiasis: a review and update by case example. *Clinical Laboratory Science : Journal of the American Society for Medical Technology*, *21*(2), 82–88.

- Grobler, P., Jacquier, M., & deNys, H. (2006). Primate sanctuaries, taxonomy and survival: a case study from South Africa. *Ecological and Environmental Anthropology*, 2(2), 12-16.
- Groves, C. (2001). Why taxonomic stability is a bad idea, or why are there so few species of primates (or are there?). *Evolutionary Anthropology: Issues, News, and Reviews*, 10(6), 192–198.
- Grubb, P., Butynski, T. M., Oates, J. F., Bearder, S. K., Disotell, T. R., Groves, C. P., & Struhsaker, T. T. (2003). Assessment of the Diversity of African Primates. *International Journal of Primatology*, 24(6), 1301–1357.
- Guy, A. J., Stone, O. M. L., & Curnoe, D. (2011). The release of a troop of rehabilitated vervet monkeys (*Chlorocebus aethiops*) in KwaZulu-Natal, South Africa: outcomes and assessment. *Folia Primatologica*, 82(6), 308–320.
- Hacker, J. E., Cowlishaw, G., & Williams, P. H. (1998). Patterns of African primate diversity and their evaluation for the selection of conservation areas. *Biological Conservation*, 84(3), 251–262.
- Hahn, E. (1967). Animal gardens. *Doubleday, Garden City Ed (USA)*.
- Hahn, N. E., Proulx, D., Muruthi, P. M., Alberts, S., & Altmann, J. (2003). Gastrointestinal Parasites in Free-Ranging Kenyan Baboons (*Papio cynocephalus* and *P. anubis*). *International Journal of Primatology*, 24(2), 271–279.
- Hall, M. C. (1919). Apparatus for Use in examining Feces for Evidences of Parasitism. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 2(5).
- Happich, F. A., & Boray, J. C. (1969). Quantitative diagnosis of chronic fasciolosis. *Australian Veterinary Journal*. 45(7), 329-331.
- Haq, A., Sharma, A., Ahmad, S., Khan, H. M., & Khan, N. (1985). Experimental infection of rhesus monkeys with *Entamoeba histolytica* mimics human infection. *Laboratory Animal Science*, 35(5), 481–484.
- Haque, R., Kress, K., Wood, S., Jackson, T., Lyerly, D., Wilkins, T., & William, P. (1993). Diagnosis of pathogenic *Entamoeba histolytica* infection using a stool ELISA based on monoclonal antibodies to the galactose-specific adhesin. *The Journal of Infectious Diseases*, 167(1), 247–249.
- Harper, J. S., Rice, J. M., London, W. T., Sly, D. L., & Middleton, C. (1982). Disseminated strongyloidiasis in *Erythrocebus patas*. *American Journal of Primatology*, 3(1-4), 89–98.
- Harrison, M. J. S. (1983). Age and sex differences in the diet and feeding strategies of the green monkey, *Cercopithecus sabaeus*. *Animal Behaviour*, 31(4), 969–977.
- Harrison, M. J. S. (1983). Patterns of Range Use by the Green Monkey, *Cercopithecus sabaeus*, at Mt. Assirik, Senegal. *Folia Primatologica*, 41(3), 157–179.

Harvey, W. (1829). The Tower Menagerie: Comprising the Natural History of the Animals Contained in that Establishment. *Dublin and Wakeman Ed (Ireland)*.

Hassell, J. M., Blake, D. P., Cranfield, M. R., Ramer, J., Hogan, J. N., Noheli, J. B., ... Hermosilla, C. (2013). Occurrence and Molecular Analysis of *Balantidium coli* in Mountain Gorilla (*Gorilla beringei beringei*) in the Volcanoes National Park, Rwanda. *Journal of Wildlife Diseases*, 49(4), 1063–1065.

Hendrix, C. M. C. M. H. (1999). Diagnóstico parasitológico veterinario. *Elsevier Ed (USA)*. 245-271.

Henzi, S. P., & Lucas, J. W. (1980). Observations on the Inter-Troop Movement of Adult Vervet Monkeys (*Cercopithecus aethiops*). *Folia Primatologica*, 33(3), 220–235.

Hernandez, A. D., & MacIntosh, A. J. (2009). Primate parasite ecology: patterns and predictions from an on-going study of Japanese macaques. *Cambridge University Press Ed (UK)*, 3-29.

Hertzfel, D. H. (1987, January 1). History of the development of ideas in bibliometrics. *Encyclopedia of Library and Information Science*. 42(7), 144-219.

Hessler, J. R., & Lehner, N. D. M. (2009). Planning and designing research animal facilities. *Elsevier Ed (USA)*, 179-183.

Hiyaoka, A., & Cho, F. (1990). A method for collecting semen by fingers in the African green monkey (*Cercopithecus aethiops*) and properties of the semen collected. *Jikken Dobutsu. Experimental Animals*, 39(1), 121–124.

Hosey, G. R. (2005). How does the zoo environment affect the behaviour of captive primates? *Applied Animal Behaviour Science*, 90(2), 107-129.

Howells, M. E., Pruett, J., & Gillespie, T. R. (2011). Patterns of gastro-intestinal parasites and commensals as an index of population and ecosystem health: the case of sympatric western chimpanzees (*Pan troglodytes verus*) and guinea baboons (*Papio hamadryas papio*) at Fongoli, Senegal. *American Journal of Primatology*, 73(2), 173–179.

Hubbard, G. B. (1995). Protozoal diseases of nonhuman primates. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 4(3), 145–149.

Isbell, L. A., Cheney, D. L., & Seyfarth, R. M. (1993). Are immigrant vervet monkeys, *Cercopithecus aethiops*, at greater risk of mortality than residents? *Animal Behaviour*, 45(4), 729–734.

Isbell, L. A., Pruett, J. D., Nzuma, B. M., & Young, T. P. (1999). Comparing measures of travel distances in primates: methodological considerations and socioecological implications. *American Journal of Primatology*, 48(2), 87–98.

- Isbell, L. A., Pruett, J. D., & Young, T. P. (1998). Movements of vervets (*Cercopithecus aethiops*) and patas monkeys (*Erythrocebus patas*) as estimators of food resource size, density, and distribution. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 42(2), 123–133.
- IUCN. (2016). 2016 IUCN Red list of threatened species. *IUCN Ed (USA)*.
- Jacquet, P. (2001). L'acquisition de l'immunité dans les strongyloses des ruminants: bases théoriques. *Journées Nationales GTV Proceedings*, 341-351.
- Janovy, J., & Roberts, L. (1994, January 1). Foundations of parasitology. *Mosby Ed.* 419-432.
- Jasinska, A. J., Schmitt, C. A., Service, S. K., Cantor, R. M., Dewar, K., Jentsch, J. D., ... Freimer, N. B. (2013). Systems biology of the vervet monkey. *ILAR Journal*, 54(2), 122–143.
- Johnston, S. P., Ballard, M. M., Beach, M. J., Causer, L., & Wilkins, P. P. (2003). Evaluation of three commercial assays for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* organisms in fecal specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(2), 623–626.
- Jones, C. R. (1980). The geology of the Kalahari. *Botswana Notes and Records Ed (Botswana)* 1-14.
- Jones-Engel, L., Engel, G. A., Schillact, M. A., Froehlich, J., Paputungan, U., & Kyes, R. C. (2004). Prevalence of enteric parasites in pet macaques in Sulawesi, Indonesia. *American Journal of Primatology*, 62(2), 71–82.
- Kalishman, J., Paul-Murphy, J., Scheffler, J., & Thomson, J. A. (1996). Survey of *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in a captive population of common marmosets. *Laboratory Animal Science*. 46(1), 116-119.
- Karere, G. M., & Munene, E. (2002). Some gastro-intestinal tract parasites in wild De Brazza's monkeys (*Cercopithecus neglectus*) in Kenya. *Veterinary Parasitology*, 110(1), 153–157.
- Katagiri, S., & Oliveira-Sequeira, T. C. G. (2010). Comparison of three concentration methods for the recovery of canine intestinal parasites from stool samples. *Experimental Parasitology*, 126(2), 214–216.
- Kavanagh, M. (1981). Variable Territoriality among Tantalus Monkeys in Cameroon. *Folia Primatologica*, 36(1), 76–98.
- Kerwin, A. M. (2006). Overcoming the Barriers to the Retirement of Old and New World Monkeys From Research Facilities. *Journal of Applied Animal Welfare Science*, 9(4), 337–347.
- Kilbourn, A. M., & Karesh, W. B. (1998). Disease evaluation of free-ranging orangutans (*Pongo pygmaeus pygmaeus*) in Sabah, Malaysia. *Proceedings of the American Association of Zoo Veterinarians and American Association of Wildlife Veterinarians, Joint Conference*. 417-421.

- Kilbourn, A. M., Karesh, W. B., Wolfe, N. D., Bosi, E. J., Cook, R. A., & Andau, M. (2003). Health evaluation of free-ranging and semi- captive orangutans (*Pongo pygmaeus pygmaeus*) in Sabah, Malaysia. *Journal of Wildlife Diseases*, 39(1), 73–83.
- Kim, J. C. S., Abee, C. R., & Wolf, R. H. (1978). Balantidiosis in a chimpanzee (*Pan troglodytes*). *Laboratory Animals*, 12(4), 231–233.
- King, T., Chamberlan, C., Courage, A. (2012). Assessing Initial Reintroduction Success in Long-Lived Primates by Quantifying Survival, Reproduction, and Dispersal Parameters : Western Lowland Gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*) in Congo and Gabon. *International Journal of Parasitology*, 33(1), 134-149.
- Kingdon, J., & Lagen, M. J. (1997). The kingdom field guide to African mammals. *Academic Press Ed(USA)*, 45-619.
- Kleiman, D. G., Allen, M. E., & Thompson, K. V. (1996). Wild mammals in captivity. *University of Chicago Press Ed (USA)*.
- Knopp, S., Glinz, D., Rinaldi, L., Mohammed, K. A., N’goran, E. K., Stothard, J. R., ... Utzinger, J. (2009). FLOTAC: A promising technique for detecting helminth eggs in human faeces. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 103(12), 1190–1194.
- Konstant, W.R., & Mittermeier, R. A. (1982). Introduction, reintroduction and translocation of Neotropical primates : past experiences and future possibilities. *International Zoo Yearbook*, 22(1), 69-77.
- Kooriyama, T., Hasegawa, H., Shimozuru, M., Tsubota, T., Nishida, T., & Iwaki, T. (2012). Parasitology of five primates in Mahale Mountains National Park, Tanzania. *Primates; Journal of Primatology*, 53(4), 365–375.
- Kouassi, R. Y. W., McGraw, S. W., Yao, P. K., Abou-Bacar, A., Brunet, J., Pesson, B., ... Candolfi, E. (2015). Diversity and prevalence of gastrointestinal parasites in seven non-human primates of the Taï National Park, Côte d’Ivoire. *Parasite*, 22, 1.
- Koutz, F. R. (1941). A comparison of flotation solutions in the detection of parasite ova in feces. *American Journal of Veterinary Research*. 2(2), 95-100.
- Kramer, J. A., Hachey, A. M., Wachtman, L. M., & Mansfield, K. G. (2009). Treatment of giardiasis in common marmosets (*Callithrix jacchus*) with tinidazole. *Comparative Medicine*, 59(2), 174–179.
- Krauth, S. J., Coulibaly, J. T., Knopp, S., Traoré, M., N’goran, E. K., & Utzinger, J. (2012). An in-depth analysis of a piece of shit: distribution of *Schistosoma mansoni* and hookworm eggs in human stool. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(12), e1969.
- Krief, S., Huffman, M. A., Sévenet, T., Guillot, J., Bories, C., Hladik, C. M., & Wrangham, R. W. (2005). Noninvasive Monitoring of the Health of *Pan troglodytes schweinfurthii* in the Kibale National Park, Uganda. *International Journal of Primatology*, 26(2), 467–490.

- Kubab, N., Hakawati, I., & Alajati-Kubab, S. (2006). Guide des examens biologiques. *Lamarre Ed.*
- Kudo, R. R. (1966). Protozoología. *Compañía Editorial Continental Ed (Mexico)*, 825-826.
- Kuntz, R. E. (1982). Significant infections in primate parasitology. *Journal of Human Evolution*, 11(3), 185–194.
- Kuntz, R. E., & Myers, B. J. (1966). Parasites of baboons (*Papio doguera* (Pucheran, 1856)) captured in Kenya and Tanzania, east Africa. *Primates; Journal of Primatology*, 7(1), 27–32.
- Labes, E. M., Hegglin, D., Grimm, F., Nurcahyo, W., Harrison, M. E., Bastian, M. L., & Deplazes, P. (2010). Intestinal parasites of endangered orangutans (*Pongo pygmaeus*) in Central and East Kalimantan, Borneo, Indonesia. *Parasitology*, 137(1), 123–135.
- Lane, K. E., Holley, C., Hollocher, H., & Fuentes, A. (2011). The anthropogenic environment lessens the intensity and prevalence of gastrointestinal parasites in Balinese long-tailed macaques (*Macaca fascicularis*). *Primates; Journal of Primatology*, 52(2), 117–128.
- Leendertz, F. H., Pauli, G., Maetz-Rensing, K., Boardman, W., Nunn, C., Ellerbrok, H., ... Christophe, B. (2006). Pathogens as drivers of population declines: The importance of systematic monitoring in great apes and other threatened mammals. *Biological Conservation*, 131(2), 325–337.
- Lee, P. C., & Else, J. G. (1986). Primate Ecology and Conservation. *Cambridge University Press Ed (UK)*, 229-249.
- Lee, R. V., Prowten, A. W., Anthone, S., Satchidanand, S. K., Fisher, J. E., & Anthone, R. (1990). Typhlitis due to *Balantidium coli* in captive lowland gorillas. *Reviews of Infectious Diseases*, 12(6), 1052–1059.
- Legesse, M., & Erko, B. (2004). Zoonotic intestinal parasites in *Papio anubis* (baboon) and *Cercopithecus aethiops* (vervet) from four localities in Ethiopia. *Acta Tropica*, 90(3), 231–236.
- Lernould, J. M. (1988). Classification and geographical distribution of guenons: a review. *Cambridge University Press Ed (UK)*, 54-78.
- Levecke, B., Dorny, P., Geurden, T., Vercammen, F., & Vercruyssen, J. (2007). Gastrointestinal protozoa in non-human primates of four zoological gardens in Belgium. *Veterinary Parasitology*, 148(3), 236–246.
- Levecke, B. (2010). The importance of gastrointestinal protozoa in captive non-human primates. *University of Ghent Ed (Belgium)*, 25, 31-34, 116.
- Levecke, B., Behnke, J. M., Ajjampur, S. S. R., Albonico, M., Ame, S. M., Charlier, J., ... Vercruyssen, J. (2011). A Comparison of the Sensitivity and Fecal Egg Counts of the McMaster Egg Counting and Kato-Katz Thick Smear Methods for Soil-Transmitted Helminths. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(6), e1201.

- Lilly, A. A., Mehlman, P. T., & Doran, D. (2002). Intestinal Parasites in Gorillas, Chimpanzees, and Humans at Mondika Research Site, Dzanga-Ndoki National Park, Central African Republic. *International Journal of Primatology*, 23(3), 555–573.
- Lindsay, D. S., Dubey, J. P., & Blagburn, B. L. (1997). Biology of *Isospora* spp. from humans, nonhuman primates, and domestic animals. *Clinical Microbiology Reviews*, 10(1), 19–34.
- Linneo, C. (1758). Systema Naturae. Regnum Animale. (Reimpresión 1956). *British Museum (Natural History)*. Volumen 1.
- Loisel, G. (1912). Histoire des ménageries de l'antiquité à nos jours: Epoque contemporaine (XIXe et XXe s.). III. O. Doin et fills Ed (France).
- Loomis, M. R., Britt, J. O., Gendron, A. P., Holshuh, H. J., & Howard, E. B. (1983). Hepatic and gastric amebiasis in black and white colobus monkeys. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 183(11), 1188–1191.
- Luukkonen, T. (1990). Citations in the rhetorical, reward, and communication systems of science. *University of Tampere Ed (Finland)*.
- MacIntosh, A. J. J., Alados, C. L., & Huffman, M. A. (2011). Fractal analysis of behaviour in a wild primate: behavioural complexity in health and disease. *Journal of The Royal Society Interface*, 8(63), 1497–1509.
- MacIntosh, A. J. J., Hernandez, A. D., & Huffman, M. A. (2010). Host age, sex, and reproductive seasonality affect nematode parasitism in wild Japanese macaques. *Primates; Journal of Primatology*, 51(4), 353–364.
- MacIntosh, A. J. J., Jacobs, A., Garcia, C., Shimizu, K., Mouri, K., Huffman, M. A., & Hernandez, A. D. (2012). Monkeys in the Middle: Parasite Transmission through the Social Network of a Wild Primate. *PLoS One*, 7(12), e51144.
- MAFF. (1977). Manual of veterinary parasitological laboratory techniques. *Ministry of Agriculture, Fisheries and Food Ed (UK)*, 61-104.
- Malmsten, P. H. (1857). Infusorien als intestinal-thiere beim Menschen. *Virchows Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie un für klinische Medicin*. 12, 302-309.
- Mariano, J., Sánchez, G., & López, B. (2012). Comparación de dos nuevas técnicas de sedimentación y métodos convencionales para la recuperación de parásitos intestinales. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*. 59(4), 233-242.
- Marinella, C. L. C., Villalobos, R., Colina, M., Di Toro, L., Villalobos, C., & Acurero, E. (2014). "Comparación de técnicas de laboratorio para el diagnóstico de *Giardia intestinalis*" 'Comparison of Laboratory Techniques For the Diagnosis of *Giardia Intestinalis*'. *Kasmera*, 40(1), 32–40.

- Márquez-Monter, H., Fuentes-Orozco, R., Correa-Lemus, I., & Becker, I. (1991). Invasive amebiasis in a spider monkey (*Ateles geoffroyi*). Case report and a short review of the literature of amebiasis in non-human primates. *Archivos de Investigación Médica*, 22(1), 75–78.
- Martin, P., & Bateson, P. (1993). Measuring behaviour: an introductory guide. *Cambridge University Press Ed (UK)*.
- Mayhew, R. L. (1962). Studies on bovine gastrointestinal parasites. XXVI. A flotation method for the recovery of parasitic eggs using cane sugar. *Transactions of the American Microscopical Society*, 81(3), 264-267.
- Mezo, M., González-Warleta, M., Carro, C., Ubeira, F. M. (2009). An ultrasensitive capture ELISA for detection of *Fasciola hepatica* coproantigens in sheep and cattle using a new monoclonal antibody (MM3). *Journal of Parasitology*, 90(4), 845-852.
- McClure, H. M., & Guilloud, N. B. (1971). Comparative pathology of the chimpanzee. *Bourne, University Park Press Ed (UK)*, 103-272.
- McConnell, E. E., Basson, P. A., de Vos, V., Myers, B. J., & Kuntz, R. E. (1974). A survey of diseases among 100 free-ranging baboons (*Papio ursinus*) from the Kruger National Park. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 41(3), 97–167.
- Mehlhorn, H., & del Campillo, M. C. (2001). Parasitología veterinaria. *McGraw-Hill Ed (USA)*.
- Meissonnier, E., & Mage, C. (2007). Les méthodes de détection de fasciola hepatica dans les troupeaux bovins en france. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, 160(5), 395-406.
- Merino, E., Glender, W., del Muro, R., Ortiz, L. (1990). Evaluation of the ELISA test for detection of *Entamoeba histolytica* in feces. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 4(1), 39-42.
- Michaud, C., Tantalean, M., Ique, C., Montoya, E., & Gozalo, A. (2003). A survey for helminth parasites in feral New World non-human primate populations and its comparison with parasitological data from man in the region. *Journal of Medical Primatology*, 32(6), 341–345.
- Moed, H. F., Burger, W. J. M., Frankfort, J. G., & Van Raan, A. F. J. (1985). The use of bibliometric data for the measurement of university research performance. *Research Policy*, 14(3), 131–149.
- Moravcsik, M. J. (1989). ¿Cómo evaluar la ciencia y a los científicos? *Revista Española de Documentación Científica*, 12(3), 313.
- Morgan, U. M., Forbes, D. A., Thompson, R. C. A. (1998). Molecular epidemiology of *Cryptosporidium parvum* infection. *European Journal of Protistology*, 34(3), 262-266.
- Morgan, K. N., & Tromborg, C. T. (2007). Sources of stress in captivity. *Applied Animal Behaviour Science*, 102(3), 262–302.

Muehlenbein, M. P. (2005). Parasitological analyses of the male chimpanzees (*Pan troglodytes schweinfurthii*) at Ngogo, Kibale National Park, Uganda. *American Journal of Primatology*, 65(2), 167–179.

Mul, I. F., Paembonan, W., Singleton, I., Wich, S. A., & van Bolhuis, H. G. (2007). Intestinal Parasites of Free-ranging, Semicaptive, and Captive *Pongo abelii* in Sumatra, Indonesia. *International Journal of Primatology*, 28(2), 407–420.

Müller-Graf, C. D. M., Collins, D. A., Packer, C., & Woolhouse, M. E. J. (1997). *Schistosoma mansoni* infection in a natural population of olive baboons *Papio cynocephalus anubis* in Gombe Stream National Park, Tanzania. *Parasitology*, 115(6), 621–627.

Munene, E., Otsyula, M., Mbaabu, D. A. N., Mutahi, W. T., Muriuki, S. M. K., & Muchemi, G. M. (1998). Helminth and protozoan gastrointestinal tract parasites in captive and wild-trapped African non-human primates. *Veterinary Parasitology*, 78(3), 195–201.

Muriuki, S. M., Murugu, R. K., Munene, E., Karere, G. M., & Chai, D. C. (1998). Some gastrointestinal parasites of zoonotic (public health) importance commonly observed in old world non-human primates in Kenya. *Acta Tropica*, 71(1), 73–82.

Murray, S., Stem, C., Boudreau, B., & Goodall, J. (2000). Intestinal parasites of baboons (*Papio cynocephalus anubis*) and chimpanzees (*Pan troglodytes*) in Gombe National Park. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 31(2), 176–178.

Myers, B. J., & Kuntz, R. E. (1972). A checklist of parasites and commensals reported for the chimpanzee (*Pan*). *Primates; Journal of Primatology*, 13(4), 433–471.

Nakagawa, N. (1999). Differential habitat utilization by patas monkeys (*Erythrocebus patas*) and tantalus monkeys (*Cercopithecus aethiops tantalus*) living sympatrically in northern Cameroon. *American Journal of Primatology*, 49(3), 243–264.

Nakauchi, K. (1999). The prevalence of *Balantidium coli* infection in fifty-six mammalian species. *The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 61(1), 63–65.

National Research Council (US) Institute for Laboratory Animal Research. (2003). International Perspectives: The Future of Nonhuman Primate Resources. *Proceedings of the Workshop of the National Research Council (US) Institute for Laboratory Animal Research Ed (USA)*, 237-242.

Navone, G. T., Gamboa, M. L., Kozubsky, I. E., Costas, M. E., Cardozo, M. S., Sisliauskas, M. N., & González, M. (2005). Estudio comparativo de recuperación de formas parasitarias por tres diferentes métodos de enriquecimiento coproparasitológico. *Parasitología Latinoamericana*, 60(3), 178–181.

Nielsen, M. K., Vidyashankar, A. N., Andersen, U. V., DeLisi, K., Pilegaard, K., & Kaplan, R. M. (2010). Effects of fecal collection and storage factors on strongylid egg counts in horses. *Veterinary Parasitology*, 167(1), 55–61.

- Nizeyi, J. B., Mwebe, R., Nanteza, A., Cranfield, M. R., Kalema, G. R. N. N., & Graczyk, T. K. (1999). *Cryptosporidium* sp. and *Giardia* sp. Infections in Mountain Gorillas (*Gorilla gorilla beringei*) of the Bwindi Impenetrable National Park, Uganda. *The Journal of Parasitology*, 85(6), 1084.
- Nizeyi, J., Cranfield, M. R., & Graczyk, T. (2002). Cattle near the Bwindi Impenetrable National Park, Uganda, as a reservoir of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* for local community and free-ranging gorillas. *Parasitology Research*, 88(4), 380–385.
- Núñez-Fernández, F. Á., Sanjurjo Gonzalez, E., & Villalvilla, C. M. F. (1991). Comparison of several coproparasitological techniques for diagnosis of soil-transmitted helminthiasis. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 33(5), 403–406.
- Nunn, C. L., Altizer, S., Jones, K. E., & Sechrest, W. (2003). Comparative Tests of Parasite Species Richness in Primates. *The American Naturalist*, 162(5), 597–614.
- Nunn, C. L., & Dokey, A. T. W. (2006). Ranging patterns and parasitism in primates. *Biology Letters*, 2(3), 351–354.
- O'Grady, M. R., Slocombe, J. O. D. (1980). An investigation of variables in a fecal flotation technique. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 44(2), 148-157.
- Orihel, T. C., & Seibold, H. R. (1972). Nematodes of the Bowel and Tissues. *Pathology of Simian Primates*, 76–703.
- Otranto, D., & Traversa, D. (2002). A review of dicrocoeliosis of ruminants including recent advances in the diagnosis and treatment. *Veterinary Parasitology*, 107(4), 317.
- Pajuelo-Camacho, G., & Luján-Roca, D. (2006). Aplicación de la técnica de sedimentación espontánea en tubo en el diagnóstico de parásitos intestinales. *Revista Mexicana de Patología Clínica*. 53(2), 114-118.
- Parfitt, J. W. (1969). The testing of floatation fluids for helminth eggs with a note on eggs of *Gongylonema*. *Laboratory Practice*. Marzo.
- Pasternak, G., Brown, L. R., Kienzle, S., Fuller, A., Barrett, L., & Henzi, S. P. (2013). Population ecology of vervet monkeys in a high latitude, semi-arid riparian woodland. *Koedoe*, 55(1), 1–9.
- Petrášová, J., Modrý, D., Huffman, M. A., Mapua, M. I., Bobáková, L., Mazoch, V., ... Petrželková, K. J. (2010). Gastrointestinal Parasites of Indigenous and Introduced Primate Species of Rubondo Island National Park, Tanzania. *International Journal of Primatology*, 31(5), 920–936.
- Petrželková, K. J., Hasegawa, H., Moscovice, L. R., Kaur, T., Issa, M., & Huffman, M. A. (2006). Parasitic Nematodes in the Chimpanzee Population on Rubondo Island, Tanzania. *International Journal of Primatology*, 27(3), 767–777.

- Phillips, K. A., Haas, M. E., Grafton, B. W., & Yrivarren, M. (2004). Survey of the gastrointestinal parasites of the primate community at Tambopata National Reserve, Peru. *Proceedings of the Zoological Society of London*, 264(2), 149–151.
- Phiri, A. M., Phiri, I. K., & Sikasunge, C. S. (2006). Comparative fluke burden and pathology in condemned and non-condemned cattle from selected abattoirs in Zambia. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 73(4), 275-281.
- Piñero, J. L., & Ferrandis, M. T. (1992). Los indicadores bibliométricos y la evaluación de la actividad médico-científica: la aplicación de los indicadores. *Medicina clínica*, 98(4), 142-148.
- Pit, D. S., Rijcken, F. E., Raspoort, E. C., Baeta, S. M., & Polderman, A. M. (1999). Geographic distribution and epidemiology of *Oesophagostomum bifurcum* and hookworm infections in humans in Togo. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 61(6), 951–955.
- Pomajbíková, K., Oborník, M., Horák, A., Petrželková, K. J., Grim, J. N., Levecke, B., ... Modrý, D. (2013). Novel insights into the genetic diversity of *Balantidium* and *Balantidium*-like cyst-forming ciliates. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(3), e2140.
- Pomajbíková, K., Petrželková, K. J., Profousová, I., Petrášová, J., & Modrý, D. (2010). Discrepancies in the occurrence of *Balantidium coli* between wild and captive African great apes. *The Journal of Parasitology*, 96(6), 1139–1144.
- Portillo, J. D., del Barrio, M., & Salido, F. P. (1997). Aspectos básicos de bioquímica clínica. *Ediciones Díaz de Santos Ed (Mexico)*, 231-251.
- Presland, S. L., Morgan, E. R., & Coles, G. C. (2005). Counting nematode eggs in equine faecal samples. *The Veterinary Record*, 156(7), 208–210.
- Pusey, A. E. (1987). Dispersal and philopatry. *Primate Societies*, 250–266.
- Queiroga, A., Abellana, R., Pereira-da-Silva, H. D., Santos, I., Serra, P. T., Juliao, G. R., Orlandi, P.P., Ascaso, C. (2014). Comparison of the performance of two spontaneous sedimentation techniques for the diagnosis of human intestinal parasites in the absence of a gold standard. *Acta tropica*, 131, 63-70.
- Ravasi, D. F., O'Rian, M. J., Adams, V. J., Appleton, C. C. (2012). A coprological survey of protozoan and nematode parasites of free-ranging chacma baboons (*Papio ursinus*) in the southwestern Cape, South Africa. *South African Journal of Wildlife Research* 42(1), 35-44.
- Reichel, M. P., Vanhoff, K., & Baxter, B. (2005). Performance characteristics of an enzyme-linked immunosorbent assay performed in milk for the detection of liver fluke (*Fasciola hepatica*) infection in cattle. *Veterinary Parasitology*, 129(1), 61–66.
- Reichenbach, H. (1989). Guide to animal-related records at the National Zoological Park, 1887–1985. *Archives of Natural History*, 16(2), 239–240.

- Rinaldi, L., Coles, G. C., Maurelli, M. P., Musella, V., & Cringoli, G. (2011). Calibration and diagnostic accuracy of simple flotation, McMaster and FLOTAC for parasite egg counts in sheep. *Veterinary Parasitology*, 177(3), 345–352.
- Rogers, A. W. (1935). The 'Solid' geology of the Kalahari. *Transactions of the Royal Society of South Africa*, 23(2), 165–176.
- Rojo-Vázquez, F. A., Meana, A., Valcárcel, F., & Martínez-Valladares, M. (2012). Update on trematode infections in sheep. *Veterinary Parasitology*, 189(1), 15–38.
- Rossanigo, C. E., & Gruner, L. (1991). Accuracy of two methods for counting eggs of sheep nematode parasites. *Veterinary Parasitology*, 39(1), 115–121.
- Rothman, J. M., Pell, A. N., & Bowman, D. D. (2009). Host-Parasite Ecology of the Helminths in Mountain Gorillas. *The Journal of Parasitology*, 94(4), 834–840.
- Rousset, J. J. (1993). Copro-parasitologie pratique. *ESTEM / AULPEF Ed (France)*.
- Rowell, T. E. (1970). Reproductive cycles of two cercopithecus monkeys. *Journal of Reproduction and Fertility*, 22(2), 321–338.
- Russon, A. E. (2009). Orangutan rehabilitation and reintroduction. *Oxford University Press Ed (UK)*, 327-350.
- Sancho, R. (1990). Indicadores bibliométricos utilizados en la evaluación de la ciencia y la tecnología. Revisión bibliográfica. *Revista Española de Documentación Científica*, 13(3), 842.
- Sak, B., Petrželková, K. J., Květoňová, D., Mynářová, A., Pomajbíková, K., Modrý, D., ... Kváč, M. (2014). Diversity of *Microsporidia*, *Cryptosporidium* and *Giardia* in Mountain Gorillas (*Gorilla beringei beringei*) in Volcanoes National Park, Rwanda. *PLoS One*, 9(11), e109751.
- Salem, A., Chauvin, A., Braun, J. P., & Jacquiet, P. (2011). Comparaison de six méthodes de dépistage de *Fasciola hepatica* chez les bovins naturellement infestés. *Revue de Médecine Veterinaire*, 162(1), 18-24.
- Salzer, J. S., Rwego, I. B., Goldberg, T. L., Kuhlenschmidt, M. S., & Gillespie, T. R. (2007). *Giardia* sp. and *Cryptosporidium* sp. infections in primates in fragmented and undisturbed forest in western Uganda. *The Journal of Parasitology*, 93(2), 439–440.
- Samuel, W. M., Pybus, M. J., & Kocan, A. A. (2001). Parasitic Diseases of Wild Mammals. *Blackwell Ed (UK)*, 399-416.
- Sapolsky, R. M. (2005). The Influence of Social Hierarchy on Primate Health. *Science*, 308(5722), 648-652.
- Schuster, F. L., & Ramirez-Ávila, L. (2008). Current world status of *Balantidium coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(4), 626–638.

- Seghetti, L. (1950). An improved method of mixing fecal suspensions for nematode egg counts. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 17, 26-27.
- Seier, J. V. (1986). Breeding vervet monkeys in a closed environment. *Journal of Medical Primatology*, 15(5), 339–349.
- Seier, J. V., Venter, F. S., Fincham, J. E., & Taljaard, J. J. (1991). Hormonal vaginal cytology of vervet monkeys. *Journal of Medical Primatology*, 20(1), 1–5.
- Sengupta, M. E., Thamsborg, S. M., Andersen, T. J., Olsen, A., & Dalsgaard, A. (2011). Sedimentation of helminth eggs in water. *Water Research*, 45(15), 4651–4660.
- Sestak, K., Merritt, C. K., Borda, J., Saylor, E., Schwamberger, S. R., Cogswell, F., ... Lackner, A. A. (2003). Infectious agent and immune response characteristics of chronic enterocolitis in captive rhesus macaques. *Infection and Immunity*, 71(7), 4079–4086.
- Sixtos, C., & Virbac, L. (2010). Procedimientos y técnicas para la realización de estudios coproparasitológicos. *Virbac Salud Animal Ed (France)*, 6-29, 24.
- Sleeman, J. M., Meader, L. L., Mudakikwa, A. B., Foster, J. W., & Patton, S. (2009). Gastrointestinal parasites of mountain gorillas (*Gorilla gorilla beringei*) in the Parc National des Volcans, Rwanda. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 31(3), 322–328.
- Slocombe, J. O. (1973). Parasitisms in domesticated animals in Ontario. I. Ontario Veterinary College Records 1965-70. *The Canadian Veterinary Journal*, 14(2), 36–42.
- Smales, L. R., Harris, P. D., & Behnke, J. M. (2009). A redescription of *Protospirura muricola* Gedoelst, 1916 (Nematoda: Spiruridae), a parasite of murid rodents. *Systematic Parasitology*, 72(1), 15–26.
- Small, H. (1973). Co-citation in the scientific literature: A new measure of the relationship between two documents. *Journal of the Association for Information Science and Technology*, 24(4), 265–269.
- Snaith, T. V., Chapman, C. A., Rothman, J. M., & Wasserman, M. D. (2008). Bigger groups have fewer parasites and similar cortisol levels: a multi-group analysis in red colobus monkeys. *American Journal of Primatology*, 70(11), 1072–1080.
- Soorae, P. S., & Baker, A. (2002). Guidelines for Nonhuman Primate Reintroductions. *IUCN Ed (USA)*.
- Stoinski, T. S., Jaicks, H. F., & Drayton, L. A. (2012). *Zoo Biology*, 31(5), 586-599.
- Stoll, N. R. (1930). On methods of counting nematode ova in sheep dung. *Parasitology*, 22(1), 116-136.
- Struhsaker, T. T. (1967a). Ecology of Vervet Monkeys (*Cercopithecus aethiops*) in The Masai-Amboseli Game Reserve, Kenya. *Ecology*, 48(6), 891.

- Struhsaker, T. T. (1967b). Social structure among vervet monkeys (*Cercopithecus aethiops*). *Behaviour*, 29(2), 6–121.
- Stuart, M. D., Greenspan, L. L., Glander, K. E., & Clarke, M. R. (1990). A coprological survey of parasites of wild mantled howling monkeys, *Alouatta palliata palliata*. *Journal of Wildlife Diseases*, 26(4), 547–549.
- Taylor, M. A., Coop, R. L., & Wall, R. L. (2016). Veterinary parasitology. *Blackwell Ed.* 853-866.
- Teare, J. A., & Loomis, M. R. (1982). Epizootic of balantidiasis in lowland gorillas. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 181(11), 1345–1347.
- Teichroeb, J. A., Kutz, S. J., Parkar, U., Thompson, R. C. A., & Sicotte, P. (2009). Ecology of the gastrointestinal parasites of *Colobus vellerosus* at Boabeng-Fiema, Ghana: possible anthroponozoonotic transmission. *American Journal of Physical Anthropology*, 140(3), 498–507.
- Templeton, A. R., Hemmer, H., Mace, G., & Seal, U. S. (1986). Local adaptation, coadaptation, and population boundaries. *Zoo Biology*, 5, 115-125.
- Thienpont, D., Rochette, F., & Vanparijs, O. (1986). Diagnosing helminthiasis through coprological examination. *Janssen Research Foundation Ed (USA)*.
- Tomczuk, K., Kostro, K., Szczepaniak, K. O., Grzybek, M., Studzińska, M., Demkowska-Kutrzepa, M., & Roczeń-Karczmarz, M. (2014). Comparison of the sensitivity of coprological methods in detecting *Anoplocephala perfoliata* invasions. *Parasitology Research*, 113(6), 2401–2406.
- Truant, A. L., Elliott, S. H., Kelly, M. T., & Smith, J. H. (1981). Comparison of formalin-ethyl ether sedimentation, formalin-ethyl acetate sedimentation, and zinc sulfate flotation techniques for detection of intestinal parasites. *Journal of Clinical Microbiology*, 13(5), 882–884.
- Turner, T. R. (1989). West Indian green monkeys: Problems in historical biogeography. *American Journal of Physical Anthropology*, 78(1), 126–127.
- Turner, T. R., Anapol, F., & Jolly, C. J. (1997). Growth, development, and sexual dimorphism in vervet monkeys (*Cercopithecus aethiops*) at four sites in Kenya. *American Journal of Physical Anthropology*, 103(1), 19–35.
- Universidad de Texas (USA). Consultada el 10 de marzo de 2016, en www.utexas.edu
- Urquhart, G. M. (1990). Parasitología veterinaria. *Guanabara Koogan Ed (Brasil)*, 10-35.
- Vadlejch, J., Petrtýl, M., Zaichenko, I., Cadková, Z., Jankovská, I., Langrová, I., & Moravec, M. (2011). Which McMaster egg counting technique is the most reliable? *Parasitology Research*, 109(5), 1387–1394.

- Van der Kuyl, A. C., Dekker, J. T., & Goudsmit, J. (1996). Baboon endogenous virus evolution and ecology. *Trends in Microbiology*, 4(11), 455–459.
- Van de Waal, E., Bshary, R., & Whiten, A. (2014). Wild vervet monkey infants acquire the food-processing variants of their mothers. *Animal Behaviour*, 90, 41–45.
- Van Raan, A. F. J., & Peters, H. P. F. (1989). Dynamics of a scientific field analysed by co-subfield structures. *Scientometrics*, 15(5), 607–620.
- Van Wyk, J. A., & Van Wyk, L. (2002). Freezing of sheep faeces invalidates *Haemonchus contortus* faecal egg counts by the McMaster technique. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 69(4), 299–304.
- Verweij, J. J., & van Lieshout, L. (2011). Intestinal parasitic infections in an industrialized country; a new focus on children with better DNA-based diagnostics. *Parasitology*, 138(12), 1492–1498.
- Verweij, J. J., Vermeer, J., Brienen, E. A. T., Blotkamp, C., Laeijendecker, D., van Lieshout, L., & Polderman, A. M. (2003). *Entamoeba histolytica* infections in captive primates. *Parasitology Research*, 90(2), 100–103.
- Vickers, J. H. (1969). Diseases of primates affecting the choice of species for toxicologic studies. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 162(1), 659–672.
- Vitazkova, S. K., & Wade, S. E. (2006). Parasites of free-ranging black howler monkeys (*Alouatta pigra*) from Belize and Mexico. *American Journal of Primatology*, 68(11), 1089–1097.
- Vitone, N. D., Altizer, S., & Nunn, C. L. (2004). Body size, diet and sociality influence the species richness of parasitic worms in anthropoid primates. *Evolutionary Ecology Research*, 6(2), 183–199.
- Wenz, A., Heymann, E. W., Petney, T. N., & Taraschewski, H. F. (2010). The influence of human settlements on the parasite community in two species of Peruvian tamarin. *Parasitology*, 137(4), 675–684.
- Weyher, A. H., Ross, C., & Semple, S. (2006). Gastrointestinal Parasites in Crop Raiding and Wild Foraging *Papio anubis* in Nigeria. *International Journal of Primatology*, 27(6), 1519–1534.
- Whittsit, F. (1995). Social behaviour and rehabilitation of primates. *Proceedings of the Sasol Symposium on Wildlife Rehabilitation, Onderstepoort*, 27-28.
- William, J. F. (2001). Veterinary Parasitology reference manual. *Blackwell Ed (UK)*.
- Williams, B. A., Kay, R. F., & Kirk, E. C. (2010). New perspectives on anthropoid origins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(11), 4797–4804.

- Williamson, R. M., Beveridge, I., & Gasser, R. B. (1998). Coprological methods for the diagnosis of *Anoplocephala perfoliata* infection of the horse. *Australian Veterinary Journal*, 76(9), 618–621.
- Wilson, D. E., & Reeder, D. (2005). Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference. *Johns Hopkins University Press Ed (USA)*, 152-167.
- Wimberger, K., Downs, C. T., & Perrin, M. R. (2010). Postrelease success of two rehabilitated vervet monkey (*Chlorocebus aethiops*) troops in KwaZulu-Natal, South Africa. *Folia Primatologica*, 81(2), 96–108.
- Wolf, D., Vrhovec, M., Failing, K., Rossier, C., Hermosilla, C., & Pantchev, N. (2014). Diagnosis of gastrointestinal parasites in reptiles: comparison of two coprological methods. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 56(1), 44.
- Wolfe-Coote, S. (2005). The laboratory primate. *ScienceDirect Ed (USA)*. 3-11; 29-43; 175-179; 405- 411; 579- 587.
- Wolfheim, J. H. (1983). Primates of the World: Distribution. *Routledge Ed (UK)*.
- Wong, M. M., & Conrad, H. D. (1978). Prevalence of metazoan parasite infections in five species of Asian macaques. *Laboratory Animal Science*, 28(4), 412–416.
- Wrangham, R. W., & Waterman, P. G. (1981). Feeding Behaviour of Vervet Monkeys on *Acacia tortilis* and *Acacia xanthophloea*: With Special Reference to Reproductive Strategies and Tannin Production. *The Journal of Animal Ecology*, 50(3), 715.
- Ye, X. P., Donnelly, C. A., Anderson, R. M., Fu, Y. L., & Agnew, A. (1998). The distribution of *Schistosoma japonicum* eggs in faeces and the effect of stirring faecal specimens. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 92(2), 181–185.
- Young, K. H., Bullock, S. L., Melvin, D. M., & Spruill, C. L. (1979). Ethyl acetate as a substitute for diethyl ether in the formalin-ether sedimentation technique. *Journal of Clinical Microbiology*, 10(6), 852–853.
- Zajac, A. M., & Conboy, G. A. (2012). Veterinary clinical parasitology. *Blackwell Ed (UK)*, 4-12, 178-185.
- Zanzani, S. A., Gazzonis, A. L., Epis, S., & Manfredi, M. T. (2015). Study of the gastrointestinal parasitic fauna of captive non-human primates (*Macaca fascicularis*). *Parasitology Research*, 115(1), 1–6.
- Zanzani, S., Epis, S., Bandi, C., & Manfredi, M. T. (2014). What is your diagnosis? Fecal smear stained with Lugol's solution and Giemsa from a cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*) presenting with liquid diarrhea. *Veterinary Clinical Pathology*, 43(2), 293–294.

Zihlman, A. L., & Underwood, C. E. (2013). Locomotor Anatomy and Behavior of Patas Monkeys (*Erythrocebus patas*) with Comparison to Vervet Monkeys (*Cercopithecus aethiops*). *Anatomy Research International*, 2013(2), ID 409534.

Zinner, D., Peláez, F., & Torkler, F. (2002). Distribution and habitat of grivet monkeys (*Cercopithecus aethiops aethiops*) in eastern and central Eritrea. *African Journal of Ecology*, 40(2), 151–158.

8. Comunicaciones a congresos

Resumen de la comunicación presentada al 29ème Colloque de la Société Francophone de Primatologie.

Comparaison de deux méthodes de diagnostic par sédimentation des parasitoses digestives chez le vervet (*Chlorocebus pygerythrus*).

Ana Navarro-Serra, Héctor Sanz-Cabañes, Marilena Garijo-Toledo, Jesús Cardells-Peris.

Sur le terrain ou en laboratoire, l'examen parasitologique des selles porte sur la mise en évidence de parasites présents dans l'appareil digestif. La majorité des techniques sont testées et standardisées en laboratoire avec le contrôle rigoureux de certaines variables. La réplication des mêmes procédés sur le terrain devient souvent impossible et les chercheurs sont obligés de réaliser quelques modifications et créent de nouvelles méthodes. Mais, déterminer si les différentes méthodes de diagnostic utilisées entre scientifiques sont équivalentes est devenu un enjeu majeur

différentes entre ces techniques.

Les possibilités de reproduire l'analyse des selles sur le terrain sont aussi limitées par (1) la compétence du personnel, il faut au moins une personne avec des connaissances théoriques et techniques pour pouvoir réaliser et identifier les parasites. (2) l'équipement et les réactifs disponibles. Il est donc possible et même nécessaire de sortir les expérimentations du laboratoire et de les tester sur le terrain avant de généraliser les résultats obtenus. L'objectif de ce travail est de comparer les sensibilités de deux méthodes de diagnostic coproparasitologique de concentration par sédimentation et de contribuer à l'amélioration du diagnostic sur le terrain. Pour cela, nous avons choisi une méthode de référence, la sédimentation formol-acétate d'éthyle et le kit commercial Uranotest copro®. La technique de référence nécessite un accès à l'électricité, d'une centrifugeuse et de réactifs toxiques. Pour la deuxième technique le matériel fourni avec le kit commercial et un microscope suffisent mais, elle n'a pas été utilisée pour le diagnostic des parasites chez les primates. Nous proposons d'étudier cette question en réalisons des expériences sur le terrain, avec des singes vervets hébergés en semi-liberté au sanctuaire Vervet Monkey Foundation (Afrique du Sud) qui devraient apporter la rigueur du laboratoire. Pendant les mois de juillet et août de 2015, nous avons recueillies un échantillon de selles fraîches, de 41 *Chlorocebus pygerythrus*. Tous les échantillons ont été examinés par les deux méthodes à comparer. De plus, nous avons conservé Uranotest copro® à température ambiante et reproduit l'expérience à 10 jours et à 20 jours d'intervalle. Nous avons utilisé un microscope avec un micromètre oculaire pour mesurer les éléments parasitaires observés et réalisé un examen systématique de la préparation avec l'objectif 10X et 40X pour dépistage et identification des organismes. Nos résultats montrent d'une part que la sédimentation Uranotest copro® relève une sensibilité égale ou supérieure que la sédimentation de référence pour la détection des infections par *Balantidium coli*, *Strongyloides* sp. et *Protospirura muricola* et inférieur pour strongles. Sa valeur prédictive négative est très bonne pour *Strongyloides* sp. (78%) et *Protospirura muricola* (100%) et elle est moyenne pour *B. coli* (56%) et strongles (50%). D'autre part, ils démontrent que l'efficacité de Uranotest copro® est la même si nous réalisons l'examen le jour 0 (jour de défécation) ou sur des selles conservées 10 ou 20 jours à température ambiante.