



# ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA  
AGRICULTURA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL  
TÍTULO DE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

**TEMA:**

**Caracterización molecular de *Giardia* sp. y análisis de transmisión de otros  
parásitos gastrointestinales mediante el uso de redes sociales en *Cebus  
albifrons*.**

**AUTORA: CHÁVEZ PACHECO, ANDREA JANINE**

**DIRECTOR: MARTIN SOLANO, SARAH, Ph.D.**

**SANGOLQUÍ**

**2019**



# ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

## CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “**Caracterización molecular de *Giardia* sp. y análisis de transmisión de otros parásitos gastrointestinales mediante el uso de redes sociales en *Cebus albifrons***” fue realizado por la señorita **Chávez Pacheco, Andrea Janine** el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 19 de febrero del 2019

Una firma manuscrita en tinta azul que parece decir 'Sarah Martin-Solano'.

---

**Sarah Martin-Solano, Ph.D.**  
DIRECTORA  
C.C: 1727221721



# ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

## AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, **Chávez Pacheco, Andrea Janine** declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación “**Caracterización molecular de *Giardia* sp. y análisis de transmisión de otros parásitos gastrointestinales mediante el uso de redes sociales en *Cebus albifrons***” es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Consecuentemente el contenido de la investigación mencionada es veraz.

Sangolquí, 19 de febrero del 2019

Una firma manuscrita en tinta azul que parece decir 'Andrea Janine Chávez Pacheco'.

**Andrea Janine Chávez Pacheco**

AUTORA

C.C: 1723263081



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**AUTORIZACIÓN**

Yo, **Chávez Pacheco, Andrea Janine** autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: “*Caracterización molecular de Giardia sp. y análisis de transmisión de otros parásitos gastrointestinales mediante el uso de redes sociales en Cebus albifrons*”, en el Repositorio Institucional a partir de diciembre de 2019, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

**Sangolquí, 19 de febrero de 2019**

A handwritten signature in blue ink, which appears to read 'Andrea Janine Chávez Pacheco', is written over a horizontal line.

**Andrea Janine Chávez Pacheco**  
AUTORA  
C.C: 1723263081



# ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

## EXCEPCIÓN DE AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo, **Chávez Pacheco, Andrea Janine** autora del trabajo de titulación “**Caracterización molecular de *Giardia* sp. y análisis de transmisión de otros parásitos gastrointestinales mediante el uso de redes sociales en *Cebus albifrons***” remito mi solicitud que fue presentada al señor Tern. Víctor Villavicencio Álvarez Vicerrector de Docencia de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, en la que consta la autorización para la no publicación temporal hasta diciembre del 2019, en el Repositorio Institucional del trabajo de titulación antes mencionado, razón por la cual se publicará únicamente los datos bibliográficos y el resumen.

Sangolquí, 19 de febrero 2019

Una firma manuscrita en tinta azul que parece decir 'Andrea Janine'.

---

**Andrea Janine Chávez Pacheco**  
AUTORA  
C.C: 1723263081

## DEDICATORIA

Con todo mi cariño y amor para mi familia por motivarme e impulsarme en mi formación profesional y personal día a día.

A todas mis amigas, por haber compartido conmigo los años de formación universitaria y brindarme siempre su apoyo, confianza y cariño.

A los docentes y personas que brindaron su conocimiento para la elaboración de esta tesis.

Andrea

“Lo que haces marca la diferencia, y tienes que decidir qué tipo de diferencia es la que quieres hacer”.

Jane Goodall

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE por ofrecerme los recursos para formarme como una profesional, por los docentes y personas que me permitió conocer, así como las experiencias que permitió formar durante el transcurso de mi carrera.

A mi asesora de tesis Sarah Martin-Solano Ph.D. por motivarme e impulsarme a desarrollar esta investigación, y por brindarme la oportunidad de trabajar dentro del campo de la conservación y compartirme su conocimiento.

Al Instituto de Investigación en Salud Pública y Zoonosis - CIZ, por disponer del uso de sus instalaciones y al personal que me brindó su apoyo durante parte de este trabajo, en especial a Elizabeth Minda, y Gustavo Echeverría por su guianza y aporte de ideas durante el desarrollo de este trabajo.

## TABLA DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN.....	i
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD.....	ii
AUTORIZACIÓN.....	iii
EXCEPCIÓN DE AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN.....	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTOS.....	vi
TABLA DE CONTENIDOS.....	vii
LISTADO DE TABLAS.....	ix
LISTADO DE FIGURAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
<b>CAPÍTULO 1- INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1. Formulación del Problema.....	1
1.2. Justificación.....	4
1.3. Objetivos.....	5
<b>CAPÍTULO 2 - MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>6</b>
2.1. Mono capuchino de frente blanca <i>Cebus albifrons</i> .....	6
2.2. Análisis de redes sociales en epidemiología.....	9
2.3. Giardiasis.....	11
2.4. Identificación de <i>Giardia</i> sp. en Primates no Humanos.....	18
<b>CAPITULO 3- METODOLOGÍA.....</b>	<b>22</b>
3.1. Revisión bibliográfica.....	22
3.2. Descripción del grupo de estudio.....	22



3.3. Datos de comportamiento.....	22
3.4. Recoleccion de muestras fecales.....	23
3.5. Redes de contacto y proximidad.....	24
3.6. Parasitismo.....	24
3.7. Identificación molecular de <i>Giardia</i> sp.....	25
3.8. Análisis filogenético.....	29
3.9. Análisis estadístico.....	29
<b>CAPITULO 4- RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>
4.1. Parasitismo.....	31
4.2. Redes sociales y Parasitismo.....	35
4.3. Identificación molecular de <i>Giardia</i> sp.....	40
4.4. Análisis filogenético.....	42
<b>CAPITULO 5- DISCUSIÓN.....</b>	<b>46</b>
5.1. Parasitismo.....	46
5.2. Redes sociales y parasitismo.....	49
5.3. Análisis molecular de <i>Giardia</i> sp.....	51
<b>CAPÍTULO 6 - CONCLUSIONES.....</b>	<b>56</b>
<b>CAPÍTULO 7 - RECOMENDACIONES.....</b>	<b>57</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>58</b>

## LISTADO DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> <i>Especies reconocidas del género Giardia</i> .....	13
<b>Tabla 2.</b> <i>Genotipos de Giardia sp. con sus hospederos</i> .....	14
<b>Tabla 3.</b> <i>Estudios de Giardia sp. en especies de PNH del nuevo mundo</i> .....	21
<b>Tabla 4.</b> <i>Matriz sociométrica</i> .....	24
<b>Tabla 5.</b> <i>Distribución de Cebus albifrons durante los años de muestreo</i> .....	25
<b>Tabla 6.</b> <i>Cebadores empleados para la caracterización molecular de Giardia sp</i> .....	28
<b>Tabla 7.</b> <i>Datos de parasitismo en la población de Cebus albifrons</i> .....	35
<b>Tabla 8.</b> <i>Parámetros de la red de contacto obtenido con el software Gephi</i> .....	36
<b>Tabla 9.</b> <i>Muestras positivas para Giardia sp</i> .....	40

## LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Acicalamiento entre primates.....	7
<b>Figura 2</b> Diagrama de una red social de primates.....	10
<b>Figura 3</b> Esquema de las características morfológicas de <i>Giardia duodenalis</i> .....	13
<b>Figura 4</b> Ciclo de Vida de <i>Giardia duodenalis</i> en un hospedero humano.....	16
<b>Figura 5</b> Principales ciclos de transmisión de <i>Giardia</i> sp.....	17
<b>Figura 6</b> Parásitos gastrointestinales hallados en <i>Cebus albifrons</i> de Misahuallí.....	31
<b>Figura 7</b> Prevalencia de <i>Hymenolepis</i> sp. y <i>Strongyloides</i> sp. agrupados por sexo y edad en los diferentes años de estudio.....	34
<b>Figura 8</b> Sociogramas de la población de <i>Cebus albifrons</i> estudiada.....	37
<b>Figura 9</b> Redes de contactos agrupadas bajo diferentes criterios.....	39
<b>Figura 10</b> Prevalencia de infección por <i>Giardia</i> sp. durante los años de estudio.....	42
<b>Figura 11</b> Dendogramas de <i>Giardia</i> sp. basadas en secuencias de nucleótidos del gene triosa fosfato isomerasa.....	44
<b>Figura 12</b> Dendogramas de <i>Giardia</i> sp. basadas en secuencias de nucleótidos del gen glutamato deshidrogenasa.....	45



## LISTA DE ABREVIATURAS

**ADN**= Ácido desoxiribonucleico

**BLAST** = *Basic Local Alignment Search Tool*

**Pb** = Pares de bases

**CP**= Control Positivo

**CN**= Control Negativo

**dNTPs** = Desoxiribonucleótidos trifosfato

**N** = tamaño de la población

**ng** = nanogramos

**uL** = micro Litros

**PBS**= Buffer fosfato salino

**PCR**= Reacción de cadena de polimerasa

**PCRn**= Reacción de la cadena polimerasa anidada

**PVPP**= polivinilpirrolidona

**r<sub>s</sub>**= Rho de Spearman

**r** = Correlación de Pearson

**rpm**= revoluciones por minuto

**sp.** = Especie

**spp.**= Especies

**Taq**= *Thermus aquaticus*

**UV**= Luz ultra violeta

**µm**= micras

## RESUMEN

Los primates no humanos (PNH) son especies que viven en grupos sociales, desarrollando interacciones que podrían facilitar la transmisión de patógenos. Para explicar la relación entre las actividades sociales y la transmisión de parásitos gastrointestinales puede emplearse el enfoque del análisis de redes sociales (ARS). Por otra parte, la identificación molecular de *Giardia* sp. en PNH provee información epidemiológica de la infección en áreas endémicas. Durante marzo del 2017, se tomaron 144 horas de observación de comportamientos en un grupo de 9 individuos de *Cebus albifrons* de la localidad de Misahualli. Al mismo tiempo, se colectaron tres fecas por individuo las cuales fueron conservadas para análisis coprológicos. Para la identificación molecular de *Giardia* sp. se colectaron 48 muestras durante tres diferentes períodos (2012, 2017 y 2018). Se identificaron dos parásitos gastrointestinales: *Strongyloides* sp. e *Hymenolepis* sp. y mediante, el Análisis de Redes Sociales, se estableció una relación entre la riqueza de parásitos y los individuos más centrales. Además se encontró que *Strongyloides* sp. fue el único parásito que se transmitió efectivamente dentro de toda la red. La prevalencia de *Giardia* sp. fue de 61.2 % y todos los aislados provenientes de la población de *Cebus albifrons* fueron identificados como genotipo B. La población de vida libre de *Cebus albifrons* de Misahuallí presenta parásitos como nemátodos, céstodos y protozoarios y se requiere de un plan de manejo para evitar la antropozoonosis y una posible transmisión zoonótica.

### Palabras clave:

- ANÁLISIS DE REDES SOCIALES.
- *Cebus albifrons*.
- *Giardia* sp.

## ABSTRACT

Non-human primates (NHP) are species that live in social groups, performing several interactions that could enable pathogen transmission. The social network analysis (SNA) approach can be employed in order to explain the relationship between social activities and the transmission of gastrointestinal parasites. Otherwise, the molecular identification of *Giardia* sp. in NHP provides epidemiological information of infection in endemic areas. During March 2017, we collected a total of 144 hours of observation and three fecal samples per individual, for coprological analyzes of 9 individuals of *Cebus albifrons*. For the molecular identification of *Giardia* sp. We collected 48 fecal samples during three different periods (2012, 2017, 2018). We identified two gastrointestinal parasites: *Strongyloides* sp. and *Hymenolepis* sp. Through SNA, we established a relationship between the richness of parasites and the most central individuals and *Strongyloides* sp. transmitted effectively within the social network. Moreover, the average prevalence of *Giardia* sp. during the years of the study, was 61.2 %; and all the isolates obtained were identified as genotype B. *Cebus albifrons* from Misahualli are parasited with nematodes, cestodes and protozoans and require control measures to protect their health and avoid a possible zoonotic transmission.

***Keywords:***

- **SOCIAL NETWORK ANALYSIS**
- *Cebus albifrons*.
- *Giardia* sp.

# CAPÍTULO 1- INTRODUCCIÓN

## 1.1. Formulación del Problema

Los primates no humanos (PNH) son especies que viven y forragean en grupos variables compuestos por individuos de ambos sexos y varias edades (Kappeler & van Schaik, 2002). Este estilo de vida garantiza beneficios, entre los que se destacan el acceso a comida, así como el evitar a los depredadores (Van Schaik, 1983; Wrangham, 1980). Sin embargo, el costo de vivir en grupo hace que la transmisión de ciertos parásitos se incremente debido al contacto entre individuos (Altizer et al., 2003). Por ejemplo, el acicalamiento es una actividad social (Henazi & Barrett, 1999), en la cual los primates remueven suciedad, insectos, parásitos de otro individuo (Saunders & Hausfater, 1988). Si bien esta actividad ha demostrado disminuir ectoparásitos (Akinyi et al., 2013), podría incrementar la transmisión de nemátodos u otros parásitos gastrointestinales (Duboscq, Romano, Sueur, & MacIntosh, 2016; Rimbach et al., 2015).

Para examinar la transferencia de parásitos dentro de un contexto social, es necesario la aplicación de modelos que relacionen estos dos aspectos (Godfrey, 2013; Rushmore, Bisanzio, & Gillespie, 2017; White, Forester, & Craft, 2017). El análisis de redes sociales (ARS), es una herramienta que ha sido aplicada para explicar comportamientos sociales y dinámicas grupales en primates desde los años 70 (Hinde, 1976; Kummer, 1968) pero en los últimos años, se ha empleado para explicar la relación parásito-primate considerando el contexto social (Godfrey, 2013; Rushmore et al., 2017). El ARS se ha aplicado también en otras especies como leones (Craft, Volz, Packer, & Meyers, 2010), lagartos (Godfrey, Moore, Nelson, & Bull, 2010), mapaches (Hirsch, Prange, Hauver, & Gehrt, 2013) puesto que facilita describir la relación de los patrones de contacto para inferir posibles rutas de transmisión de



patógenos y proveer información sobre su dispersión en una población (Rushmore et al., 2017; White et al., 2017). Se debe mencionar que el análisis de la transmisión de micro parásitos ha recibido poca atención, pero debido al desarrollo de herramientas moleculares se percibe como un área prometedora de estudio (Rushmore et al., 2017).

La influencia de las actividades antrópicas ha intensificado el riesgo de que determinados agentes patógenos como parásitos gastrointestinales: *Oesophagostomum* sp. (Cibot et al., 2015) *Ancylostoma* sp., *Strongyloides* sp. (Hussain, Ram, Kumar, Shivaji, & Umapathy, 2013), *Ascaris lumbricoides* (Mafuyai, Barshep, Audu, Kumbak, & Ojobe, 2013); hemoparásitos: *Plasmodium* sp. (Faust & Dobson, 2015; Springer, Fichtel, Calvignac-Spencer, Leendertz, & Kappeler, 2015) o virus: fiebre amarilla (Almeida et al., 2014), ébola (Leroy et al., 2004) puedan transmitirse entre especies de PNH y seres humanos, debido a su estrecha relación filogenética (Daszak, Cunningham, & Hyatt, 2001). Por lo que el conocimiento sobre enfermedades infecciosas y parasitarias que los primates puedan portar a manera de reservorios zoonóticos, pueden tener impacto en la salud humana y la conservación de las especies (Akinyi et al., 2013; Soares et al., 2011; Volotão, Júnior, Grassini, Peralta, & Fernandes, 2008).

En Ecuador, pocos estudios han señalado la intensidad y riqueza de los parásitos hallados en primates de vida libre así como en cautiverio (Helenbrook, Wade, Shields, Stehman, & Whipps, 2015; Martin-Solano et al., 2017). En cautiverio, se ha analizado por medio de análisis de redes sociales, la influencia del tamaño de las jaulas y el comportamiento en la diversidad e intensidad parasitaria de chorongos (*Lagothrix lagotricha*) (Martin-Solano et al., 2013). Sin embargo, en vida libre, no ha sido analizada la influencia del contexto social y el número de interacciones heterogéneo que poseen los individuos dentro de una red y los niveles de parasitismo.

Los PNH neotropicales generalmente son infectados por distintos tipos de parásitos gastrointestinales, entre los que se encuentran nemátodos: *Trichostrongylidae*, *Oxyuridae*, *Strongyloidae*, *Ancylostomatidae*, *Ascarididae* y *Gnathostomatidae* (Rondón et al., 2017); céstodos como *Hymenolepididae* (Martin-Solano et al., 2017); tremátodos (Rondón et al., 2017; Vitazkova & Wade, 2006); y protozoarios como *Entamoeba* sp., *Giardia* sp. (Verweij et al., 2003; Vitazkova & Wade, 2006), y *Balantiidae* (Rondón et al., 2017). El estudio de parásitos en primatología, es de importancia debido a los efectos que puede causar en la demografía de las poblaciones y comportamiento (Solórzano-García & Pérez-Ponce de León, 2018). *Giardia* sp. es un ejemplar ideal de un parásito zoonótico, ya que puede ser encontrado en vida silvestre como resultado de las actividades humanas (Thompson, 2013). *Giardia* sp. ha sido un parásito encontrado en PNH de vida libre (Johnston et al., 2009; Kowalewski et al., 2010) como en cautiverio (Beck et al., 2011; Levecke, Dorny, Geurden, Vercammen, & Vercruyse, 2007; Volotão et al., 2008; Ye et al., 2013; Zhong et al., 2017). Este protozoario fue inicialmente descrito por van Leeuwenhoek en 1681, y hace más de 30 años se listó como una zoonosis por la *World Health Organization* (WHO), debido a observaciones que indicaban que campistas habían sido infectados al beber agua contaminada con heces fecales de castores (Thompson, 2004; Thompson, Kutz, & Smith, 2009). Actualmente, es el parásito intestinal más reportado en el mundo, con aproximadamente 280 millones de personas sufriendo de infecciones sintomáticas cada año (Upcroft & Upcroft, 2001; WHO, 1996).

Este protozoario, tiene una variedad amplia de hospederos pero *G. duodenalis* (*syn. Giardia intestinales*; *Giardia lamblia*) es la única especie que se encuentra tanto en humanos, como en animales domésticos y en varias especies de mamíferos silvestres (Thompson & Monis, 2011). El desarrollo de técnicas moleculares ha permitido agrupar los genotipos de *Giardia* sp. que infecta mamíferos de acuerdo al hospedero (Feng & Xiao, 2011), y de esta manera se

ha logrado reportar genotipos zoonóticos (A y B) en primates no humanos (PNH) que viven en proximidad a personas y animales domésticos (Berrilli et al., 2011; Teichroeb, Kutz, Parkar, Thompson, & Sicotte, 2009). Sin embargo, en Ecuador los estudios de la diversidad genética de *Giardia* sp. y el establecimiento de reservorios zoonóticos son escasos (Atherton et al., 2013; Sarzosa, Graham, Salinda, & Trueba, 2018). No existe ningún tipo de investigación en el país, sobre la diversidad genética de este protozooario, en grupos de primates de vida libre o en cautiverio y su relación con la salud pública.

## **1.2. Justificación**

El estudio del estado de las poblaciones de primates en el Ecuador, es necesario para desarrollar herramientas y acciones de conservación. Los estudios en la región Amazónica se han enfocado en una variedad de aspectos que incluyen ecología y comportamiento (de la Torre, 2010, 2012), mientras que los estudios sobre parasitismo en vida silvestre o en cautiverio son escasos (de la Torre, 2012; Helenbrook et al., 2015). El grupo de monos capuchinos (*Cebus albifrons*) que habitan libremente en el Puerto Fluvial de Misahuallí, se presenta como un modelo de interés, para analizar la influencia del contexto social con el nivel de parasitismo, mediante la aplicación de modelos estadísticos como el ARS y técnicas moleculares para inferir rutas de infección en un ambiente perturbado por la presencia humana.

La aplicación de modelos estadísticos como el ARS, provee una manera económica y ética de evaluar que tipo de variables son los más influyentes en la transmisión de enfermedades parasitarias y qué intervenciones podrían ser las más efectivas (Godfrey, Moore, Nelson, & Bull, 2010; Lloyd-Smith et al., 2009; Thompson et al., 2009). Por su parte, la aplicación de técnicas moleculares, permite efectuar diagnósticos mediante la amplificación selectiva de

ADN parasítico presente en heces fecales, facilitando la evaluación de la salud de los primates sin utilizar métodos invasivos (Chapman, Gillespie, & Goldberg, 2005). Además el análisis de la diversidad genética de *Giardia* sp. aportará al entendimiento de la epidemiología molecular de la giardiasis en áreas endémicas.

Esta investigación resalta la importancia de una fuente coproparasitológica de primates en medio antrópico, con la finalidad de diseñar medidas preventivas y de seguridad para precautelar el bienestar de los PNH y las personas que entren en contacto (David et al., 2014; Zanzani, Gazzonis, Epis, & Manfredi, 2016).

### **1.3. Objetivos**

#### **1.3.1. Objetivo general del proyecto**

Caracterizar molecularmente *Giardia* sp. y analizar la transmisión de otros parásitos gastrointestinales mediante el uso de redes sociales en *Cebus albifrons*.

#### **1.3.2. Objetivos específicos**

- Estimar la relación entre la intensidad de la infección parasitaria con el grado interacción entre individuos dentro de una red social, su edad y sexo.
- Establecer la prevalencia e incidencia de *Giardia* sp. en el grupo de vida silvestre en medio antrópico de la Amazonía Ecuatoriana.
- Identificar las posibles fuente de infección por *Giardia* sp. en primates no humanos, mediante la genotipificación.

## CAPÍTULO 2 - MARCO TEÓRICO

### 2.1. Mono capuchino de frente blanca *Cebus albifrons*

#### 2.1.1. Distribución

Los capuchinos de frente blanca (*Cebus albifrons*) son una especie del Nuevo Mundo, se encuentra al noroeste de América del Sur, incluyendo los territorios de Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú y Brasil (Hill, 1960). En Ecuador, se encuentra en la Costa, la Amazonía y estribaciones de los Andes (Tirira, 2007a). La población de esta especie en el occidente del territorio ecuatoriano corresponde a la subespecie *Cebus albifrons aequatoriales* (Tirira, 2007a) mientras que la poblaciones al oriente de los Andes corresponde a la subespecie *Cebus albifrons cuscinus* (de la Torre, 2010, 2012).

#### 2.1.2. Descripción

*Cebus albifrons* es una de las especies de primates más pequeñas del género *Cebus* llegando a medir entre 75 a 93 cm, con un rango de peso que varía entre 1 100 a 3 300 g (Hill, 1960). Ambos sexos presentan un patrón de coloración complejo, exhibiendo un color pardo oscuro en la espalda que se vuelve claro a medida que avanza a la zona ventral (Tirira, 2007b). La esperanza de vida de estos individuos llega a los 44 años en cautiverio (Hakeem, Sandoval, Jones, & Allman, 1996).

#### 2.1.3. Patrones de comportamiento

Esta especie es altamente sociable, establece grupos de entre 15 a 35 miembros, liderados por una pareja dominante (Smuts, Cheney, Seyfarth, Wrang-ham, & Struhsaker, 1987). Las actividades de *Cebus albifrons* comprenden en su mayoría forrajeo junto con movimiento, y el tiempo restante se emplea para descansar y socializar (Matthews, 2009; Terborgh, 1983). *Cebus albifrons* son onmívoros, pero se alimentan principalmente de frutas, y además de pequeños invertebrados (Chinchilla, Guerrero, Gutierrez-Espeleta, Sánchez, & Valerio Campos, 2007; Matthews, 2009; Terborgh, 1983).



*Figura 1* Acicalamiento entre primates. Hembra adulta (izq) acicalando a un individuo juvenil de *Cebus albifrons*, en Misahuallí-Tena.

#### **2.1.4. Situación actual**

La Lista Roja UICN, indica que el estado de *Cebus albifrons* es de preocupación menor (de la Torre, Morales, Link, & Cornejo, 2015); sin embargo, la subespecie de la costa *Cebus albifrons* aequatoriales está considerada en Peligro Crítico (Cornejo & de la Torre, 2015). En contraparte, la población de la amazonía (*Cebus albifrons cuscinus*) se considera estable (Tirira, 2007a) y se encuentra categorizado como Casi Amenazado en el Libro Rojo de los

Mamíferos del Ecuador, y listada en el Apéndice II de CITES (Convention on the International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora). Sin embargo, a mediano plazo puede ser considerada una especie amenazada debido a la presión de la cacería y comercialización, por lo que su conservación debe ser tomada en cuenta (de la Torre, Arcos, Pozo, Zapata Ríos, & Tirira, 2011).

### **2.1.5. Parásitos gastrointestinales en capuchinos (*Cebus* spp.)**

Los estudios sobre la riqueza intestinal, y los efectos sobre la salud y comportamiento de monos capuchinos (*Cebus* spp.) son escasos (Rondón et al., 2017). Las infecciones gastrointestinales son comunes en monos capuchinos (*Cebus* spp.) (Chinchilla et al., 2007), presumiblemente debido a la dieta omnívora que poseen (Rondón et al., 2017). Estudios han reportado en grupos de vida libre de *Cebus capucinus* en Costa Rica, una variedad de parásitos entre los que se incluyen *Strongyloides* sp., *Filariopsis* sp., *Giardia duodenalis*, *Prosthenorchis* sp. (Chinchilla et al., 2007; Parr, Fedigan, & Kutz, 2013). En *Cebus versicolor*, de vida libre en un hábitat fragmentado de Colombia, se reportó nemátodos: *Trichuridae*, *Trichostrongylidae*, *Oxyuridae*, *Strongyloididae*, *Ancylostomatidae*, *Ascarididae*, protozoarios: *Entamoeba*; huevos de tremátodos, céstodos y acantocéfalos (Rondón et al., 2017). En *Cebus albifrons* de vida libre en la Amazonía ecuatoriana, se identificó *Strongyloides* sp., *Hymenolepis* sp., *Capillaria* sp. (Martin-Solano et al., 2017). En otro grupo de *Cebus albifrons* de vida libre en Perú, se encontró *Strongyloides* sp. *Endolimax* sp., *Chilomastix* (Phillips, Haas, Grafton, & Yrivarren, 2004).

En la revisión sobre parásitos en PNH neotropicales realizada por Solorzano-García (2018), además de los señalados anteriormente, se señala que en *Cebus albifrons* se ha encontrado: *Entamoeba* sp. *Isospora cebi*, *Plasmodium brasilianum*, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzii*, *T. lambrechtii*, *T. minansense*, *T. rangeli*; acantocefalos:

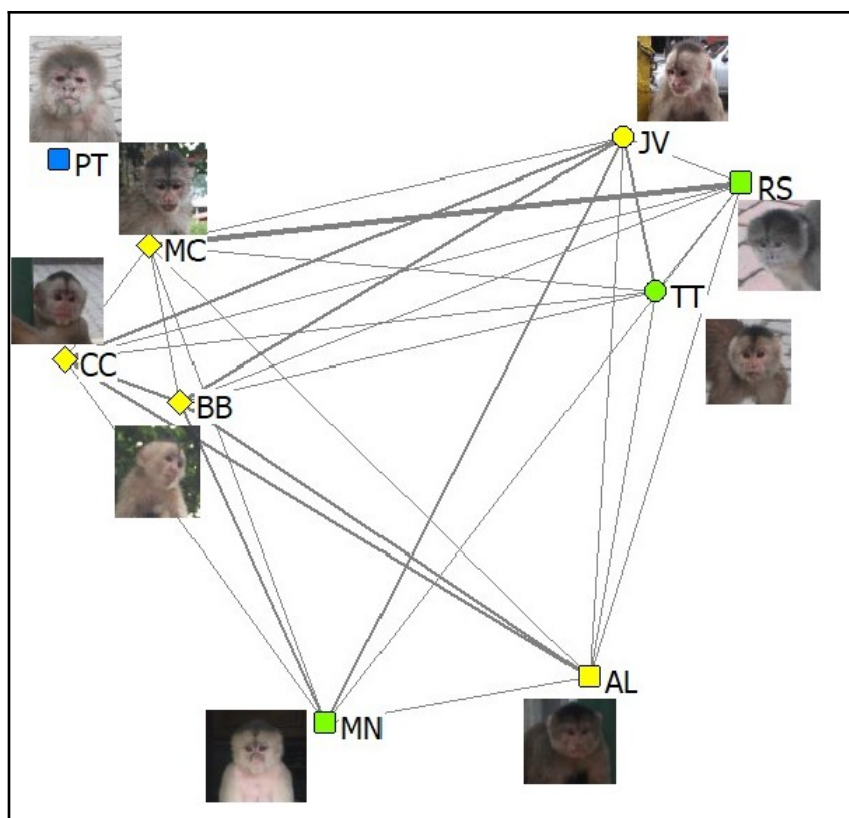
*Prosthenorchis elegans*; Nemátodos: *Dipetalonema obtusa*, *Trypanoxyuris clementinae* y Acariformes.



## 2.2. Análisis de redes sociales en epidemiología

El análisis de redes sociales (ARS) es una herramienta para estudiar las interacciones sociales o biológicas, basándose en modelos matemáticos para cuantificarlas y visualizarlas (Wasserman & Faust, 1994). En el campo de las enfermedades infecciosas y parasitarias, las redes de contacto son una herramienta útil para responder preguntas sobre ecología (Barber & Dingemans, 2010), comportamiento animal (Henazi & Barrett, 1999) y transmisión de patógenos en vida silvestre (Rushmore, Bisanzio, & Gillespie, 2017; White, Forester, & Craft, 2017). Pueden predecir a nivel individual, el riesgo de infección o exposición mientras que a un nivel de población pueden reflejar la dinámica de las epidemias (Rimbach, Bisanzio et al. 2015; White, Forester et al. 2017).

Las redes de epidemiología están compuestas por **nodos** (individuos) interconectados por **enlaces** (contactos) que pueden permitir la transmisión de parásitos (Ver Figura.2 ) (White et al., 2017). Se debe mencionar, que un contacto efectivo, será cualquier interacción que pueda permitir la transmisión de un agente infeccioso entre un par de individuos dependiendo de factores como el estilo de vida del hospedero y el ciclo de vida del patógeno (Godfrey, 2013; White et al., 2017). Por ejemplo, un contacto efectivo para la transmisión del ébola puede ser una proximidad espacial de 5 m, debido a que el virus puede transmitirse por aerosoles (Rushmore et al., 2013), mientras que para la transferencia de parásitos gastrointestinales, un contacto efectivo puede ser el acicalamiento o cualquier contacto directo (MacIntosh et al., 2012).



**Figura 2** Diagrama de una red social de primates. Cada nodo (cuadrado) representa a un individuo diferente, mientras que las líneas indican la ausencia o presencia de interacciones.

Para describir la posición de un individuo en la red, se emplea un conjunto de medidas de centralidad, que permite determinar la centralidad del individuo y que tan importante es su rol en la transmisión de agentes infecciosos (Godfrey, 2013; Romano et al., 2016). Se sugiere que mientras más céntrica sea la posición del sujeto, su rol en la transmisión de patógenos es mayor (Gómez, Nunn, & Verdú, 2013; Rimbach et al., 2015). Entre las medidas locales de centralidad se encuentran: 1) **Centralidad de grado** (*degree*) número de individuos asociados a un nodo dentro de una red (MacIntosh et al., 2012) mientras que la suma de las interacciones se llama **Fuerza del nodo** (Romano et al., 2016). 2) **Centralidad de interconexión** (*betweenness*) que permite identificar individuos que actúen como intermediarios, conectando a otros individuos y cumpliendo un rol en la dispersión de parásitos (Farine & Whitehead, 2015; Friant, Ziegler, & Goldberg, 2016; Gómez et al., 2013;

Rushmore et al., 2017). Se define como el número de caminos mínimos que conectan a cualquier par de nodos (Romano et al., 2016); cuando el índice está al mínimo indica que los individuos están conectados del mismo modo (Rimbach et al., 2015). 3) **Centralidad de cercanía** (*closeness*) definido como el camino más corto para alcanzar a todos los individuos de una red desde un individuo (White et al., 2017), esta medida se puede emplear para identificar que tan bien conectados están los centros sociales, para que los parásitos se distribuyan dentro de la red (Rushmore et al., 2017; Silk et al., 2017). Un nivel elevado de cercanía en un individuo, indica que conecta con todos (White et al., 2017). 4) **Centralidad de vector propio** (*eigenvector*), este valor se basa en que la centralidad de un individuo depende de que tan centrales sean sus vecinos (MacIntosh et al., 2012; Romano et al., 2016).

Otro parámetro empleado para describir la composición de la red o a nivel individual, es el **Coefficiente de agrupamiento** (*clustering coefficient*), que indica como los vecinos de un individuo están directamente conectados el uno al otro (Brent, Lehmann, & Ramos-Fernández, 2011).

## 2.3. Giardiasis

### 2.3.1. Generalidades

*Giardia* sp. es un protozooario flagelado, que fue inicialmente descrito por van Leeuwenhoek en 1681 (Adam, 2001). Tiene una amplia variedad de hospederos (Thompson & Monis, 2011) y está distribuido globalmente (Feng & Xiao, 2011) causando 280 millones de infecciones por año (WHO, 1996). Se ha listado por la *World Health Organization* (WHO) dentro la Iniciativa de Enfermedades Desatendidas desde el 2004, debido al impacto socioeconómico en personas infectadas principalmente en países en desarrollo (Savioli, Smith, & Thompson, 2006). En estos países, la prevalencia de la enfermedad es elevada (Feng & Xiao, 2011) debido a factores como la contaminación fecal del suelo o de la comida, poco

acceso a agua potable, falta de salubridad y condiciones socioeconómicas vulnerables (Sánchez et al., 2017; Savioli et al., 2006).

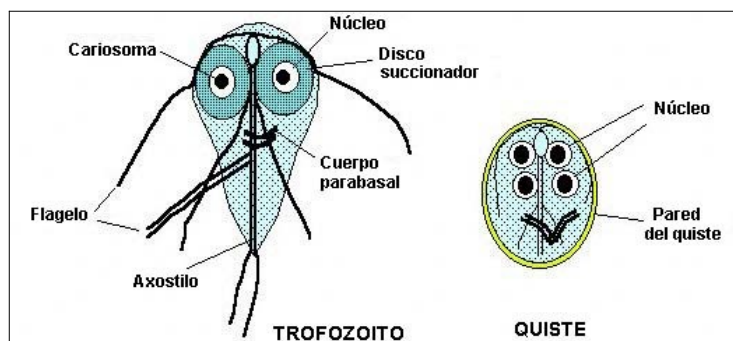
En Ecuador la prevalencia de la infección es de aproximadamente 20% (adultos y niños) en comunidades rurales (Atherton et al., 2013; Rinne, Rodas, Galer-Unti, Glickman, & Glickman, 2005). Se ha sugerido que los animales domésticos infectados (e.g. perros, codornices, cerdos) pueden jugar un rol en la transmisión de *Giardia* en comunidades semi-rurales ecuatorianas (Sarzosa, 2018), sin embargo hasta la fecha no existen datos sobre el rol de la fauna silvestre.

Las manifestaciones clínicas en seres humanos son las más conocidas (Thompson & Monis, 2004) pudiendo presentarse desde cuadros asintomáticos a diarreas agudas, deshidratación, dolor abdominal, náusea y pérdida de peso (Adam, 2001; Feng & Xiao, 2011). En PNH se ha relacionado la infección con la presencia de diarreas y afecta principalmente a animales jóvenes (Kramer, Hachey, Wachtman, & Mansfield, 2009). La severidad del cuadro, dependerá del estado nutricional e inmunológico del hospedero y la virulencia del parásito (Robertson, Hanevik, Escobedo, Mørch, & Langeland, 2010).

### **2.3.2. Características morfológicas**

*Giardia* se presenta como un trofozoito, mótil de simetría bilateral, con forma de pera o elipsoidal, con una superficie dorsal convexa y un disco adhesivo en la superficie ventral (Adam, 2001). Presenta dos núcleos, con cuatro pares de flagelos (Thompson, 2004). El quiste, está cubierto por una pared de 0.3 a 0.5 mm formada por polímeros de N-acetil galactosamina (Luján, Mowatt, & Nash, 1997), que le permite a sobrevivir fuera del hospedero y resistir las condiciones ambientales (Adamska, Leońska-Duniec, Maciejewska, Sawczuk, & Skotarczak, 2010). Contiene cuatro o dos núcleos, dos axonemas (estructura

contráctil interna de los flagelos) cercanos al núcleo y fragmentos del disco adhesivo (Adam, 2001).



**Figura 3** Esquema de las características morfológicas de *Giardia duodenalis*. A) Trofozoito; B) Quiste. Fuente: (Cordero, Oliver, Martínez, & Alamillo, 2014)

### 2.3.3. Taxonomía de *Giardia* sp.

La taxonomía de *Giardia* sp. ha sido ampliamente discutida, debido a los diferentes criterios que pueden emplearse para su clasificación (e.g. especificidad del hospedero, características morfológicas o variaciones moleculares) (Adam, 2001). El criterio más aceptado es el de Filice (1952), que emplea únicamente las características morfológicas para definir las especies presentadas en la Tabla 1; basadas en la forma del trofozoito y los cuerpos medios, así como el tamaño.

**Tabla 1.**

*Especies reconocidas del género Giardia.*

Especies	Hospedero	Características Morfológicas
<i>G. duodenalis</i>	Mamíferos silvestres, domésticos, humanos	Trofozoitos piriformes con cuerpos medianos en forma de garra.
<i>G. agilis</i>	Anfibios	Trofozoitos largos y estrechos con cuerpos medianos en forma de bastón.
<i>G. muris</i>	Roedores	Trofozoitos redondeados con pequeños cuerpos medianos redondos.
<i>G. ardeae</i>	Pájaros	Trofozoitos redondeados, con prominente muesca

		en el disco ventral.
<b><i>G. psittaci</i></b>	Pájaros	Trofozoite en forma de pera.

Fuente: (Thompson & Monis, 2011)

*Giardia duodenalis* (referida también como *Giardia intestinalis* o *Giardia lamblia*) es la única especie encontrada en humanos, en animales domésticos y especies de mamíferos silvestres (Thompson & Monis, 2011). La aplicación de técnicas moleculares ha permitido demostrar los diversos niveles de diversidad genética de *Giardia* sp. en mamíferos facilitando el entendimiento de la patógenesis y permitir establecer siete genotipos (A-G) presentes de acuerdo al hospederos (Adam, 2001; Cacciò & Ryan, 2008). Los genotipos A y B han sido detectados principalmente en seres humanos, pero también se ha reportado en animales domésticos (Ballweber, Xiao, Bowman, Kahn, & Cama, 2010; van Keulen et al., 2002) y especies silvestres incluidos NHP (Berrilli et al., 2011; Karim et al., 2014; Levecke et al., 2009) por lo que se consideran como zoonóticos (Ryan & Cacciò, 2013). Los genotipos C y D se encuentran principalmente en perros (McDowall et al., 2011), el genotipo E en ganado (Abdel-Moein & Saeed, 2016; Wang et al., 2014); mientras el genotipo F en gatos (Vasilopoulos, Rickard, Mackin, Pharr, & Huston, 2008) y el G en ratas (Lebbad et al., 2010).

**Tabla 2.**

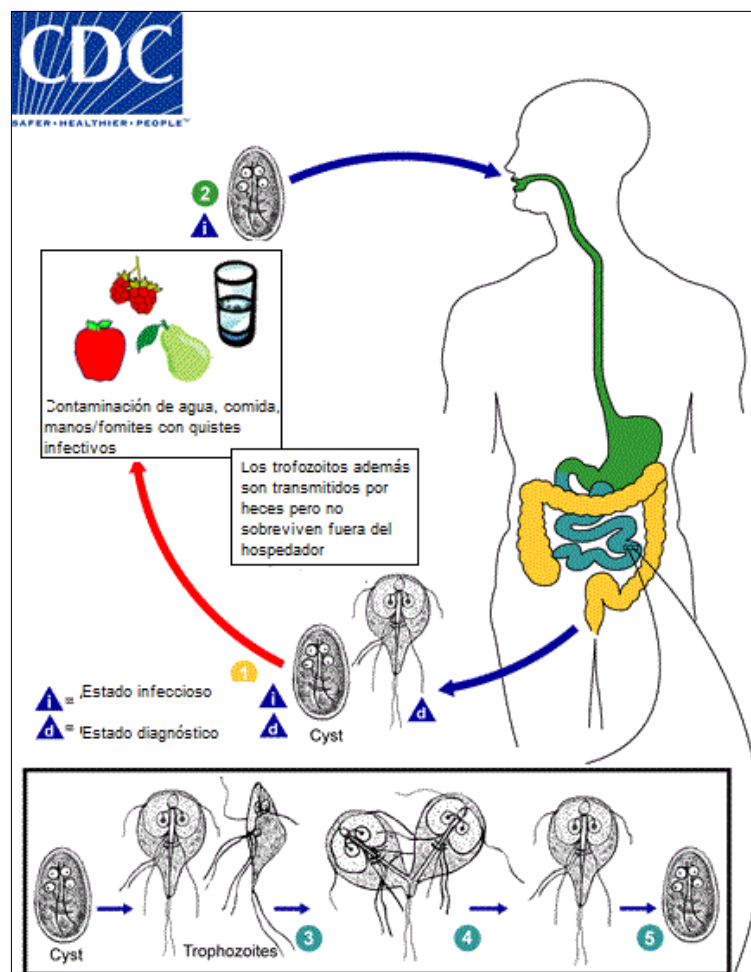
*Genotipos de Giardia sp. con sus hospederos*

<b>Genotipo</b>	<b>Hospederos Reportados</b>	<b>Nuevo Nombre</b>
<b>Zoonótico/A</b>	Humanos, PNH, animales domésticos y silvestres	<i>G. duodenalis</i>
<b>Zoonótico/B</b>	Humanos PNH, animales silvestres	<i>G. entérica</i>
<b>C,D</b>	Perros	<i>G. canis</i>
<b>E</b>	Ganado, cerdos	<i>G. bovis</i>
<b>F</b>	Gatos	<i>G. cati</i>
<b>G</b>	Rata doméstica	<i>G. simondi</i>

Fuente: (Thompson & Ash, 2016)

#### 2.3.4. Ciclo de Vida

Las especies de *Giardia* presentan dos fases en su ciclo de vida. La infección en el hospedero inicia por la ingestión de los quistes indirectamente a través de agua o comida o directamente en ambientes contaminados (Graczyk et al., 2003; Kasprzak & Pawlowski, 1989). En el caso de primates, la infección puede además originarse por comportamientos como la coprofagia e interacciones sociales (e.g. acicalamiento) con individuos infectados (Adam, 2001; Graczyk et al., 2002; MacIntosh et al., 2012; Thompson, 2004). Cuando los quistes llegan al estómago debido al ambiente ácido, estos liberan los trofozoitos en un proceso denominado exquistación y empiezan la colonización del intestino causando síntomas de diarrea y pobre absorción de nutrientes. Los trofozoitos vegetativos que se encuentran en el colón empiezan un proceso de enquistación debido al estímulo de los líquidos biliares, es decir, se transforman en quistes que serán expulsados junto con las heces para infectar un nuevo hospedero (ver Figura. 4) (Adam, 2001; CDC, 2016).



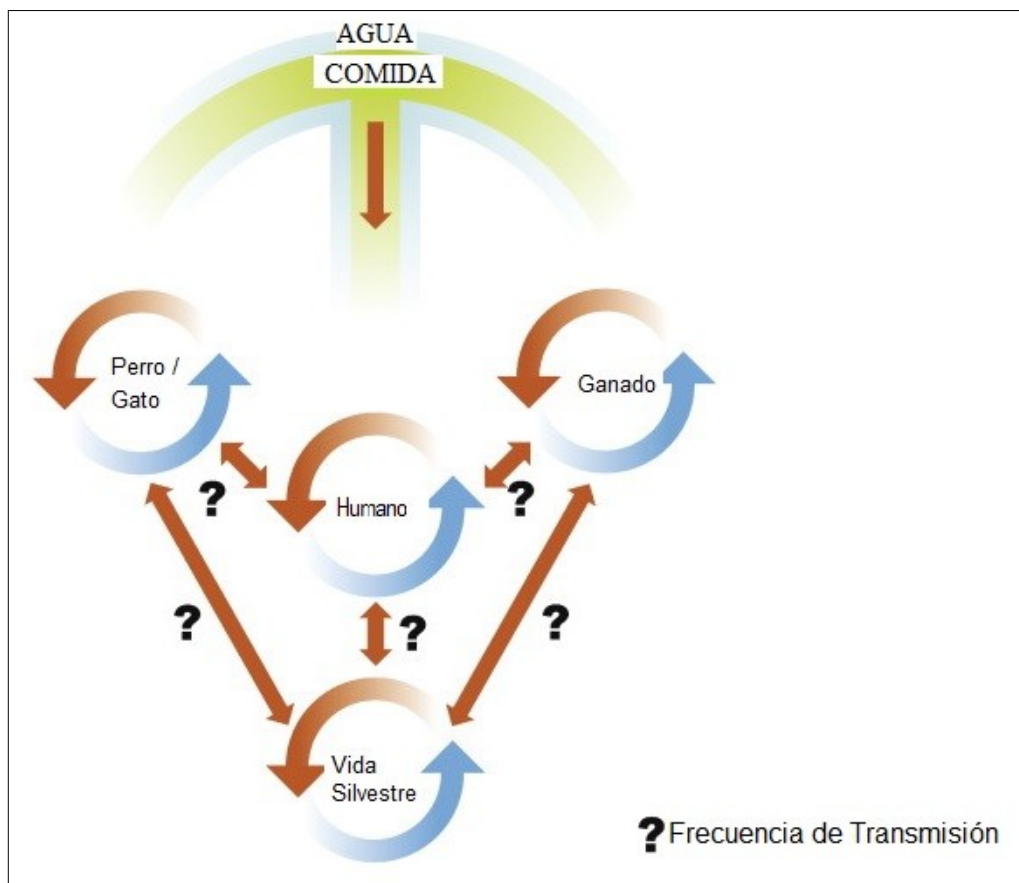
**Figura 4** Ciclo de Vida de *Giardia duodenalis* en un hospedero humano. (1) Diagnóstico de quistes infecciosos en heces; (2) Ingesta de quistes en agua o alimento; (3) Liberación de los trofozoitos en el tracto intestinal; (4) Los trofozoitos se multiplican por fisión binaria y colonizan el intestino; (5) Enquistación y liberación de los quistes en las heces. Fuente: (CDC, 2016)

### 2.3.5. Ciclo de Transmisión

El flujo de parásitos se ve facilitado por el aumento de interacciones entre humanos, mascotas y vida silvestre en determinados ambientes (Thompson, 2004; Thompson et al., 2009). Los análisis moleculares de *Giardia* sp. han permitido demostrar lo ampliamente distribuida que se encuentra, ya sea en animales de compañía como perros y gatos (McDowall et al., 2011), ganado (Abdel-Moein & Saeed, 2016), así como cuerpos de agua (Adamska,



2015; Durigan, Abreu, Zucchi, Franco, & de Souza, 2014). A medida que aumenta la presencia humana, aumenta de igual forma el riesgo para especies de vida silvestre que pueden infectarse directamente o indirectamente con este parásito ubicuo (ver Figura 5).



**Figura 5** Principales ciclos de transmisión de *Giardia* sp.. Algunas especies son específicas del hospedero mientras que otras son capaces de transmitirse entre especies (zoonóticas). Las frecuencias de transmisión entre especies son desconocidas, e incrementa por los quistes presentes en el ambiente. Fuente: (Thompson & Ash, 2016).

Para especies silvestres como los PNH, estudios moleculares sugieren que el origen de infección por *Giardia* sp. es antroponóico (Daszak, Cunningham, & Hyatt, 2001; Johnston et al., 2009; Teichroeb, Kutz, Parkar, Thompson, & Sicotte, 2009; Thompson, Kutz, & Smith, 2009); y que las actividades humanas repercuten directamente en la intensidad de la

infección por *Giardia* sp. en PNH (Graczyk et al., 2002; Hogan et al., 2014; Johnston et al., 2009).

## **2.4. Identificación de *Giardia* sp. en Primates no Humanos**

### **2.4.1. Microscopía**

Para el diagnóstico de *Giardia* sp. el método estándar es la concentración de quistes y trofozoitos, mediante la técnica fórmol-éter (FE) seguida de observación directa al microscopio (Dryden, Payne, & Smith, 2006). Es una prueba de bajo costo, sin embargo, requiere de experiencia del observador y resulta poco sensible e inespecífica comparada con otros métodos como inmunofluorescencia y la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Gotfred-Rasmussen, Lund, Enemark, Erlandsen, & Petersen, 2015). En zoológicos de Europa se han reportado las prevalencias en monos araña de cabeza negra (*Ateles fusciceps*) (45%) capuchinos (*Cebus* spp.) (5%), tití pigmeno (*Cebuella pigmea*) (20 %) (Levecke et al., 2007). En Costa Rica, en monos aulladores de manto (*Alouatta palliata*) (3.4- 65 %) (Chinchilla, Guerrero, Gutiérrez- Espeleta, Sánchez, & Rodríguez Ortiz, 2005). En cautiverio en Colombia en atélidos (12.7 %) (Fajardo-Sanchez et al., 2014). En otros primates neotropicales que *Giardia* sp. ha sido encontrada pero no se determinó prevalencias incluyen: capuchinos (*Cebus apella*), sakí cariblanco (*Pithecia pithecia*) (Gómez et al., 1996; Verweij et al., 2003); tití rojizo (*Callicebus cupreus*), tamarino algodonoso (*Saguinus oedipus*), tití de cabeza blanca (*Callithrix geoffroyi*), y chorongos (*Lagothrix lagotricha*) (Verweij et al., 2003).

### **2.4.2. Reacción de la Cadena Polimerasa anidada (PCRn)**

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue desarrollada en los años 80 por Kary Mullis (Mullis, 1990). Es un procedimiento que permite sintetizar fragmentos

específicos de ADN, empleando una polimerasa. Empieza por la desnaturalización de la doble hélice de ADN. Posteriormente al ADN desnaturalizado, se adhieren dos oligonucleótidos específicos complementarios que limitan la secuencia de interés y se sintetiza una nueva cadena de ADN. Luego se vuelve a desnaturalizar el ADN recién formado y da origen a otro ciclo de síntesis.

La PCR anidada, es una modificación de la PCR diseñada para aumentar la *especificidad* (determinar correctamente individuos sanos) y *sensibilidad* (determinar correctamente individuos infectados) (Baratloo, Hosseini, Negida, & El Ashal, 2015; Haff, 1994). En este método, se emplea dos pares de cebadores: el primer par limita una región conteniendo el amplicón de interés, mientras que el segundo corresponde al fragmento preciso que necesita ser amplificado (Haff, 1994).

La PCR se usa principalmente para identificar genotipos y especies de *Giardia* sp., en estudios taxonómicos y de epidemiología (Debenham, Tysnes, Khunger, & Robertson, 2017; Soares et al., 2011). La reacción anidada se emplea debido a que incrementa la cantidad inicial de ADN (Abdel-Moein & Saeed, 2016; Asher, Waldron, & Power, 2011; Baque, Gilliam, Robles, Jakubowski, & Slifko, 2011). Dentro del conjunto de genes que ha sido generalmente empleado para estudios de filogenética y genotipificación de *Giardia* sp. se incluyen: triosa fosfato isomerasa (*tpi*) (Sulaiman et al., 2003), subunidad ribosomal RNA pequeña (*SSU rDNA*) (Abe, Makino, & Kojima, 2012; Cacció, Beck, Lalle, Marinculic, & Pozio, 2008), beta-giardina (*bg*) (Cacciò, De Giacomo, & Pozio, 2002), y glutamato deshidrogenasa (*gdh*) (Cacció et al., 2008).

*Giardia* sp. es un parásito comúnmente caracterizado mediante técnicas moleculares en PNH en especies del Viejo Mundo de vida libre, como chimpancés (*Pan troglodytes*) (Debenham, Atencia, Midtgaard, & Robertson, 2015), gorilas (*Gorilla beringei beringei*,

*Gorilla gorilla gorilla* ) (Nolan et al., 2017; Sak et al., 2014; Sak et al., 2013), macacos (*Macaca mulata*; *Macaca fascicularis*) (Debenham et al., 2017; Sricharern et al., 2016); y en especies en cautiverio incluyendo mandriles (*Mandrillus sphinx*), gibones (*Nomascus leucogenys*), orangutanes (*Pongo pygmaeus*), loris (*Nycticebus coucang*), lémures (*Lemur catta*), cercopitecos (*Cercopithecus roloway*, *Cercopithecus diana*), babuinos (*Papio hamadryas*, *Papio cynocephalus*) (Karim et al., 2014; Levecke et al., 2009; Zhong et al., 2017). Por otra parte, son pocos los estudios para comparar la diversidad de las secuencias genéticas de *Giardia sp.* que infecta especies de PNH en localidades sur americanas (Soares et al., 2011). En la Tabla 3, se recopilan los estudios y genotipos hallados en especies del Nuevo Mundo, la mayoría efectuadas en cautiverio.

ESTADO	LOCALIDAD	LOCUS ANALIZADO	ESPECIES	GENOTIPO		REFERENCIA
				A	B	
Cautiverio	Brasil	<i>gdh</i> y <i>SSU-rRNA</i>	<i>Alouatta fusca</i>		x	(Soares et al., 2011)
Vida Libre	Belice y México	<i>tpi</i> y <i>SSU-rDNA</i> .	<i>Alouatta pigra</i> <sup>a</sup>	x	x	(Vitazkova & Wade, 2006)
Cautiverio	Brasil	<i>bg</i> .	<i>Alouatta clamitans</i>	x		(Volotão et al., 2008)
Cautiverio	Beijing y Shangai	<i>SSU rRNA</i> , <i>tpi</i> y <i>bg</i> . (MLS)	<i>Saimiri sp.</i>		x	(Karim et al., 2015)
Cautiverio	Brasil	<i>gdh</i> y <i>tpi</i> .	<i>Alouatta caraya</i>	x		(David et al., 2014)
			<i>Alouatta fusca</i>		x	
			<i>Alouatta seniculus</i>		x	
			<i>Ateles belzebuth</i>		x	
Cautiverio	Suecia	<i>bg</i> , <i>gdh</i> , <i>tpi</i> y <i>SS rNA</i> .	<i>Callithrix pigmea</i>		x	(Lebbad et al., 2010)
			<i>Saguinus oedipus</i>		x	
Cautiverio	Bélgica	<i>gdh</i> , <i>tpi</i> y <i>bg</i> .	<i>Saimiri boliviensis</i>	x	x	(Levecke et al., 2009)
			<i>Ateles fusciceps</i>	x	x	
			<i>Alouatta caraya</i>	x	x	
			<i>Lagothrix lagothricha</i>	x		
			<i>Saimiri sciureus</i>	x	x	

**Tabla 3**

*Estudios moleculares de Giardia sp. en especies de PNH del Nuevo Mundo.*

<sup>a</sup>No se encontró infección mixta

## CAPITULO 3- METODOLOGÍA

### 3.1. Revisión bibliográfica

Para la revisión se empleó la base de datos PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) y fueron agregadas de forma manual, ciertas publicaciones en bases de datos alternas. La revisión sistemática, se realizó empleando las siguientes palabras clave: "*social network analysis*", "*disease transmission in NHP*", "*Giardia genotyping*". Una vez obtenidos los resultados, se descartaron los artículos de acuerdo al siguiente criterio: 1) Artículos duplicados 2) Idioma diferente al español o inglés, 3) Ausencia de relación con la investigación realizada.

### 3.2. Descripción del grupo de estudio

El grupo de primates estudiado, corresponde a la población de *Cebus albifrons*, que habita en el Puerto Fluvial de Misahuallí, (Tena, Napo) (1° 2' 7.0" S, 77° 39' 59.4" W) y están en contacto frecuente con visitantes que los alimentan, y mascotas (e.g. perros, gatos). Durante el período de muestreo de datos comportamentales (2017), la precipitación media fue de 0,53 mm, la humedad relativa del aire de 93.64 % y la temperatura promedio de 22,84 °C registrados por el Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología en la Estación Tena Chaupishungo.

### 3.3. Datos de comportamiento

Los datos de comportamiento fueron tomados por dos observadores durante el mes de Marzo del 2017. Los datos recopilados se basaron en un etograma y abarcan 144 h de observación, que fueron tomados durante el seguimiento diario al grupo de vida libre en horario de 07:00 a 19:00 durante doce días. Las observaciones focales fueron de 20 min, se

registró cada que fuese posible el contacto con otros individuos y/o proximidad menor a 2 m. Se recopilaron aproximadamente 20 focales de cada individuo durante el período de estudio.

### **3.4. Recoleccion de muestras fecales**

Las muestras fecales empleadas en el presente estudio, pertenecen al Proyecto Carga Parasitaria de Primates Humanos y No Humanos de la Amazonía Ecuatoriana. Se emplearon muestras almacenadas en formol al 10% y buffer fosfato-salino (PBS) para los análisis coprológicos y muestras almacenadas en etanol absoluto (96-100%) para los análisis moleculares.

Para la toma de fecas se identificó individualmente los primates para facilitar el muestreo serial. Durante cada muestreo del 2012, 2017 y 2018 se tomaron tres muestras fecales por animal en formol al 10% y PBS. Cada muestra fue tomada al menos con 24 horas de diferencia para incrementar la sensibilidad del diagnóstico según el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2005). Durante los diferentes períodos que se realizaron los muestreos, se tomó al menos una muestra de heces en etanol absoluto por individuo. Las muestras fueron tomadas inmediatamente después de efectuarse la defecación con la finalidad de evitar la contaminación con parásitos presentes en el medio (Chapman et al., 2012).

### 3.5. Redes de contacto y proximidad

Para cada focal, se cuantificó el número de contactos y los datos se introdujeron en una matriz sociométrica (Tabla 4). Consiste en una tabla de doble entrada, las celdas se llenan con el número de interacciones cuantificadas para el focal (eje vertical) hacia los otros individuos (eje horizontal). Del mismo modo se cuantificaron los eventos de proximidad menor a 2 m y se introdujeron en otra matriz ([ANEXO A](#)). Para obtener índices numéricos: grado del nodo, índice de cercanía, vector de centralidad propio, centralidad de interconexión, y coeficiente de agrupamiento; los datos de las matrices sociométricas fueron introducidos en el software de libre acceso GEPHI. Por último para la visualización de sociogramas fue empleado el software UCINET 6.

**Tabla 4**  
*Matriz sociométrica.*

	TT	PT	AL	MN	BB	RS	CC	JV	MC
TT	0	0	4	0	9	7	12	28	9
PT	0	0	0	0	0	0	0	0	0
AL	1	0	0	13	19	0	12	0	0
MN	0	0	11	0	30	13	10	0	0
BB	11	0	37	15	0	4	21	12	7
RS	0	0	1	9	11	0	1	2	77
CC	2	0	20	3	12	1	0	11	5
JV	17	0	9	19	25	0	38	0	7
MC	4	0	2	1	5	47	1	7	0

Nota: La intensidad de la coloración aumenta con la cantidad de interacciones.

### 3.6. Parasitismo

Las muestras tomadas del año 2017 y 2018 fueron analizadas y procesadas en el Instituto de Salud Pública y Zoonosis - CIZ, Universidad Central del Ecuador. Se procesó 1 gramo de muestra almacenada en formol al 10% más PBS, mediante el método de Ritchie. Se filtró 1 g de muestra a través de un cedazo y se colectó el filtrado en un frasco de orina estéril y se añadió 10 mL de agua destilada. Las soluciones se centrifugaron por 1 min a 426 g.



Posteriormente el sobrenadante fue descartado, y el sedimento suspendido en 5 ml de formol al 10%. Después, se añadió 1.5 ml de dietil éter y se agitó vigorosamente. La suspensión se centrifugó nuevamente durante 2 min a 239 g y se eliminó el sobrenadante. Para el análisis microscópico se tomó una gota del concentrado y se colocó en un portaobjetos. Una segunda gota fue colocada en otro portaobjetos y se tiñó con una gota de solución de Lugol para facilitar la detección de protozoarios. Los parásitos fueron identificados basándose en la forma del huevo, el tamaño y el contenido mediante una magnificación de 40X-100X haciendo uso del equipo Leica ICC50 E para documentar fotografías de los parásitos.

Para estimar la intensidad de la infección se empleó el número total de huevos contados por individuo durante las 6 observaciones (2 veces por muestra y 3 muestras por animal)

### 3.7. Identificación molecular de *Giardia* sp.

#### 3.7.1. Distribución muestras para análisis molecular

Un total de 48 muestras fecales fueron empleadas para los análisis moleculares. Las muestras corresponden a individuos de la misma población recolectadas en diferentes períodos de tiempo (Tabla 5).

**Tabla 5**

*Distribución de la población de Cebus albifrons durante los años de muestreo.*

Año	Sexo	Adulto	Subadulto	Juvenil	Individuos	Muestras /Individuo	Muestras
2012	F	2	0	1	15	1	15
	M	2	8	2			
2017	F	3	1	1	9	1	9
	M	1	1	2			
2018	F	3	2	0	8	3	24
	M	1	0	2			
<b>Total</b>							<b>48</b>

#### 3.7.2. Extracción de ADN

Para la extracción del material genético de los quistes de *Giardia* sp., se empleó el kit comercial QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) con las siguientes modificaciones:

Se colocó en un vial una suspensión de 600 uL de heces conservadas en etanol absoluto, (relación 1:3; 1 parte de heces fecales y 3 partes de etanol al 96-100%), se centrifugó a 5 min a 1300 rpm, el sobrenadante se eliminó y el pellet fue lavado con PBS. El proceso de lavado se repitió 3 veces. Por último el pellet fue resuspendido en 600 uL de 2% PVPP (polivinilpolipirrolidona)/PBS, y se incubó a -20°C durante la noche. Luego se procedió con los siguientes pasos:

1. Incubar a 100°C durante 10 min.
2. Centrifugar a 2 min a 13000 RPM.
3. Remover el sobrenadante y resuspender el pellet en 1 mL de buffer PBS. Lavar el pellet homogenizado vigorosamente (vortex) o hasta que la muestra se homogenice completamente.
4. Calentar durante 5 min a 70°C.
5. Vortexear continuamente por 15 s.
6. Centrifugar durante 1 min a 13000 RPM
7. Pipetear 20 uL de Proteinasa K en un nuevo vial de 1.5 mL.
8. Pipetear 500 uL de sobrenadante del paso 6 en el vial que contiene la proteinasa K. Homogenizar usando el vórtex.
9. Añadir 500 uL de QIAgen Buffer AL y homogenizar empleando el vortex durante 15s.
10. *Nota: No añadir directamente la proteinasa K al buffer AL.*
11. Incubar durante 15 min a 76°C.

12. Añadir 500 uL de etanol absoluto (96-100%) y homogenizar invirtiendo los tubos.

*Nota: La cantidad de lisado, de etanol y de Buffer AAL debe ser la misma.*

13. Colocar las columnas dentro de los tubos colectores, y añadir 600 uL del lisado del paso anterior. Cerrar la tapa y centrifugar por 1 min a 13000 RPM

14. Descartar el filtrado y añadir el lisado faltante a la columna. Cerrar la tapa y centrifugar por 1 min a 13000 RPM.

15. Añadir 500 uL del Buffer QIAgen AW1 y centrifugar 2 min a 13000 RPM.

16. Colocar la columna en un nuevo tubo colector y añadir 500 uL de QIAgen Buffer AW2. Centrifugar durante 3 min a 13000 RPM.

17. Colocar la columna en un nuevo tubo colector y centrifugar a dos minutos para remover residuos.

18. Transferir la columna a un vial de 1.5 mL y pipetear 50 uL del Buffer QIAgen.

19. Dejar incubar a temperatura ambiente durante 10 min.

20. Centrifugar durante 2 min.

21. Añadir 50 uL del Buffer QIAgen, dejar incubar 2 min.

22. Centrifugar durante 2 min, y el filtrado colocar en tubos de tapa rosca y almacenar a -20°C.

### **3.7.3. Reacción de la cadena polimerasa anidada**

Para la genotipificación de *Giardia* sp. se empleó los genes: triosa fosfatos isomerasa (*tpi*) y glutamato deshidrogenasa (*gdh*) con los protocolos señalados por Sulaiman et al, (2003) y Cacció & Beck, (2009) respectivamente (los pares de cebadores y sus características se muestran en la Tabla 6). Para el *tpi*, se empleó 1X de Green Buffer (Promega); 3 mM de MgCl<sub>2</sub> (25 mM); 200 uM de dnTPs; 200 uM de cada primer y 0.625 U de GoTaq Polimerasa (Promega). La reacción fue llevada durante 35 ciclos, (94°C durante 45s, 51°C durante 45 s y

72 °C durante 60 s) en el termociclador C1000 Touch™ Thermal Cycler (Biorad, USA), con un inicio de 94°C durante 5 min y una extensión final de 72°C durante 10 min. Para la segunda ronda de PCR se empleó el mismo programa, pero cambiando la temperatura de alineamiento a 55°C. Para la amplificación del *gdh* se empleó 0.05 uL de VersaTaq™ Direct PCR Polymerase (Affymetrix), 200 uM de dNTPs, 0.4 uM de cada cebador. La reacción fue llevada durante 35 ciclos, (94°C durante 30s, 64.5 °C durante 30 s y 72 °C durante 60 s) en LifeTouch Thermal Cycler (BIOER), con un inicio de 94°C durante 2 min y una extensión final de 72°C durante 7 min. Para la segunda ronda de PCR, se cambió la temperatura de alineamiento a 50°C.

**Tabla 6**

*Cebadores empleados para la caracterización molecular de Giardia sp..*

<b>Gene</b>	<b>Tamaño Producto (bp)</b>	<b>Cebadores</b>	<b>Temperatura Alineamiento</b>	<b>Referencia</b>
<i>tpi</i>	605	AL3543 <i>forward</i> 5'-AAA TIA TGC CTG CTC GTC G-3'	51	Sulaiman, (2003)
	530	AL3546 <i>reverse</i> 5'-CAA ACC TTT TCC GCA AAC C-3'		
		AL3544 <i>forward</i> 5'-CCC TTC ATC GGT GGT AAC TT-3'	55	
		AL3545 <i>reverse</i> 5'-GTG GCC ACC ACT CCC GTG CC-3'		
<i>gdh</i>	786	Ghd1 <i>forward</i> 5'-TTC CGT RTY CAG TAC AAC TC-3'	64.5	Cacció & Beck, (2008)
		Gdh2 <i>reverse</i> 5'-ACC TCG TTC TGR GTG		

---

	GCG CA-3'	
530	Gdh3 <i>forward</i> 5'-ATG ACY GAG CTY CAG AGG CAC GT-3'	50
	Gdh4 <i>reverse</i> 5'-GTG GCG CAR GGC ATG ATG CA-3'	

---

### 3.8. Análisis filogenético

Los productos de amplificación fueron secuenciados en ambas direcciones en Macrogen Inc. (Seoul, Korea). Las secuencias fueron corregidas manualmente y se establecieron secuencias consenso en Unipro UGENE. Las secuencias fueron alineadas con secuencias representativas para *Giardia* sp. tomadas de GenBank ([ANEXO B](#)) haciendo uso del algoritmo MUSCLE del software MEGA 6, se empleó secuencias relacionadas geográficamente y fueron comparadas con subtipos determinados por Wielinga & Thompson, (2007), debido a que las secuencias *Giardia* sp. provenientes de primates carecen de un sistema internacionalmente reconocido que facilite la clasificación de los subtipos de acuerdo a la similitud entre secuencias (Brynildsrud, Tysnes, Robertson, & Debenham, 2018). Con la finalidad de determinar genotipos y subtipos, se construyeron dos árboles filogenéticos para cada gen, con los métodos de deducción filogenética *Maximun Likelihood* (ML) y *Neighbour-joining* (NJ). Para el *tpi* el modelo que más se ajustó a los datos del alineamiento fue el K2 + G; mientras que para el *gdh* el T93 + G + I. En todos los casos el soporte estadístico para los nodos fue calculado mediante 1.000 replicados (*bootstrap*).

### 3.9. Análisis estadístico

Para el análisis de los resultados se empleó el software estadístico RStudio, (Version 1.1.456) con un valor de significancia alfa < 0.05 para las siguientes pruebas no paramétricas:

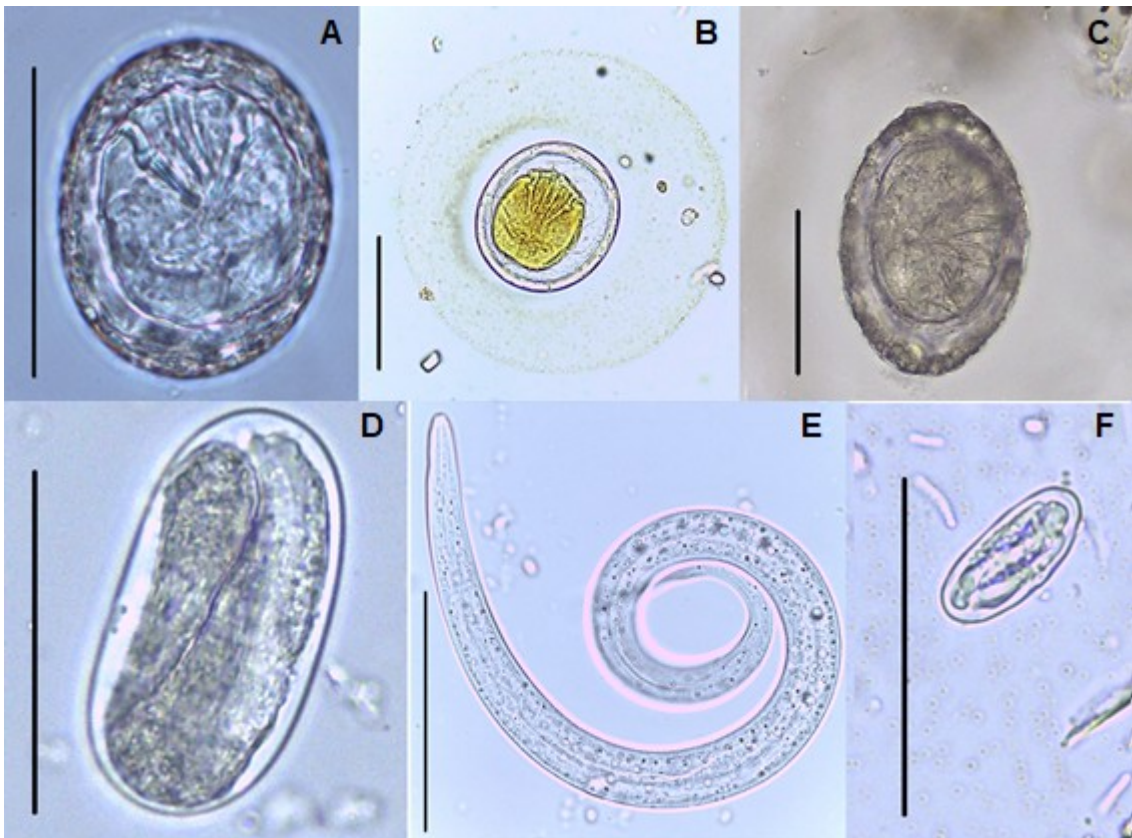
- Para determinar diferencias entre la prevalencia de cada parásitos (*Hymenolepis* sp., *Strongyloides* sp., *Giardia* sp.) por sexo, se empleó el test Fisher; mientras que para determinar las diferencias por edad se empleó Chi-cuadrado de Pearson.
- Para evaluar los efectos del muestreo serial se realizó la prueba Q de Cochran.
- Para determinar diferencias entre la riqueza de parásitos (número total de géneros de parásitos encontrados individuo) e intensidad de la infección (suma huevos y larvas cuantificadas en las muestras) por sexo se empleó el test de Mann-Whitney U; mientras que para determinar las diferencias por grupos de edad se empleó Kruskall-Wallace.
- Mann-Whitney U también se empleo para establecer diferencias entre los parámetros de la red de contacto con respecto al sexo y con respecto a la edad, Kruskall-Wallace. Para comparar los datos parasitismo entre 2017 y 2018, se empleo Mann-Whitney U para datos no pareados.
- Para determinar la relación entre los datos de parasitismo obtenidos durante el 2017: diversidad de parásitos e intensidad de la infección por *Strongyloides* sp. e *Hymenolepis* sp. con los coeficientes de centralidad obtenidos mediante el programa GEPHI, se realizó la correlación de Spearman.

## CAPITULO 4- RESULTADOS

### 4.1. Parasitismo

Durante los años 2017 y 2018, se encontraron dos tipos de huevos con embriones hexacantos, que se asignaron como *Hymenolepididae*. El tipo 1, (Figura 6 A, B) los huevos midieron  $52.73 \mu\text{M} \pm 1.30 \mu\text{M}$  por  $43.4 \mu\text{M} \pm 1.84 \mu\text{M}$ ; y el tipo 2 (Figura 6 C) los huevos midieron  $83.07 \mu\text{M} \pm 8.56 \mu\text{M}$  por  $59.9 \mu\text{M} \pm 1.52 \mu\text{M}$ . No se pudo identificar al céstodo más allá del género basados en el tamaño y morfología del huevo. También se identificaron huevos y larvas de *Strongyloides* sp. (Figura 6 D, E) los huevos midieron  $57.45 \mu\text{M} \pm 3.68 \mu\text{M}$  por  $33.21 \mu\text{M} \pm 3.05 \mu\text{M}$  y *Strongyloides* no identificados (Figura. 7F) con huevos que midieron  $25.39 \mu\text{M} \pm 0.22 \mu\text{M}$  por  $11.11 \mu\text{M} \pm 1.01 \mu\text{M}$ .

De los 9 individuos analizados el 2017, el 89% estaba infectado con al menos un parásito; mientras que para el 2018 la prevalencia ascendió al 100 % (Fisher test,  $p = 1.00$ ). Durante el 2017, 6 de 9 individuos (67 %) presentaron infecciones mixtas con al menos dos parásitos, mientras que en el 2018, 2 de 8 individuos (25 %) presentaron infecciones mixtas (Fisher test,  $p = 0.15$ ). No se presentaron cambios significativos entre 2017 y 2018 para la intensidad de la infección por *Hymenolepididae* (Wilcoxon test,  $W = 49$ ,  $p = 0.16$ ) o la infección por *Strongyloididae* (Wilcoxon test,  $W = 41.5$ ,  $p = 0.63$ ); el 2018 se registraron más helmintos, pero la diferencia no fue significativa comparada con el anterior año (Wilcoxon test,  $W = 44.00$ ,  $p = 0.42$ ).



**Figura 6** Parásitos gastrointestinales hallados en *Cebus albifrons* de Misahuallí. A y B) *Hymenolepis* sp. Tipo 1 C) *Hymenolepis* sp. Tipo 2. D) Huevo de *Strongyloides* sp. E) Larva de *Strongyloides* sp. y E) Huevo de *Strongyloides* no identificado. Barra = 50  $\mu$ M.

#### 4.1.1. Parasitismo 2017

Durante la examinación microscópica del 2017, se registró: *Strongyloides* sp., e *Hymenolepis* sp. (Tipo 1). La diversidad de parásitos fue superior en individuos machos que en hembras (M: 2, s.d. = 0; F: 1.0, s.d. = 0.71; Wilcoxon test,  $W = 2.00$ ;  $p = 0.04$ ); pero similar en los grupos de edad (Juveniles: 2, s.d. = 0; adultos: 1, s.d.= 0.82; subadultos: 1.5, s.d. = 0.7; Kruskal-Wallis,  $X^2 = 3.5$ ,  $p = 0.17$ ).

El 89% del grupo analizado presentó infección *Strongyloides* sp., la prevalencia no varió respecto al sexo (M: 4/4; F: 4/5; Fisher's test,  $p = 1.00$ ) o edad (Juveniles: 3/3; subadultos 2/2; adultos: 3/4; Chi-cuadrado de Pearson test,  $X^2 = 1.41$   $p = 0.50$ ). El promedio para la intensidad de la infección fue de 41.89 (s.d. = 69.98) y no se presentó diferencias por sexo



(M: 26.50, s.d = 18.70; F: 54.20, s.d = 95.43; Wilcoxon test,  $W = 8.00$ ;  $p = 0.71$ ) o edad (Juveniles: 12.33, s.d = 8.50; adultos: 23.50 s.d = 22.34; subadultos: 123 s.d. = 142,84; Kruskal-Wallis,  $X^2 = 2.27$ ;  $p = 0.32$ ).

Por otra parte el porcentaje de individuos infectados por *Hymenolepis* sp. (Tipo 1) fue del 56%, presentando mayor prevalencia los machos que las hembras (M: 4/4; F: 1/5; Fisher's test,  $p = 0.048$ ) (Figura 7). El valor promedio de la intensidad de la infección fue de 7.67 (s.d. = 9.95) y los machos presentaron mayor intensidad en la infección parasitaria (M: 17, s.d.= 7.39; F: 0.20, s.d. = 0.45; Wilcoxon test,  $W = 0.00$ ,  $p = 0.02$ ), y más diversidad de parásitos (M:2, s.d. = 0; F: 1, s.d. = 0.71; Wilcoxon test,  $W = 2.00$ ;  $p = 0.04$ ) que las hembras. En relación a los grupos de edad no hubo diferencias en la prevalencia (Juveniles: 3/3; subadultos: 1/2; adultos:1/4 ; Chi-cuadrado de Pearson test,  $X^2 = 3.94$ ,  $p = 0,14$ ) o intensidad (Juveniles: 9, s.d. = 9.85 ; subadultos: 11, s.d.= 15.56; adultos: 5, s.d. = 10; Kruskal-Wallis,  $X^2 = 1.68$  ,  $p = 0.43$ ).

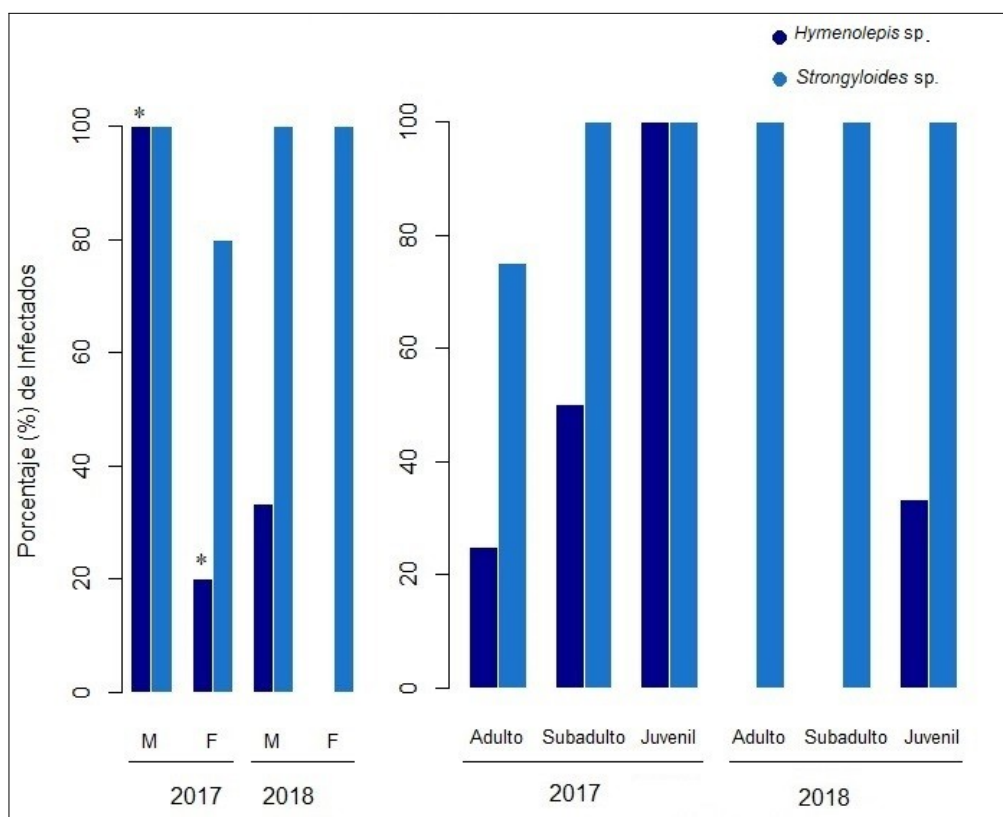
#### 4.1.2. Parasitismo 2018

La diversidad parásitos este año incluyó: *Strongyloides* sp., *Strongyloides* no identificados, *Hymenolepis* sp. Tipo 1 y Tipo 2. La diversidad de parásitos no presentó diferencias por sexo o edad (M: 1.67, s.d. = 1.15; H: 1.2, s.d = 0.45; Wilcoxon test,  $W = 6$ ,  $p = 0.70$ ; edad: Juveniles: 1.67, s.d = 1.16; subadultos: 2 s.d = n/a; adultos: 1, s.d. = 0; Kruskal-Wallis,  $X^2 = 3.14$ ,  $p = 0.20$ ).

La infección por *Strongyloides* sp. fue de 100%, tanto en machos como hembras (M: 3/3, F: 5/5) y en los grupos de edad (Juveniles: 3/3; subadultos: 1/1; adultos: 4/4). La intensidad de la infección promedio fue de 27 (larvas + huevos), (s.d.= 36.88) y no presentó variaciones respecto al sexo (M: 20.33, s.d.= 15.28; F: 31, s.d = 47.02; Wilcoxon test,  $W = 6.00$ ,  $p = 0.789$ ) o grupos de edad (Juveniles: 9.67, s.d = 6.43; subadultos: 114 s.d = n/a; adultos: 18.25

s.d. = 14.86; Kruskal-Wallis,  $X^2 = 2.72$ ;  $p = 0.26$ ). La infección por *Strongyloides* no identificados fue de 13 %, presentó únicamente en un individuo, una hembra subadulto.

Con respecto a la infección por *Hymenolepis sp.* la prevalencia fue de 13% tanto para el Tipo 1 como para el Tipo 2, el mismo individuo juvenil macho presentó estos dos céstodos. La infección por *Himenolepididae* no presentó diferencia por sexo (M: 1/3; F: 0/5; Fisher's test,  $p = 0.38$ ) o por grupos de edad (Juveniles: 1/3; subadultos: 0/1; adultos: 0/4; Chi-cuadrado de Pearson test,  $X^2 = 1.90$ ,  $p = 0.39$ ). La intensidad media de la infección por estos céstodos fue de 26.38 (s.d. = 74.60); sin presentarse diferencia al compararse por sexos (M: 70.33, s.d.= 0; H: 0, s.d. = 0; Wilcoxon test,  $W = 5.00$ ,  $p = 0.30$ ) o grupos de edad (Juveniles: 70.33, s.d = 121.82; subadultos: 0 s.d = n/a; adultos: 0 s.d. = 0; Kruskal-Wallis,  $X^2 = 1.67$ ,  $p = 0.44$ ).



**Figura 7** Prevalencia de *Hymenolepis sp.* y *Strongyloides sp.* agrupados por sexo y edad en los diferentes años de estudio.

**Tabla 7**  
*Datos de parasitismo en la población de Cebus albifrons.*

ID	R P	HLTF	2017		RP	HLTF	2018			
			HLCF	HC F			HLCF	HCF		
			<i>Strongyloides</i> sp.	<i>Hymenolepis</i> sp.			<i>Strongyloides</i> sp.	no identificados <i>Strongyloides</i>	<i>Hymenolepis</i> sp. (Tipo 1)	<i>Hymenolepis</i> sp. (Tipo 2)
TT	1	224	224	0	2	118	114	4	0	0
PT	0	0	0	0	1	20	20	0	0	0
AL	2	73	53	20	1	37	37	0	0	0
MN	1	26	26	0	1	15	15	0	0	0
BB	2	15	9	6	1	7	7	0	0	0
RS	1	15	15	0	1	1	1	0	0	0
CC	2	43	22	20	3	232	17	0	211	4
JU	2	54	22	22	-	-	-	-	-	-
MC	2	8	6	1	1	5	5	0	0	0

**RP:** Riqueza de Parásitos. **HLTF:** Huevos y larvas totales **HLStC:** Huevos y Larvas Contadas en la Feca. **HCF:** Huevos contados en la feca.

#### 4.2. Redes sociales y Parasitismo

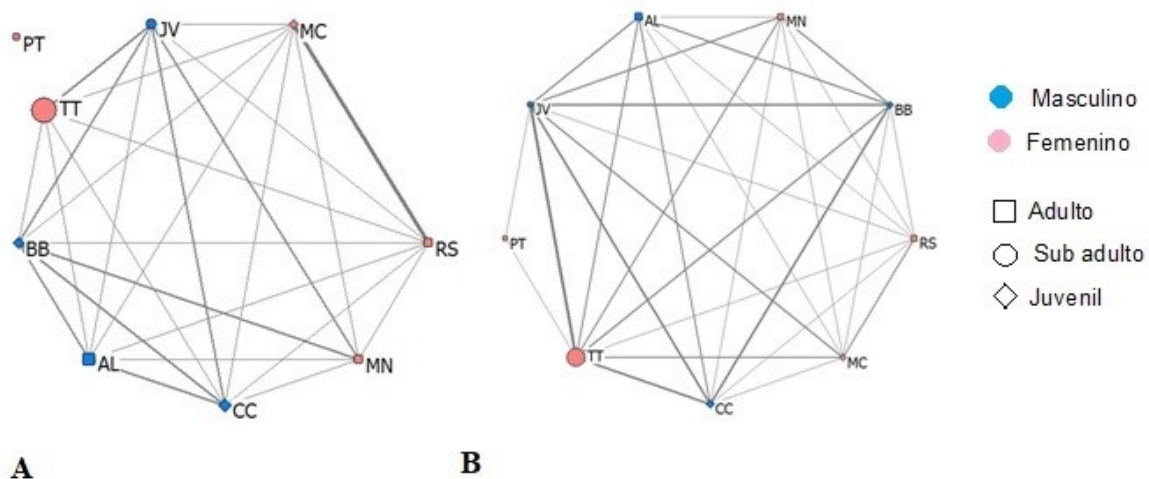
Las formas de contacto registradas incluyeron actividades de juego, agresiones, acicalamiento y reposo en contacto; los valores de las medidas de centralidad de la red de contacto se presentan en la Tabla 8. El promedio del **grado** fue 12.22 (s.d.= 4.02) sin diferencias entre los sexos (M: 14, s.d. = 1.63; F: 10.80, s.d. = 4.97; Wilcoxon test,  $W = 4.5$ ,  $p = 0.21$ ) o entre los grupos de edad (Adultos: 10.25, s.d. = 5.56; Subadultos: 12.50, s.d.= 0.71; Juveniles: 14.67, s.d. = 1.15; Kruskal-Wallis,  $X^2 = 4.5$ ,  $p = 0.11$ ). Con respecto a la **centralidad de interconexión** no se presentaron diferencias entre machos y hembras (M:



<b>TT</b>	F	SubAdult	13	0.88	0.70	0.90	0.76
o							
<b>PT</b>	F	Adulto	2	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>AL</b>	M	Adulto	14	0.78	0.95	0.86	1.00
<b>M</b>	F	Adulto	12	0.70	0.45	0.88	0.89
N							
<b>BB</b>	M	Juvenile	14	1.00	1.98	0.81	0.87
<b>RS</b>	F	Adulto	13	0.88	0.75	0.86	0.74
<b>C</b>	M	Juvenile	16	1.00	1.98	0.86	1.00
C							
<b>JU</b>	M	SubAdult	12	0.88	0.62	0.86	0.76
o							
<b>M</b>	F	Juvenile	14	1.00	0.57	0.86	0.73
C							
		<b>Promedi</b>	12.2	0.79	0.89	<b>CONTINÚA</b>	
		<b>o</b>	2				
		<b>Desviaci</b>	4.02	0.31	0.67	0.29	0.30
		<b>ón</b>					

Se debe señalar que el individuo femenino, identificado como PT, presenta índices bajos para los coeficientes de centralidad. Esta hembra permanece distante, debido a una reestructuración del grupo, pero ocupa la misma área y ocasionalmente interactúa con los otros individuos, por lo que sus datos fueron tomados en cuenta para el análisis.

Por otra parte en la red de proximidad ([ANEXO C](#)), el valor promedio del grado del nodo fue 13.56 (s.d.= 3.78) respectivamente. Mientras que para la centralidad de intermediación, la centralidad de cercanía, vector de centralidad propio y coeficiente de agrupamiento los valores promedio fueron: 0.56 (s.d.= 0.56), 0.83 (s.d.= 0.32), 0.85 (s.d. = 0.1) y 0.90 (s.d.= 0.1) respectivamente. No se presentó diferencia entre grupos o edad, para ninguna de las medidas de centralidad local.



**Figura 8** Sociogramas de la población de *Cebus albifrons* estudiada. Se visualiza los nodos diferenciado por el sexo de los individuos, y el tamaño según la carga parasitaria, mientras que el grosor de las líneas indica el peso de las interacciones A) Red de Contacto. B) Red de Proximidad

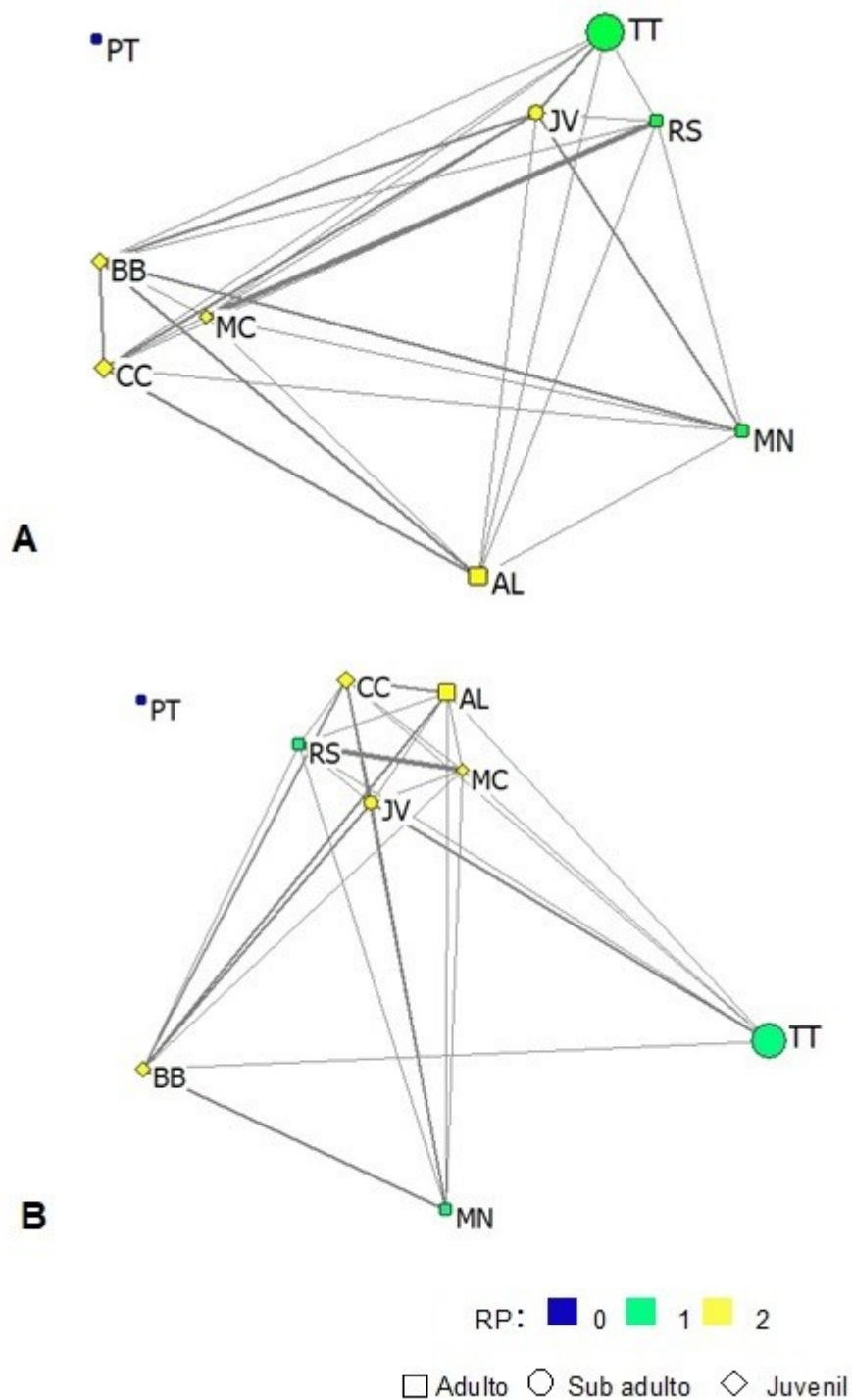
La diversidad o riqueza de parásitos (RP) con los coeficientes de centralidad de la red indicaron presentó una relación monótonica con los siguientes coeficientes de centralidad: **grado** ( $r_s = 0.726$ ,  $p = 0.03$ ) y **coeficiente de agrupamiento** ( $r_s = 0.694$ ,  $p = 0.04$ ).

La intensidad de la infección parasitaria por *Strongyloides* sp., al hacerse una prueba no paramétrica de correlación (Spearman) demostró tener relación con el **coeficiente de agrupamiento** ( $r_s = 0.81$ ,  $p < 0.01$ ) y **vector de centralidad propio** ( $r_s = 0.66$ ,  $p = 0.04$ ); mientras que el parasitismo por *Hymenolepis* sp. no se asoció a ninguna variable de los parámetros de la red de contacto mediante la correlación de Spearman.

Por otra parte, para la red de proximidad empleando la correlación de Spearman, no se asoció con los coeficientes: grado, coeficiente de agrupamiento, centralidad de cercanía, centralidad de interconexión y vector de centralidad propio.

La RP, podría tener una relación lineal con ciertos coeficientes de centralidad, cuando se analiza con el coeficiente de Pearson. Entre los parámetros de la red de contacto que se relacionan linealmente con RP se tiene: el **grado** ( $r = 0.82$ ,  $p < 0.01$ ), **la cercanía** ( $r = 0.82$ ,  $p$

$< 0.01$ ), **el vector de centralidad** ( $r = 0.78$ ,  $p = 0.01$ ) y **el agrupamiento** ( $r = 0.71$ ,  $p = 0.03$ ). Mientras que los parámetros de la red de proximidad no relacionan el agrupamiento con la RP, pero si el **grado** ( $r = 0.72$ ,  $p = 0.03$ ) **la cercanía** ( $r = 0.73$ ,  $p = 0.03$ ) y **el vector de centralidad** ( $r = 0.70$ ,  $p = 0.04$ ). Sin embargo, debido a que los datos no están normalmente distribuidos estos resultados no han sido discutidos.



**Figura 9** Redes de contactos agrupadas bajo diferentes criterios  
 A) Red agrupada por el índice de cercanía nótese la infección mixta (2 parásitos) compartida por el grupo formado por los juveniles. B) Red que presenta asociaciones según el índice de agrupamiento (*clustering*), nótese que el tamaño del nodo es similar entre los individuos.



### 4.3. Identificación molecular de *Giardia* sp.

La población de *Cebus albifrons* de Misahuallí, ha visto un decrecimiento en el número de su población entre los años de seguimiento 2012-2018, pasando de 16 a 8 individuos. Durante la observación microscópica no se observaron quistes de *Giardia* sp. pero mediante el análisis molecular se logró identificar los individuos parasitados durante las diferentes fechas del muestreo ([ANEXO E](#)).

Se amplificaron similares cantidades de muestras para *tpi* (12/48) y *gdh* (15/48) (Fisher test,  $p = 0.62$ ). Algunas muestras amplificaron solo para uno de los dos pares de cebadores ( $n_{tpi} = 4$ ,  $n_{GDH} = 7$ ), mientras que 8 amplificaron para ambos genes (Tabla 9). La prevalencia acumulativa por individuo fue de 53% (8/15), 55.5% (5/9) y 75% (6/8) en los años 2012, 2017 y 2018 respectivamente (Chi-cuadrado de Pearson test,  $X^2 = 1.09$ ,  $p = 0.587$ ), en promedio la prevalencia de los individuos fue del 61%.

Solo el 2018 se hizo un muestreo seriado para el análisis molecular, donde se presentaron el 33.3% (8/24) de las muestras como positivas para al menos un par de cebadores. No se pudo demostrar que el muestreo serial incremente la cantidad de muestras positivas para *Giardia* sp. (Q de Cochran test,  $Q = 1.20$ ,  $p = 0.55$ ).

**Tabla 9**

*Muestras positivas para Giardia sp.*

**CONTINÚA**

<b>AÑO</b>	<b>CODIGO</b>	<b>EDAD</b>	<b>SEXO</b>	<b><i>tpi</i></b>	<b><i>gdh</i></b>
<b>2012</b>	ALO110	Adulto	M	+	+
<b>2012</b>	NB114	Subadulto	F	+	+
<b>2012</b>	BT115	Juvenil	M	+	+
<b>2012</b>	MGB103	Adulto	M	-	+
<b>2012</b>	JR107	Juvenil	M	+	-
<b>2012</b>	BL197	Subadulto	M	+	-
<b>2012</b>	BUD108	Juvenil	M	-	+
<b>2012</b>	JBW109	Subadulto	M	-	+

<b>2017</b>	AF003/ AFA25	Adulto	M	+	+
<b>2017</b>	MC009/ MCA29	Juvenil	F	+	+
<b>2017</b>	BB005	Juvenil	M	+	+
<b>2017</b>	CC007 /CC728	Juvenil	M	+	-
<b>2017</b>	MN004	Adulto	F	+	-
<b>2018</b>	MNA04	Adulto	F	+	+
<b>2018</b>	PTA10	Adulto	F	+	+
<b>2018</b>	BBA05	Juvenil	M	-	+
<b>2018</b>	TTA09	Subadulto	F	-	+
<b>2018</b>	CCA15	Juvenil	M	-	+
<b>2018</b>	MCA16/ MCA24	Juvenil	F	-	+

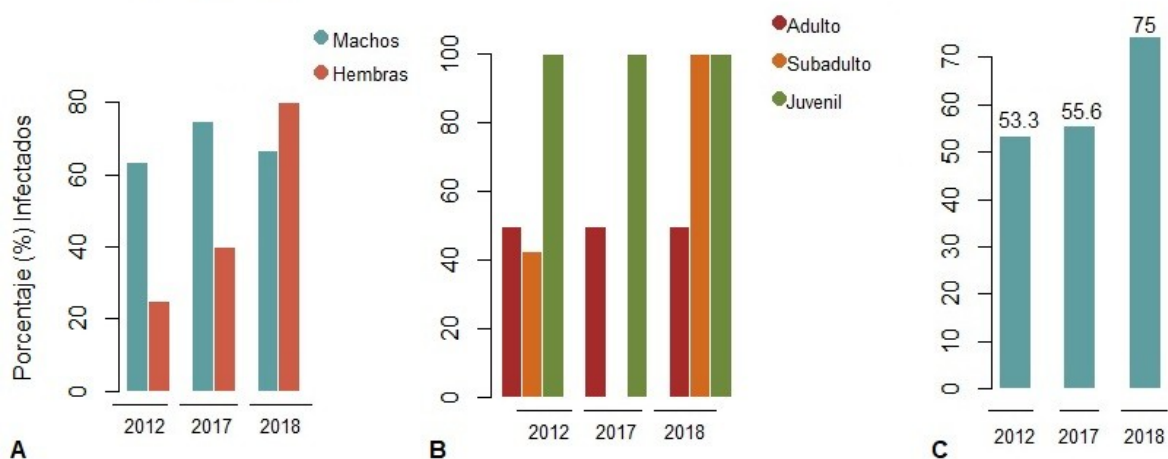
Durante el 2012, la proporción de hembras infectadas no difirió de forma significativa de la proporción de machos infectados (F: 2/4; M: 6/11; Fisher test,  $p = 1$ ); del mismo modo en los grupos de edad, aunque los juveniles se presentaron todos parasitados, no se presentaron cambios significativos al compararse con la proporción de adultos y subadultos infectados (Adultos: 2/4; Subadultos: 3/8; Juveniles: 3/3; Chi cuadrado de Pearson,  $X^2 = 3.45$ ,  $p = 0.18$ ).

Para el año 2017, la población se redujo a 9 individuos, sin embargo no hubo diferencia entre la proporción de infectados por sexo (F: 2/5; M: 3 /4; Fisher test,  $p = 0.52$ ). Los juveniles, al igual que en el año 2012, se encontraron todos parasitados y al ser comparados con los grupos de edad no hubo diferencia significativa (Adultos: 2/4, Subadultos: 0/2; Juveniles: 3/3; Chi-cuadrado de Pearson,  $X^2 = 4.95$ ,  $p = 0.08$ ).

Por último en el 2018, la proporción de machos y hembras infectadas fue similar (F: 4/5; M: 2/3, Fisher test,  $p = 1.00$ ). Nuevamente todos los juveniles se presentaron infectados, y al compararse con los otros rangos de edad la diferencia no es significativa (Adulto: 2/4; Juvenil: 3/3; Subadulto: 1/1; Chi-cuadrado de Pearson,  $X^2 = 2.67$ ,  $p = 0.26$ ).

Adicionalmente, en los años 2017 y 2018 se tomaron registros de la consistencia de la feca (36 muestras), dentro de estas 11 muestras identificadas como positivas fueron registradas

como sintomáticas (diarrea ligera y diarrea líquida); mientras que 5 muestras identificadas como positivas eran asintomáticas (Chi-cuadrado de Pearson test,  $X^2 = 0.30$ ,  $p = 0.59$ ).



**Figura 10** Prevalencia de infección por *Giardia* sp. durante los años de estudio.

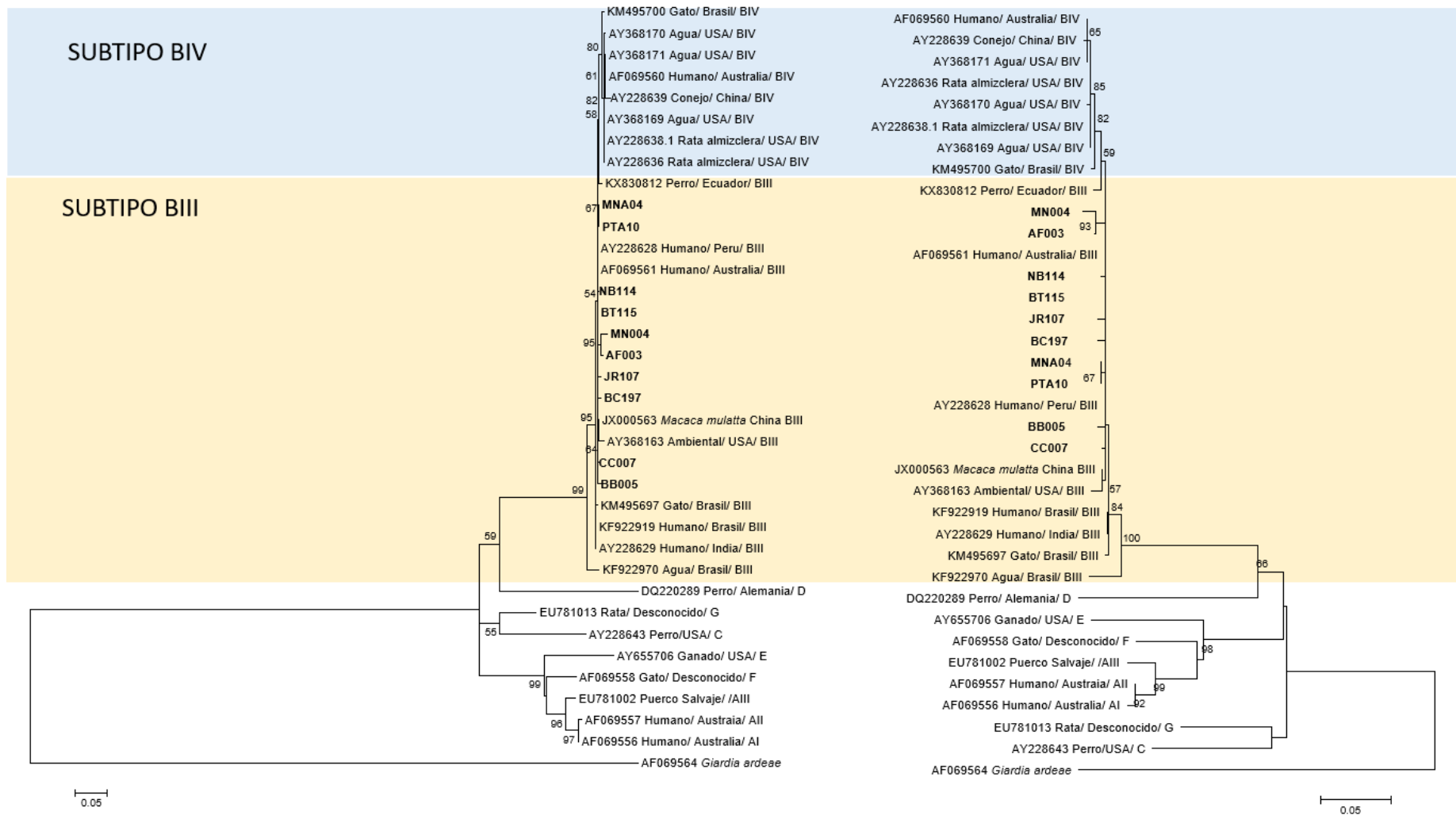
A) Prevalencia por Sexo, B) Prevalencia por edad.. En todos los casos el número de infectados es similar (Fisher test,  $p > 0.05$ ). C) Prevalencia durante cada año de estudio

#### 4.4. Análisis filogenético

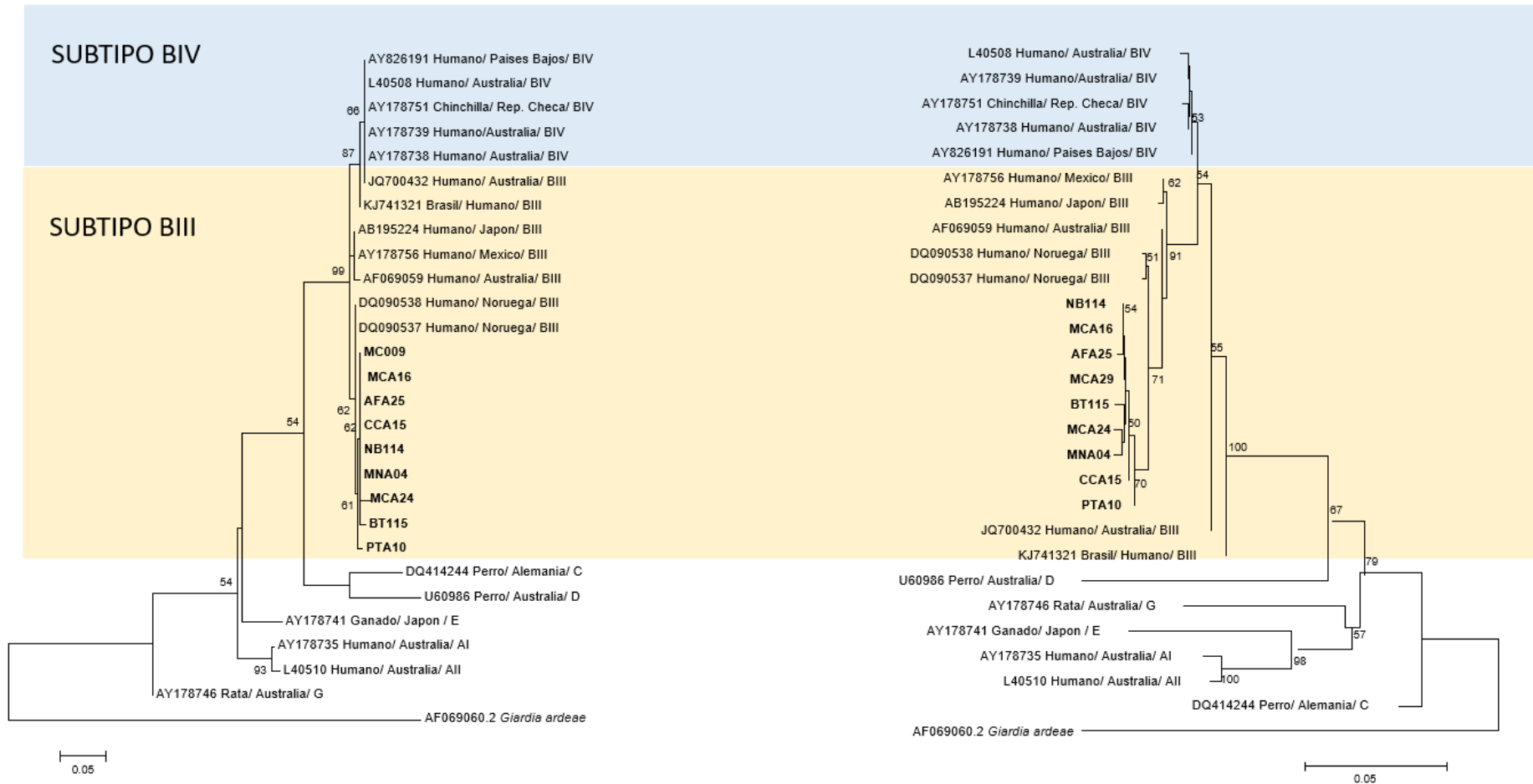
Todas las muestras como positivas descritas en la Tabla 9, fueron secuenciadas, sin embargo fueron descartadas las secuencias ( $n = 4$ ) remitidas que presentaron mala calidad o un tamaño menor a 500 pb. Mediante la secuenciación se obtuvieron 10 secuencias consenso para el *tpi* y 9 secuencias para el *gdh*. Mediante la búsqueda con BLAST se confirmó la identidad de las secuencias para *Giardia intestinalis* con más del 97% de identidad ([ANEXO E](#)). Encontrándose que el 100 % de las secuencias *tpi* y el 44% de las secuencias *gdh* fueron similares a secuencias obtenidas de *Giardia* sp. provenientes de heces fecales humanas; mientras que el 55.6 % (MNA04, MCA29, CCA15, MCA24, BT115, PTA10) de secuencias de *gdh* fueron similares a secuencias obtenidas de *Giardia* sp. provenientes de mamíferos acuáticos en cautiverio.

La búsqueda con BLAST permitió determinar que todas las secuencias eran pertenecientes al genotipo B. Al realizarse el respectivo análisis filogenético tanto para el *gdh* y como para el

*tpi*, las secuencias fueron categorizadas dentro del genotipo B confirmando los resultados obtenidos por BLAST. Además las secuencias se presentaron similares a las referenciales para el subtipo BIII. Esto fue verificado mediante la construcción de los árboles filogenéticos por MV Y NJ para cada gen (Figura 11 y Figura 12). Con respecto al *tpi*, las secuencias presentaron similitud genética junto a secuencias referenciales aisladas de humanos de Perú, Australia, USA y monos en China para el subtipo BIII. Mientras que las secuencias del *gdh* formaron un *cluster* con una relación estrecha al subtipo BIII de humano proveniente de Noruega



**Figura 11** Dendrogramas de *Giardia* sp. basadas en secuencias de nucleótidos del gene triosa fosfato isomerasa. A) Árbol ML. B) Árbol NJ basado en análisis de máxima verosimilitud. Los números indican los valores de bootstrap (%), estimados de 1.000 remuestreos de los datos de la secuencia. En negrita se muestran las secuencias obtenidas en el estudio.



**Figura 12** Dendrogramas de *Giardia* sp. basadas en secuencias de nucleótidos del gen glutamato deshidrogenasa. A) Árbol ML B) árbol NJ basado en análisis de máxima verosimilitud. Los números indican los valores de bootstrap (%), estimado. Los códigos en negritas son las secuencias de este estudio.

## CAPITULO 5- DISCUSIÓN

### 5.1. Parasitismo

Las familias de helmintos gastrointestinales en *Cebus albifrons* de vida libre hallados fueron *Strongyloididae* e *Hymenolepididae*, estos han sido reportados comúnmente en varias especies de primates neotropicales (Mati, Junior, Pinto, & de Melo, 2013; Solórzano-García & Pérez-Ponce de León, 2018). Durante el 2017 y 2018 en las heces de la población de *Cebus albifrons* de Misahuallí, se encontraron cuatro tipos de helmintos: *Strongyloides* sp., *Strongyloides* no identificados, *Hymenolepididae*: Tipo 1 y Tipo 2. Una diversidad similar fue encontrada durante el 2012 para este mismo grupo de capuchinos, donde se reportó: *Strongyloides* sp., *Strongyloides* no identificados, *Hymenolepis* sp. (Tipo 1) y *Capillaria* sp. (Martin-Solano et al., 2017). En otro grupo de capuchinos (*Cebus capucinus*) de vida libre en contacto frecuente con humanos en Costa Rica, se hallaron tres tipos de helmintos: *Strongyloides*, *Filarias*, *Trichostrongylus* (Chinchilla et al., 2007), consistente con la diversidad obtenida en el presente estudio. En contraparte en una población de *Cebus albifrons* en Perú, los únicos helmintos identificados fueron *Strongyloides* sp. pero esta población presenta contacto limitado con seres humanos (Phillips et al., 2004). La variedad de helmintos gastrointestinales que puede hallarse en *Cebus* spp. podría explicarse por su dieta omnívora (Rondón et al., 2017), mientras que ciertas especies parasíticas son excretadas con diferente frecuencia por lo que la diversidad pueden variar según el muestreo realizado (Martin-Solano et al., 2017; Raharivololona & Ganzhorn, 2010; Villanúa, Pérez-Rodríguez, Gortázar, Höfle, & Viñuela, 2006). Además, hay ciertos parásitos como los protozoarios (e.g. *Balantidium*, *Cryptosporidium*, *Giardia* sp.) que no pueden identificarse únicamente por microscopia sino requieren de análisis moleculares (Karim et al., 2014; Rondón et al., 2017).

Aunque en el presente estudio no se determinaron las especies de los parásitos, se debemencionar que en el caso del género *Strongyloides* existen al menos 40 especies que infectan a vertebrados (Dorris, Viney, & Blaxter, 2002), siendo *Strongyloides cebus* propio de los PNH neotropicales (Dorris et al., 2002; Guerrero, Serrano-Martínez, Tantaleán, Quispe, & Casas, 2012), los huevos de este parásito tienen un tamaño aproximado de 40- 70  $\mu\text{M}$  por 20- 35  $\mu\text{M}$  y se adquieren por vía mucosa oral o penetración de la piel (Cogswell & Baker, 2008); sugiriéndose que los *Cebus albifrons* del estudio podrían estar infectados por esta especie. Sin embargo, no se debe desestimar la posibilidad de una infección por *Strongyloides stercoralis* una especie genéticamente diferente a *S. cebus* (Dorris et al., 2002; Mati et al., 2013) que afecta a personas en países tropicales y subtropicales (Olsen et al., 2009). Por otra parte, el género *Hymenolepis* (= *Rodentolepis*) ha sido revisado en varias ocasiones, pero su estructura sigue siendo controvertida (Cunningham & Olson, 2010). En la revisión efectuada por Solorzáno García & Pérez- Ponce (2018), se indica que las especies de *Hymenolepididae* reportadas en PNH neotropicales incluyen: *H. diminuta*, *H. cebidarum*, *H. nana*, siendo *H. diminuta* encontrada en capuchinos (*Cebus capucinus*). Además, *H. microstoma* es una especie del tracto de roedores que se ha encontrado en humanos (Macnish, Ryan, Behnke, & Thompson, 2003) por lo que debería analizarse una posible transmisión a PNH. Pero en el presente estudio al compararse las características de los huevos con los datos obtenidos de la revisión de Hughes, (1941) se sugiere que los huevos del presente estudio no corresponden a ninguna de las especies antes mencionadas, debido a que no presentan filamentos polares como *H. nana* y *H. microstoma* y por su tamaño no puede ser categorizado como *H. cebidarum* ni *H. diminuta*. También se resalta que para la identificación de *Hymenolepis* sp. mediante huevos es difícil debido a la similitudes y se necesitan larvas adultas para diferenciar las especies (Macnish et al., 2003). Por lo antes mencionado, se insiste que para precisar la diversidad parásitica y el potencial zoonótico, es necesario el uso combinado de



descripción morfológica detallada y el uso de técnicas moleculares (Solórzano-García & Pérez-Ponce de León, 2018).

Las prevalencias de *Strongyloides* sp. obtenidas en los dos años de este estudio (89 % – 100 %), en la población de *Cebus albifrons* de Misahuallí son mayores que las registradas para *C. albifrons* en una reserva en Tambopata-Perú (18 %) (Phillips et al., 2004) y para monos cariblanco (*Cebus capuchinos*) en contacto con turistas en Costa Rica (20%) (Chinchilla et al., 2007); pero los valores obtenidos son equiparables a los encontrados en monos cariblanco (*C. capucinus*) en el área de conservación Santa Rosa en Costa Rica (75.9 %) (Parr et al., 2013) y en monos aulladores de vida libre (*Alouatta palliata aequatoriales*) (88 %) en Ecuador (Helenbrook, Stehman, Shields, & Whipps, 2017; Helenbrook et al., 2015). Se sugiere que la alta incidencia de esta parasitosis en este grupo de estudio, se deba a que desempeñan alrededor del 18% de sus actividades en el suelo (Haro, Chávez, Carrillo-Bilbao, & Martín Solano, 2017) puesto que el contacto con el suelo podría facilitar la penetración de larvas en estado infectivo, a través de la piel (Viney & Lok, 2015; Wenz-MüCke, Sithithaworn, Petney, & Taraschewski, 2012) y además debido a las interacciones sociales (e.g. acicalamiento) que influyan en la transmisión fecal-oral (Rimbach et al., 2015); como otros factores de riesgo podrían incluirse el áreas de vida reducida que faciliten el aumento de densidad de parásitos en estado infectivo (Mati et al., 2013); y la influencia de actividades antrópicas que favorezcan el contacto con heces fecales humanas infectadas (Hussain et al., 2013; Soto-Calderón, Acevedo-Garcés, Álvarez-Cardona, Hernández-Castro, & García-Montoya, 2016). La intensidad de infección por este nemátodo debe ser controlada puesto que los PNH eventualmente podrían enfrentar los efectos patológicos de la enfermedad que incluyen lesiones en el tracto digestivo y pulmones, pérdida de apetito, deshidratación y disnea (Mati et al., 2013) y podría llegar a causar la muerte como se ha reportado en

chimpancés (*Pan troglodytes*) (Blacklock & Adler, 1922; Penner, 1981), gorilas (*Gorilla gorilla*) (Penner, 1981) y en un mono chorongo gris (*Lagothrix cana*) (Mati et al., 2013).

Con respecto a la infección por *Hymenolepis* sp. una ruta por la que se puede adquirir este céstodo, es la ingesta de artrópodos infectados con cisticercos (Makarikov, Tkach, & Bush, 2013). Considerando que la dieta de *Cebus* sp. incluye insectos (Terborgh, 1983), puede sugerirse que este sea el origen de la infección. Este parásito se ha reportado previamente en el mismo grupo con una prevalencia mayor (66.6%) (Martin-Solano et al., 2017) que las determinadas en los años 2017 y 2018 (59 % - 13 % respectivamente). Todos los años la infección por este parásito ha presentado un sesgo hacia los individuos machos, y en los últimos años la población y la proporción de machos ha decaído de 12/15 a 3/8. Las infecciones parasíticas con cierto sesgo hacia los individuos machos, se presentan en varios mamíferos (Poulin, 1996), y se ha sugerido que hay una relación entre niveles altos de testosterona con mayores niveles parasitarios en individuos machos adultos (Gear, Perkins, & Hudson, 2009; Habig & Archie, 2015; Negro, Caudron, Dubois, Delahaut, & Gemmell, 2010).

## **5.2. Redes sociales y parasitismo**

Este es el primer estudio sobre las interacciones sociales y su influencia en el parasitismo, conducido en *Cebus albifrons* de vida libre dentro de un hábitat alterado por las actividades humanas. En el estudio realizado se han comparado dos aspectos comportamentales del mismo grupo: contacto y proximidad, y el impacto generado en la transmisión de parásitos gastrointestinales. Los resultados indican que el contacto directo (e.g. acicalamiento, juego, agresiones) tiene relación con la diversidad de parásitos y con la transmisión de *Strongyloides* sp.; mientras que la red de proximidad (e.g. forrajeo grupal o reposo en proximidad) no se relaciona con ninguna de las medidas de centralidad analizadas. Este tipo de relación entre

comportamientos que incluyan contacto y tengan relación con parásitos gastrointestinales, ha sido reportado en monos araña (*Ateles hybridus*) con *Trichostrongyloides* sp. y *Strongyloides* sp. (Rimbach et al., 2015); y en macacos japoneses (*Macaca fuscata yaku*) con *Oesophagostomun acuelatum*, y *Strongyloides fuelleborni* (MacIntosh et al., 2012).

Los individuos centrales dentro de una red tienden a presentar una mayor variedad de parásitos (Gómez et al., 2013). En este estudio, los individuos juveniles presentaron valores mayores de coeficientes de centralidad, y fueron estos individuos los que tenían mayor diversidad de parásitos gastrointestinales. Esto concuerda con otros estudios que señalan que los PNH más centrales dentro de una red social, comparten una diversidad de parásitos gastrointestinales mayor en relación a los individuos periféricos (MacIntosh et al., 2012; Rimbach et al., 2015). Usualmente los juveniles tienden a ser los más centrales (Rushmore et al., 2013), porque interactúan entre ellos y con sus madres, convirtiéndose en los más susceptibles a ser individuos transmisores y vulnerables frente a infecciones, debido a la exposición con otros individuos (MacIntosh, Hernandez, & Huffman, 2010).

En la red de contacto, la intensidad de la infección parasitaria por *Strongyloides* sp. se presentó asociada al índice de agrupamiento (*clustering*) y al vector de centralidad propio (*eigenvector*). Se señala además, que el individuo hembra identificado como PT, realiza el 72% de sus actividades en el suelo (Haro et al., 2017) y a pesar de que se ha sugerido, que las prevalencias elevadas de *Strongyloides* sp. se deban al contacto con el suelo (Wenz-MüCke et al., 2012) en esta hembra no se encontraron parásitos. Sugiriéndose que la ausencia de este parasitismo en este individuo, se debería a la ausencia de interacción con los otros miembros. Estos datos aportan a señalar, que los parásitos que se adquieren vía fecal-oral se transmiten efectivamente dentro de una red social (Nunn, Thrall, Leendertz, & Boesch, 2011); y que la carga parasitaria tiene relación con el contexto social de la especie, además de las actividades

antropogénicas reportadas en otros estudios (Hussain et al., 2013; Thatcher, Downs, & Koyama, 2018).

Por otra parte la infección de *Hymenolepis* sp. no presentó ninguna asociación con los parámetros de la red social, aportando a la hipótesis de que los parásitos transmitidos mediante intermediarios no se explican mediante el uso de las redes de contacto (Gear, Luong, & Hudson, 2013). Se resalta entonces, que un contacto efectivo depende de la biología del parásito y su relación con el hospedero (White et al., 2017).

Colectivamente estos resultados, apoyan la hipótesis de que vivir en grupos sociales, incrementa el riesgo de adquirir ciertos patógenos (Altizer et al., 2003); que la transmisión de enfermedades tiene relación con las propiedades sociales a nivel individual y grupal, siendo los individuos centrales vulnerables por exposición (Gómez et al., 2013; MacIntosh et al., 2012; Romano et al., 2016), y se sugiere que las medidas de control de enfermedades apunten a individuos clave dentro de un grupo social y no aleatoriamente (Gómez et al., 2013; Rushmore et al., 2014; Silk et al., 2017). Sin embargo, se debe señalar que el número de nodos y contactos son funciones espacio temporales que pueden cambiar (Perkins, Ferrari, & Hudson, 2008) por lo tanto, se sugiere ser cauteloso con la interpretación de los datos, antes de extrapolarse a otras especies de primates (Romano et al., 2016).

### **5.3. Análisis molecular de *Giardia* sp.**

Varios estudios moleculares de *Giardia* sp. se han conducido en aislados provenientes de PNH (Beck et al., 2011; Berrilli et al., 2011; Debenham et al., 2015; Debenham et al., 2017; Graczyk et al., 2002; Johnston et al., 2009; Karim et al., 2015; Karim et al., 2014; Lebbad et al., 2010; Levecke et al., 2009; Zhong et al., 2017). Sin embargo, los análisis de la variabilidad genotípica de *Giardia* sp. de platirrinos corresponden principalmente a estudios desarrollados en cautiverio en zoológicos de Europa y Asia (Karim et al., 2014; Lebbad et al.,

2010; Levecke et al., 2009); siendo escasos los estudios conducidos en el neotrópico (David et al., 2014; Li et al., 2015; Soares et al., 2011; Volotão et al., 2008) especialmente en PNH de vida libre (Vitazkova & Wade, 2006). Por lo que este estudio, es uno de los pocos realizados sobre filogenia de *Giardia* sp. en PNH neotropicales de vida libre y es el primer estudio molecular de *Giardia* sp. en fauna silvestre de Ecuador

*Giardia* sp. es un parásito que se ha reportado en varias especies de primates neotropicales principalmente mediante análisis microscópico (Chinchilla et al., 2005; Fajardo-Sanchez et al., 2014; M. Gómez et al., 1996; Levecke et al., 2007; Verweij et al., 2003). En el presente estudio no se observaron quistes de *Giardia* sp. cuando se realizó la evaluación microscópica, pero mediante el empleo de PCRn se confirmó la presencia de *Giardia* sp., este suceso también se ha reportado en otro estudio con PNH conducido en China (Karim et al., 2014), esto se debe a que la sensibilidad y especificidad de la PCR para detectar quistes de *Giardia* sp. es superior a la visualización microscópica (Gotfred-Rasmussen et al., 2015).

Con el empleo de la PCRn, se determinó que entre los tres años de estudio la prevalencia promedio de giardiasis en los individuos fue de 61.2%. Prevalencias similares también se han observado en poblaciones de PNH neotropicales de vida libre cercanas a asentamientos humanos, como en monos aulladores de manto (*Allouata palliata*) de 62.5% en Costa Rica (Chinchilla et al., 2005), y en monos aulladores negro y dorado (*Allouata caraya*) 67% en Argentina (Kowalewski et al., 2010). Estas prevalencias de *Giardia* sp. en PNH de vida libre se han asociado con la influencia de las actividades humanas (Chinchilla et al., 2005; Gillespie, 2004). Por otro lado también debe considerarse las condiciones medio ambientales pueden influir en las prevalencias, se ha visto que en monos aulladores (*Allouatta pigra*) de vida libre la prevalencia aumentan en estación húmeda (40%) en relación a la temporada seca (27%) (Vitazkova & Wade, 2006) y las regiones cálidas y húmedas favorecen a ciertas

especies parasíticas (Milozzi, Bruno, Cundom, Mudry, & Navone, 2012). Entre las vías de adquisición se encuentra la contaminación fecal-oral, en este caso el grupo de estudio, que desarrolla el 18% de sus actividades en el suelo (Haro et al., 2017), podría ingerir quistes accidentalmente de heces humanas presentes el suelo (e.g. de pañales y residuos de papel higiénico), mientras desarrollan actividades como juegos, alimentación y forrajeo por donde frecuentemente transitan animales domésticos y personas. Además hábitos como el forrajeo en basura que podrían tener relación con el incremento de transmisión de ciertos parásitos (Flint, Hawley, & Alexander, 2015). Otras rutas de adquisición del parásito, podrían ser las fuentes de agua a las que los primates tienen acceso, puesto que en personas se han encontrado quistes genéticamente similares a los hallados en cuerpos de agua (Durigan et al., 2014; Durigan et al., 2017) por lo que podría existir la misma relación en PNH. Otra vía podría ser mediante los alimentos dados por los locales o turistas, puesto que la alimentación por turistas ha demostrado tener influencia en la diversidad de protozoarios gastrointestinales en PNH (Borg, Majolo, Qarro, & Semple, 2014).

Con respecto a los análisis moleculares, todas las secuencias del *tpi* y el 44.4% de las secuencias de *gdh* presentaron similitud con secuencias de *Giardia intestinalis* proveniente de humanos; mientras que el resto de los aislados *gdh* (55.6 %) fueron relacionados con secuencias para *Giardia intestinalis* proveniente de mamíferos acuáticos en cautiverio, pero también genéticamente idénticos a aislados provenientes heces humanas (Lasek-Nesselquist et al., 2008). Por lo tanto, se apoya que los aislados provenientes de humanos y PNH no son genéticamente distintos entre ellos (Brynildsrud et al., 2018).

Todas las muestras pertenecieron al genotipo B, correspondiente a *Giardia enterica* según Thompson & Ash, (2016). El genotipo B ha sido encontrado como más prevalente en PNH (Karim et al., 2015; Zhong et al., 2017), este genotipo se ha encontrado varias especies de PNH neotropicales en zoológicos de Europa y Asia incluyendo: tití enano (*Callithrix pygmaea*),

tití cabeza blanca (*Saguinus oedipus*) (Lebbad et al., 2010), monos araña de cabeza negra (*Ateles fuscipes*) (Levecke et al., 2009) y en monos ardilla (*Saimiri boliviensis*; *Saimiri sciureus*) (Levecke et al., 2009); *Saimiri* sp. (Karim et al., 2015). El genotipo B, es más variable genéticamente en relación al genotipo A, por la presencia de polimorfismos, lo que dificulta su clasificación dentro de los subtipos BIII o BIV (Ryan & Cacciò, 2013; Wielinga, Thompson, Monis, & Ryan, 2015), por ejemplo, en PNH en cautiverio no se ha podido asignar las secuencias a subtipos conocidos (Levecke et al., 2009) y en regiones amazónicas, como la del estudio, se han reportado genotipos B desconocidos en aislados provenientes de personas (Nunes et al., 2018; Nunes Coronato et al., 2016).

En el presente estudio, fue posible determinar que todas las secuencias presentaron similitud con el subtipo BIII referencial (tanto para *gdh* como *tpi*). La información molecular de *Giardia* sp. halladas en PNH en estudios conducidos en el neotrópico, incluyen el genotipo A en mono aullador guatemalteco (*Aloutta pigra*) de vida libre (Vitazkova & Wade, 2006), subtipo AI en Brasil, en especies en cautiverio: mono araña común (*Ateles Belzebut*), mono aullador negro (*A. caraya*), mono aullador marrón (*A. fusca*), mono aullador rojo (*A. seniculus*), mono aullador marrón austral (*A. clamitans*) (David et al., 2014; Volotão et al., 2008); subtipo AII se ha encontrado en monos aulladores negros (*A. caraya*) (David et al., 2014). Mientras que el genotipo B, ha sido reportado en monos aulladores guatemaltecos (*A. pigra*) de vida libre en México y Belice (Vitazkova & Wade, 2006), y cautiverio en Brasil, en monos aulladores marrones (*A. fusca*) donde todas las secuencias fueron similares al subtipo BIV referencial provenientes de humanos (Soares et al., 2011). En ninguno de los estudios mencionados anteriormente, se ha reportado el subtipo BIII, este subtipo solamente se ha encontrado en Europa en PNH en cautiverio (Cacciò & Ryan, 2008; Levecke et al., 2009). La presencia del subtipo BIII en *Cebus albifrons*, podría relacionarse con el hábitat afectado por

la intensa actividad antrópica ya que las secuencias relacionadas con los subtipos BIII y BIII-like se han sugerido que son de origen humano principalmente, mientras que las relacionadas con BIV o BIV-like son de origen tanto humano como animal (Soares et al., 2011). Además este subtipo es el más predominante en humanos de Centroamérica y de América del Sur (Sprong et al., 2009). En Ecuador, el subtipo BIII se ha encontrado mediante el análisis de *gdh* en Esmeraldas (Atherton et al., 2013) y mediante el análisis del *tpi*, en una zona semi rural cercana a Quito (Sarzosa et al., 2018), lamentablemente no hay estudios moleculares en la amazonía ecuatoriana que podrían aportar al conocimiento sobre la variabilidad genética de *Giardia* sp.

Por último los efectos de cada variante genotípica en PNH no ha sido explorada en el presente estudio, pero se menciona que el genotipo B se ha encontrado en muestras sintomáticas (diarrea) pero también en muestras asintomáticas; en otros PNH se ha encontrado el genotipo A en muestras diarreicas (Volotão et al., 2008) y el genotipo B en muestras asintomáticas (Soares et al., 2011) por lo que no se podría asumir la presencia de diarrea y el genotipo de *Giardia* sp hallado en PNH. En humanos los efectos descritos también son inconsistentes (Ignatius et al., 2012) mientras que unos estudios no han encontrado correlación entre el genotipo B y los síntomas (Sahagún et al., 2008) en otros se ha asociado con diarrea (Gelanew, Lalle, Hailu, Pozio, & Cacciò, 2007) flatulencia (Lebbad et al., 2011) y malnutrición (Ignatius et al., 2012) en niños.



## CAPÍTULO 6 - CONCLUSIONES

La población de *Cebus albifrons* de Misahuallí-Tena esta infectada por nemátodos: *Strongyloides* sp., cestodos: *Hymenolepis* sp y protozoarios: *Giardia* sp. Estos datos sobre parasitosis aportan a la fuente sobre información parasitológica en primates ecuatorianos.

Las interacciones sociales que incluyen contacto facilitan la transmisión de parásitos gastrointestinales, y en menor medida la proximidad. El índice de cercanía se relaciona con la riqueza de parásitos, siendo los juveniles los que presentan mayor diversidad parasitaria. Finalmente el índice de agrupamiento se relacionan con la intensidad de la infección por *Strongyloides* sp.

La prevalencia de *Giardia* sp. promedio determinada mediante PCR fue de 61%. Todas las infecciones por *Giardia* sp. en la población de *Cebus albifrons* son del genotipo antroponómico B (Subtipo BIII), por lo que se sugiere un origen de infección antrópica.

Aunque las infecciones parasitarias son comunes en PNH neotropicales, las infecciones halladas en PNH en medio antrópico podrian deberse factores de riesgo como hábitos de forrajeo en basura, contaminación ambiental o la interacción frecuente con personas.

## CAPÍTULO 7 - RECOMENDACIONES

Por las infecciones parasíticas reportadas y por la presencia del subtipo BIII de *Giardia* sp. se debe considerar a los PNH como potenciales reservorios zoonóticos, y hace necesaria la toma de decisiones urgente para diseñar programas de manejo que no subestimen la presencia de enfermedades y permitan precautelar la salud de los animales y las personas en contacto. Además se sugiere examinar a la población humana (turistas y locales) relacionada con el grupo de vida libre y evaluar la presencia de quistes en muestras ambientales para evaluar el ciclo de transmisión de *Giardia* sp. en esta área.

Complementar el análisis de epidemiología molecular de *Giardia* sp. para otras especies de PNH en centros de rescate y en ambientes no perturbados por actividades antrópicas.

Emplear un análisis multilocus añadiendo el uso de cebadores para el gen de la beta-giardina.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Moein, K. A., & Saeed, H. (2016). The zoonotic potential of *Giardia intestinalis* assemblage E in rural settings. *Parasitology Research*, 115(8), 3197-3202. doi:10.1007/s00436-016-5081-7
- Abe, N., Makino, I., & Kojima, A. (2012). Molecular characterization of *Giardia psittaci* by multilocus sequence analysis. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(8), 1710-1716. doi:10.1016/j.meegid.2012.08.003
- Adam, R. D. (2001). Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(3), 447-475. doi:10.1128/cmr.14.3.447-475.2001
- Adamska. (2015). Molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* occurring in natural water bodies in Poland. *Parasitology Research*, 114, 687-692. doi:10.1007/s00436-014-4234-9
- Adamska, Leońska-Duniec, Maciejewska, Sawczuk, & Skotarczak. (2010). Comparison of efficiency of various DNA extraction methods from cysts of *Giardia intestinalis* measured by PCR and TaqMan real time PCR. *Parasite*, 17(4), 299-305. doi:10.1051/parasite/2010174299
- Akinyi, M. Y., Tung, J., Jeneby, M., Patel, N. B., Altmann, J., & Alberts, S. C. (2013). Role of Grooming in Reducing Tick Load in Wild Baboons (*Papio cynocephalus*). *Animal Behaviour*, 85(3), 559-568. doi:10.1016/j.anbehav.2012.12.012
- Almeida, M. A. B., Cardoso, J. d. C., dos Santos, E., da Fonseca, D. F., Cruz, L. L., Faraco, F. J. C., . . . Flannery, B. (2014). Surveillance for Yellow Fever Virus in Non-Human Primates in Southern Brazil, 2001–2011: A Tool for Prioritizing Human Populations for Vaccination. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(3), e2741. doi:10.1371/journal.pntd.0002741

- Altizer, S., Nunn, C. L., Thrall, P. H., Gittleman, J. L., Antonovics, J., Cunningham, A. A., . . . Pulliam, J. R. C. (2003). Social Organization and Parasite Risk in Mammals: Integrating Theory and Empirical Studies. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 34(1), 517-547. doi:10.1146/annurev.ecolsys.34.030102.151725
- Asher, A. J., Waldron, L. S., & Power, M. L. (2011). Evaluation of a PCR protocol for sensitive detection of *Giardia intestinalis* in human faeces. *Parasitology Research*, 110(2), 853-858. doi:10.1007/s00436-011-2565-3
- Atherton, R., Bhavnani, D., Calvopiña, M., Vicuña, Y., Cevallos, W., & Eisenberg, J. (2013). Molecular identification of *Giardia duodenalis* in Ecuador by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108(4), 512-515. doi:10.1590/0074-0276108042013019
- Ballweber, L. R., Xiao, L., Bowman, D. D., Kahn, G., & Cama, V. A. (2010). Giardiasis in dogs and cats: update on epidemiology and public health significance. *Trends in Parasitology*, 26(4), 180-189. doi:10.1016/j.pt.2010.02.005
- Baque, R. H., Gilliam, A. O., Robles, L. D., Jakubowski, W., & Slifko, T. R. (2011). A real-time RT-PCR method to detect viable *Giardia lamblia* cysts in environmental waters. *Water Research*, 45(10), 3175-3184. doi:10.1016/j.watres.2011.03.032
- Baratloo, A., Hosseini, M., Negida, A., & El Ashal, G. (2015). Part 1: Simple Definition and Calculation of Accuracy, Sensitivity and Specificity. *Emergency*, 3(2), 48-49.
- Barber, I., & Dingemans, N. J. (2010). Parasitism and the evolutionary ecology of animal personality. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1560), 4077-4088. doi:10.1098/rstb.2010.0182
- Beck, R., Sprong, H., Bata, I., Lucinger, S., Pozio, E., & Cacciò, S. M. (2011). Prevalence and molecular typing of *Giardia* spp. in captive mammals at the zoo of Zagreb, Croatia. *Veterinary Parasitology*, 175(1-2), 40-46. doi:10.1016/j.vetpar.2010.09.026

- Berrilli, F., Prisco, C., Friedrich, K. G., Di Cerbo, P., Di Cave, D., & De Liberato, C. (2011). *Giardia duodenalis* assemblages and *Entamoeba* species infecting non-human primates in an Italian zoological garden: zoonotic potential and management traits. *Parasites & Vectors*, *4*, 199-199. doi:10.1186/1756-3305-4-199
- Blacklock, B., & Adler, S. (1922). The Pathological Effects Produced by *Strongyloides* in a Chimpanzee. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, *16*(3), 283-290. doi:10.1080/00034983.1922.11684317
- Borg, C., Majolo, B., Qarro, M., & Semple, S. (2014). A Comparison of Body Size, Coat Condition and Endoparasite Diversity of Wild Barbary Macaques Exposed to Different Levels of Tourism. *Anthrozoös*, *27*(1), 49-63. doi:10.2752/175303714x13837396326378
- Brent, L. J. N., Lehmann, J., & Ramos-Fernández, G. (2011). Social network analysis in the study of nonhuman primates: A historical perspective. *American journal of primatology*, *73*(8), 720-730. doi:10.1002/ajp.20949
- Brynildsrud, O., Tysnes, K. R., Robertson, L. J., & Debenham, J. J. (2018). *Giardia duodenalis* in primates: Classification and host specificity based on phylogenetic analysis of sequence data. *Zoonoses and Public Health*, *65*(6), 637-647. doi:10.1111/zph.12470
- Cacció, S. M., Beck, R., Lalle, M., Marinculic, A., & Pozio, E. (2008). Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblages A and B. *International Journal for Parasitology*, *38*(13), 1523-1531. doi:10.1016/j.ijpara.2008.04.008
- Cacció, S. M., De Giacomo, M., & Pozio, E. (2002). Sequence analysis of the beta-giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal

- samples. *International Journal for Parasitology*, 32(8), 1023-1030.  
doi:10.1016/S0020-7519(02)00068-1
- Cacciò, S. M., & Ryan, U. (2008). Molecular epidemiology of giardiasis. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 160(2), 75-80. doi:10.1016/j.molbiopara.2008.04.006
- CDC. (2016). *Giardia duodenalis* life cycle. In, *Division of Parasitic Diseases, Clifton Road, Atlanta, USA*.
- Cibot, M., Guillot, J., Lafosse, S., Bon, C., Seguya, A., & Krief, S. (2015). Nodular Worm Infections in Wild Non-human Primates and Humans Living in the Sebitoli Area (Kibale National Park, Uganda): Do High Spatial Proximity Favor Zoonotic Transmission? *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(10), e0004133. doi:10.1371/journal.pntd.0004133
- Cogswell, F., & Baker, D. (2008). Parasites of Non-human Primates. In D. Baker (Ed.), *Flynn's parasites of laboratory animals. Second Edition*. (pp. 693-743): Blackwell.
- Cordero, Oliver, Martínez, & Alamillo. (2014). Amebiasis, giardiasis y tricomoniasis. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 11(54), 3181-3193. doi:10.1016/S0304-5412(14)70757-7
- Cornejo, F., & de la Torre, S. (2015). *Cebus aequatorialis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2015.
- Cunningham, L. J., & Olson, P. D. (2010). Description of *Hymenolepis microstoma* (Nottingham strain): a classical tapeworm model for research in the genomic era. *Parasites & Vectors*, 3(1), 123. doi:10.1186/1756-3305-3-123
- Chapman, C. A., Bowman, D. D., Ghai, R. R., Gogarten, J. F., Goldberg, T. L., Rothman, J. M., . . . Walsh, C. (2012). Protozoan parasites in group-living primates: testing the biological island hypothesis. *American journal of primatology*, 74(6), 510-517. doi:10.1002/ajp.20992

- Chapman, C. A., Gillespie, T. R., & Goldberg, T. L. (2005). Primates and the Ecology of their Infectious Diseases: How will Anthropogenic Change Affect Host-Parasite Interactions? *Evolutionary Anthropology: Issues, News, and Reviews*, 14(4), 134-144. doi:10.1002/evan.20068
- Chinchilla, M., Guerrero, O., Gutiérrez- Espeleta, G. A., Sánchez, R., & Rodríguez Ortiz, B. (2005). Parásitos intestinales en monos congo *Alouatta palliata* (Primates: Cebidae) de Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 53, 437-445.
- Chinchilla, M., Guerrero, O. M., Gutierrez-Espeleta, G. A., Sánchez, R., & Valerio Campos, I. (2007). Parásitos en monos carablanca *Cebus capucinus* (Primates: Cebidae) de Costa Rica. *Parasitología latinoamericana*, 62, 170-175. doi:10.4067/S0717-77122007000200011
- Daszak, P., Cunningham, A. A., & Hyatt, A. D. (2001). Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. *Acta Tropica*, 78(2), 103-116. doi:10.1016/S0001-706X(00)00179-0
- David, É. B., Patti, M., Coradi, S. T., Oliveira-Sequeira, T. C. G., Ribolla, P. E. M., & Guimarães, S. (2014). Molecular typing of *Giardia duodenalis* isolates from nonhuman primates housed in a brazilian zoo. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 56(1), 49-54. doi:10.1590/s0036-46652014000100007
- de la Torre, S. (2010). Los primates ecuatorianos, estudios y perspectivas. *Avances en Ciencias e Ingenierias*, 2, B27-B35. doi:10.18272/aci.v2i2.30
- de la Torre, S. (2012). Conservation of Neotropical primates: Ecuador — a case study. *International Zoo Yearbook*, 46, 25-35. doi:10.1111/j.1748-1090.2011.00158.x
- de la Torre, S., Arcos, D. R., Pozo, R., Zapata Ríos, G., & Tirira, D. G. (2011). Mono capuchino blanco de Oriente (*Cebus albifrons cuscinus*). In D. G. Tirira (Ed.), *Libro Rojo de los Mamíferos del Ecuador. 2da. Edición. Versión 1.* (pp. 246). Quito:

Fundación Mamíferos y Conservación Pontificia Universidad Católica del Ecuador y Ministerio del Ambiente. .

de la Torre, S., Morales, A., Link, A., & Cornejo, F. (2015). *Cebus albifrons* (errata version published in 2017). The IUCN Red List of Threatened Species 2015.

Debenham, J. J., Atencia, R., Midtgaard, F., & Robertson, L. J. (2015). Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in captive chimpanzees (*Pan troglodytes*), mandrills (*Mandrillus sphinx*) and wild Zanzibar red colobus monkeys (*Procolobus kirkii*). *Journal of Medical Primatology*, 44(2), 60-65. doi:10.1111/jmp.12158

Debenham, J. J., Tysnes, K., Khunger, S., & Robertson, L. J. (2017). Occurrence of *Giardia*, *Cryptosporidium*, and *Entamoeba* in wild rhesus macaques (*Macaca mulatta*) living in urban and semi-rural North-West India. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 6(1), 29-34. doi:10.1016/j.ijppaw.2016.12.002

Dorris, M., Viney, M. E., & Blaxter, M. L. (2002). Molecular phylogenetic analysis of the genus *Strongyloides* and related nematodes. *International Journal for Parasitology*, 32(12), 1507-1517. doi:10.1016/S0020-7519(02)00156-X

Duboscq, J., Romano, V., Sueur, C., & MacIntosh, A. J. J. (2016). Network centrality and seasonality interact to predict lice load in a social primate. *Scientific Reports*, 6, 22095. doi:10.1038/srep22095

Durigan, M., Abreu, A. G. c., Zucchi, M. I., Franco, R. M. B., & de Souza, A. P. (2014). Genetic Diversity of *Giardia duodenalis*: Multilocus Genotyping Reveals Zoonotic Potential between Clinical and Environmental Sources in a Metropolitan Region of Brazil. *PLoS ONE*, 9(12), e115489. doi:10.1371/journal.pone.0115489

Durigan, M., Ciampi-Guillardi, M., Rodrigues, R. C. A., Greinert-Goulart, J. A., Siqueira-Castro, I. C. V., Leal, D. A. G., . . . Souza, A. P. (2017). Population genetic analysis of



- Giardia duodenalis*: genetic diversity and haplotype sharing between clinical and environmental sources. *MicrobiologyOpen*, 6(2), e00424. doi:10.1002/mbo3.424
- Fajardo-Sanchez, J., Lasso-Narváez, M., Milena Mera-Eraso, C., Stadlin, J., Iván Zapata-Valencia, J., & Rojas-Cruz, C. (2014). Potential zoonotic enteric parasites in animals in captivity at the zoo in Cali, Colombia. *Neotropical Helminthology*, 8 (2), 279-290.
- Farine, D. R., & Whitehead, H. (2015). Constructing, conducting and interpreting animal social network analysis. *The Journal of Animal Ecology*, 84(5), 1144-1163. doi:10.1111/1365-2656.12418
- Faust, C., & Dobson, A. P. (2015). Primate malarias: Diversity, distribution and insights for zoonotic *Plasmodium*. *One Health*, 1, 66-75. doi:10.1016/j.onehlt.2015.10.001
- Feng, Y., & Xiao, L. (2011). Zoonotic Potential and Molecular Epidemiology of *Giardia* Species and Giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(1), 110-140. doi:10.1128/cmr.00033-10
- Flint, B. F., Hawley, D. M., & Alexander, K. A. (2015). Do not feed the wildlife: associations between garbage use, aggression, and disease in banded mongooses (*Mungos mungo*). *Ecology and Evolution*, 6(16), 5932-5939. doi:10.1002/ece3.2343
- 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. doi:10.1016/j.anbehav.2016.04.006
- Gelanew, T., Lalle, M., Hailu, A., Pozio, E., & Cacciò, S. M. (2007). Molecular characterization of human isolates of *Giardia duodenalis* from Ethiopia. *Acta Tropica*, 102(2), 92-99. doi:10.1016/j.actatropica.2007.04.003
- Gillespie, T. R. (2004). *Effects of human disturbance on primate-parasite dynamics*. Ph.D. dissertation. University of Florida, Gainesville.

- Godfrey, S. S. (2013). Networks and the ecology of parasite transmission: A framework for wildlife parasitology(). *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 2, 235-245. doi:10.1016/j.ijppaw.2013.09.001
- Godfrey, S. S., Moore, J. A., Nelson, N. J., & Bull, C. M. (2010). Social network structure and parasite infection patterns in a territorial reptile, the tuatara (*Sphenodon punctatus*). *International Journal for Parasitology*, 40(13), 1575-1585. doi:10.1016/j.ijpara.2010.06.002
- Gómez, Nunn, C. L., & Verdú, M. (2013). Centrality in primate-parasite networks reveals the potential for the transmission of emerging infectious diseases to humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(19), 7738-7741. doi:10.1073/pnas.1220716110
- Gómez, M., 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. doi:10.1111/j.1600-0684.1996.tb00038.x
- Gotfred-Rasmussen, H., Lund, M., Enemark, H. L., Erlandsen, M., & Petersen, E. (2015). Comparison of sensitivity and specificity of 4 methods for detection of *Giardia duodenalis* in feces: immunofluorescence and PCR are superior to microscopy of concentrated iodine-stained samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 84(3), 187-190. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2015.11.005
- Graczyk, Bosco-Nizeyi, J., Ssebide, B., Thompson, R. C. A., Read, C., & Cranfield, M. R. (2002). Anthropozoonotic *Giardia duodenalis* genotype (assemblage) A infections in habitats of free-ranging human-habituated gorillas, Uganda. *Journal of Parasitology*, 88(5), 905-909. doi:10.1645/0022-3395(2002)088[0905:agdga]2.0.co;2

- Graczyk, Grimes, H. B., Knight, R., Silva, A., Pieniazek, J. N., & Veal, D. (2003). Detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* carried by synanthropic flies by combined fluorescent in situ hybridization and a monoclonal antibody. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 68(2), 228-232. doi:10.3410/f.1012822.187302
- Grear, D. A., Luong, L. T., & Hudson, P. J. (2013). Network transmission inference: Host behavior and parasite life cycle make social networks meaningful in disease ecology. *Ecological Applications*, 23(8), 1906-1914. doi:10.1890/13-0907.1
- Grear, D. A., Perkins, S. E., & Hudson, P. J. (2009). Does elevated testosterone result in increased exposure and transmission of parasites? *Ecology Letters*, 12(6), 528-537. doi:10.1111/j.1461-0248.2009.01306.x
- Guerrero, M. F., Serrano-Martínez, E., Tantaleán, M., Quispe, H. M., & Casas, V. G. (2012). Identificación de parásitos gastrointestinales en primates no humanos del zoológico parque natural de Pucallpa, Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 23(4), 469-478. doi:10.15381/rivep.v23i4.962
- Habig, B., & Archie, E. A. (2015). Social status, immune response and parasitism in males: a meta-analysis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1669), 20140109. doi:10.1098/rstb.2014.0109
- Haff, L. A. (1994). Improved quantitative PCR using nested primers. *PCR Methods and applications*, 3(6), 332-337. doi:10.1101/gr.3.6.332
- Hakeem, A., Sandoval, G., Jones, M., & Allman, J. (1996). Brain and Life Span in Primates. In J. E. Birren & K. W. Schaie (Eds.), *Handbook of the psychology of aging* (pp. 78-104). San Diego: Academic Press.
- Haro, N., Chávez, A., Carrillo-Bilbao, G., & Martín Solano, S. (2017). *Living Area, Preference of Vertical Strata and Daily Activity of a Group of Cebus albifrons in*

- Misahualli, Napo, Ecuador: Preliminary Results*. Paper presented at the 7th European Federation for Primatology Meeting 30e Colloque de la Società Francophone de Primatologie., Strasbourg, France.
- Helenbrook, Stehman, S., Shields, W., & Whipps, C. (2017). Association of Anthropogenic Disturbances and Intestinal Parasitism in Ecuadorian Mantled Howler Monkeys, *Alouatta palliata aequatorialis*. *Folia Primatologica* 2017, 88, 307-322. doi:10.1159/000479687
- Helenbrook, Wade, Shields, Stehman, & Whipps. (2015). Gastrointestinal Parasites of Ecuadorian Mantled Howler Monkeys ( *Alouatta palliata aequatorialis* ) Based on Fecal Analysis. *The Journal of parasitology*, 101(3), 341-350. doi:10.1645/13-356.1
- Henazi, S. P., & Barrett, L. (1999). The value of grooming to female primates. *Primates*, 40(1), 47-59. doi:10.1007/bf02557701
- Hill, W. C. O. (1960). Primates: Comparative Anatomy and Taxonomy (Vol. IV *Cebidae* Part A. A Monograph.). Edinburgh: University Press.
- Hinde, R. A. (1976). Interactions, Relationships and Social Structure. *Man*, 11(1), 1-17. doi:10.2307/2800384
- Hogan, J. N., Miller, W. A., Cranfield, M. R., Ramer, J., Hassell, J., Noheri, J. B., . . . Gilardi, K. V. K. (2014). Giardia in mountain gorillas (*Gorilla beringei beringei*), forest buffalo (*Syncerus caffer*), and domestic cattle in volcanoes national park, rwanda. *Journal of Wildlife Diseases*, 50(1), 21-30. doi:10.7589/2012-09-229
- Hussain, S., Ram, M. S., Kumar, A., Shivaji, S., & Umapathy, G. (2013). Human Presence Increases Parasitic Load in Endangered Lion-Tailed Macaques (*Macaca silenus*) in Its Fragmented Rainforest Habitats in Southern India. *PLoS ONE*, 8(5), e63685. doi:10.1371/journal.pone.0063685

- Hughes, R. C. C. F. p. d. J. (1941). A Key to the Species of Tapeworms in *Hymenolepis*. *Transactions of the American Microscopical Society*, 60(3), 378-414. doi:10.2307/3222833
- Ignatius, R., Gahutu, J. B., Klotz, C., Steininger, C., Shyirambere, C., Lyng, M., . . . Mockenhaupt, F. P. (2012). High Prevalence of *Giardia duodenalis* Assemblage B Infection and Association with Underweight in Rwandan Children. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(6), e1677. doi:10.1371/journal.pntd.0001677
- Johnston, A. R., Gillespie, T. R., Rwego, I. B., Tranby McLachlan, T. L., Kent, A. D., & Goldberg, T. L. (2009). Molecular Epidemiology of Cross-Species *Giardia duodenalis* Transmission in Western Uganda. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(5), e683. doi:10.1371/journal.pntd.0000683
- Kappeler, P. M., & van Schaik, C. P. (2002). Evolution of Primate Social Systems. *International Journal of Primatology*, 23(4), 707-740. doi:10.1023/a:1015520830318
- Karim, M. R., Wang, R., Yu, F., Li, T., Dong, H., Li, D., . . . Xiao, L. (2015). Multi-locus analysis of *Giardia duodenalis* from nonhuman primates kept in zoos in China: Geographical segregation and host-adaptation of assemblage B isolates. *Infection, Genetics and Evolution*, 30, 82-88. doi:10.1016/j.meegid.2014.12.013
- Karim, M. R., Zhang, S., Jian, F., Li, J., Zhou, C., Zhang, L., . . . Xiao, L. (2014). Multilocus typing of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* from non-human primates in China. *International Journal for Parasitology*, 44(13), 1039-1047. doi:10.1016/j.ijpara.2014.07.006
- Kasprzak, W., & Pawlowski, Z. (1989). Zoonotic aspects of giardiasis: A review. *Veterinary Parasitology*, 32(2), 101-108. doi:10.1016/0304-4017(89)90110-6
- Kowalewski, M. M., Salzer, J. S., Deutsch, J. C., Raño, M., Kuhlenschmidt, M. S., & Gillespie, T. R. (2010). Black and gold howler monkeys (*Alouatta caraya*) as sentinels

- of ecosystem health: patterns of zoonotic protozoa infection relative to degree of human–primate contact. *American journal of primatology*, 73(1), 75-83.  
doi:10.1002/ajp.20803
- 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.
- Kummer, H. (1968). *Social organization of hamadryas baboons : a field study*. Chicago (Illinois): University of Chicago press.
- Lasek-Nesselquist, E., Bogomolni, A., Gast, R., Welch, D. M., Ellis, J. C., Sogin, M. L., & Moore, M. (2008). Molecular characterization of *Giardia intestinalis* haplotypes in marine animals: variation and zoonotic potential. *Diseases of Aquatic Organisms*, 81(1), 39-51. doi:10.3354/dao01931
- Lebbad, M., Mattsson, J. G., Christensson, B., Ljungström, B., Backhans, A., Andersson, J. O., & Svärd, S. G. (2010). From mouse to moose: Multilocus genotyping of *Giardia* isolates from various animal species. *Veterinary Parasitology*, 168(3-4), 231-239.  
doi:10.1016/j.vetpar.2009.11.003
- Lebbad, M., Petersson, I., Karlsson, L., Botero-Kleiven, S., Andersson, J. O., Svenungsson, B., & Svärd, S. G. (2011). Multilocus Genotyping of Human *Giardia* Isolates Suggests Limited Zoonotic Transmission and Association between Assemblage B and Flatulence in Children. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(8), e1262.
- Leroy, E. M., Telfer, P., Kumulungui, B., Yaba, P., Rouquet, P., Roques, P., . . . Nerrienet, E. (2004). A Serological Survey of Ebola Virus Infection in Central African Nonhuman Primates. *The Journal of Infectious Diseases*, 190(11), 1895-1899.  
doi:10.1086/425421

- 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(3-4), 236-246. doi:10.1016/j.vetpar.2007.06.020
- Levecke, B., Geldhof, P., Claerebout, E., Dorny, P., Vercammen, F., Cacciò, S. M., . . . Geurden, T. (2009). Molecular characterisation of *Giardia duodenalis* in captive non-human primates reveals mixed assemblage A and B infections and novel polymorphisms. *International Journal for Parasitology*, 39(14), 1595-1601. doi:10.1016/j.ijpara.2009.05.013
- Li, J., Dong, H., Wang, R., Yu, F., Wu, Y., Chang, Y., . . . Zhang, L. (2015). An investigation of parasitic infections and review of molecular characterization of the intestinal protozoa in nonhuman primates in China from 2009 to 2015. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 6(1), 8-15. doi:10.1016/j.ijppaw.2016.12.003
- Luján, H. D., Mowatt, M. R., & Nash, T. E. (1997). Mechanisms of *Giardia lamblia* differentiation into cysts. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 61(3), 294-304.
- Lloyd-Smith, J. O., George, D., Pepin, K. M., Pitzer, V. E., Pulliam, J. R. C., Dobson, A. P., . . . Grenfell, B. T. (2009). Epidemic dynamics at the human-animal interface. *Science (New York, N.Y.)*, 326(5958), 1362-1367. doi:10.1126/science.1177345
- 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*, 51(4), 353-364. doi:10.1007/s10329-010-0211-9
- 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. doi:10.1371/journal.pone.0051144
- Macnish, M. G., Ryan, U. M., Behnke, J. M., & Thompson, R. C. A. (2003). Detection of the rodent tapeworm *Rodentolepis* (= *Hymenolepis*) microstoma in humans. A new zoonosis? *International Journal for Parasitology*, 33(10), 1079-1085. doi:10.1016/S0020-7519(03)00137-1
- Mafuyai, H. B., Barshep, Y., Audu, B. S., Kumbak, D., & Ojobe, T. O. (2013). Baboons as potential reservoirs of zoonotic gastrointestinal parasite infections at Yankari National Park, Nigeria. *African Health Sciences*, 13(2), 252-254. doi:10.4314/ahs.v13i2.7
- Makarikov, A. A., Tkach, V. V., & Bush, S. E. (2013). Two New Species of *Hymenolepis* (Cestoda: Hymenolepididae) from Murid Rodents (Rodentia: Muridae) in the Philippines. *Journal of Parasitology*, 99(5), 847-855. doi:10.1645/12-173.1
- Martin-Solano, S., Carrillo-Bilbao, G. A., Bernstein, S., Martinage, A., Huynen, M.-C., Losson, B., . . . Wagner, S. (2013). *Primate behaviour and Parasite Transmission in the Ecuadorian Amazon*. Paper presented at the Congress of the European Federation for Primatology, Antwerp, Belgium.
- Martin-Solano, S., Carrillo-Bilbao, G. A., Ramirez, W., Celi-Eraza, M., Huynen, M.-C., Levecke, B., . . . Losson, B. (2017). Gastrointestinal parasites in captive and free-ranging *Cebus albifrons* in the Western Amazon, Ecuador. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 6(3), 209-218. doi:10.1016/j.ijppaw.2017.06.004
- Mati, V. L. T., Junior, F. C. F., Pinto, H. A., & de Melo, A. L. (2013). *Strongyloides cebus* (Nematoda: Strongyloididae) in *Lagothrix cana* (Primates: Atelidae) from the Brazilian Amazon: Aspects of Clinical Presentation, Anatomopathology, Treatment, and Parasitic Biology. *Journal of Parasitology*, 99(6), 1009-1018. doi:10.1645/13-288.1



- Matthews, L. (2009). Activity Patterns, Home Range Size, and Intergroup Encounters in *Cebus albifrons* Support Existing Models of Capuchin Socioecology. *International Journal of Primatology*, 30, 709-728. doi:10.1007/s10764-009-9370-1
- McDowall, R. M., Peregrine, A. S., Leonard, E. K., Lacombe, C., Lake, M., Rebelo, A. R., & Cai, H. Y. (2011). Evaluation of the zoonotic potential of *Giardia duodenalis* in fecal samples from dogs and cats in Ontario. *The Canadian Veterinary Journal*, 52(12), 1329-1333.
- Milozzi, C., Bruno, G., Cundom, E., Mudry, M., & Navone, G. (2012). Intestinal parasites of *Alouatta caraya* (Primates, Ceboidea): Preliminary study in semi-captivity and in the wild in Argentina. *Mastozoologia Neotropical*, 19(2), 271-278.
- Mullis. (1990). The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American*, 262(4), 56-61. 64-65. doi:10.1038/scientificamerican0490-56
- Negro, S. S., Caudron, A. K., Dubois, M., Delahaut, P., & Gemmell, N. J. (2010). Correlation between Male Social Status, Testosterone Levels, and Parasitism in a Dimorphic Polygynous Mammal. *PLoS ONE*, 5(9), e12507. doi:10.1371/journal.pone.0012507
- Nolan, M., Unger, M., Yeap, Y. T., Rogers, E., Millet, I., Harman, K., . . . Blake, D. (2017). Molecular characterisation of protist parasites in human-habituated mountain gorillas (*Gorilla beringei beringei*), humans and livestock, from Bwindi Impenetrable National Park, Uganda. *Parasites & Vectors*. doi:10.1186/s13071-017-2283-5
- Nunes, B. C., Calegar, D. A., Pavan, M. G., Jaeger, L. H., Monteiro, K. J. L., dos Reis, E. R. C., . . . Carvalho-Costa, F. A. (2018). Genetic diversity of *Giardia duodenalis* circulating in three Brazilian biomes. *Infection, Genetics and Evolution*, 59, 107-112. doi:10.1016/j.meegid.2018.02.001
- Nunes Coronato, B., Pavan, M., Jaeger, L. H., Monteiro, K. J. L., Xavier, S., Monteiro, F., . . . Carvalho-Costa, F. (2016). Spatial and Molecular Epidemiology of *Giardia*

- intestinalis* Deep in the Amazon, Brazil. *PLoS ONE*, 11(e0158805. ). doi:10.1371/journal.pone.0158805.
- Nunn, C. L., Thrall, P. H., Leendertz, F. H., & Boesch, C. (2011). The Spread of Fecally Transmitted Parasites in Socially-Structured Populations. *PLoS ONE*, 6(6), e21677. doi:10.1371/journal.pone.0021677
- Olsen, A., van Lieshout, L., Marti, H., Polderman, T., Polman, K., Steinmann, P., . . . Magnussen, P. (2009). Strongyloidiasis – the most neglected of the neglected tropical diseases? *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 103(10), 967-972. doi:10.1016/j.trstmh.2009.02.013
- Parr, N. A., Fedigan, L. M., & Kutz, S. J. (2013). A Coprological Survey of Parasites in White-Faced Capuchins (*Cebus capucinus*) from Sector Santa Rosa, ACG, Costa Rica. *Folia Primatologica*, 84(2), 102-114. doi:10.1159/000348287
- Penner, L. R. C. F. p. d. D. (1981). Concerning Threadworm (*Strongyloides stercoralis*) in Great Apes: Lowland Gorillas (*Gorilla gorilla*) and Chimpanzees (*Pan troglodytes*). *The Journal of Zoo Animal Medicine*, 12(4), 128-131. doi:10.2307/20094543
- Perkins, S. E., Ferrari, M. F., & Hudson, P. J. (2008). The effects of social structure and sex-biased transmission on macroparasite infection. *Parasitology*, 135(13), 1561-1569. doi: 10.1017/s0031182008000449
- 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. *Journal of Zoology*, 264(2), 149-151. doi:Doi: 10.1017/s0952836904005680
- Poulin, R. (1996). Sexual Inequalities in Helminth Infections: A Cost of Being a Male? *The American Naturalist*, 147(2), 287-295. doi:10.1086/285851

- Raharivololona, B., & Ganzhorn, J. (2010). Seasonal variations in gastrointestinal parasites excreted by the gray mouse lemur *Microcebus murinus* in Madagascar. *Endangered Species Research*, *11*, 113-122. doi:10.3354/esr00255
- Rimbach, R., Bisanzio, D., Galvis, N., Link, A., Di Fiore, A., & Gillespie, T. R. (2015). Brown spider monkeys (*Ateles hybridus*): a model for differentiating the role of social networks and physical contact on parasite transmission dynamics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *370*(1669), 20140110. doi:10.1098/rstb.2014.0110
- Robertson, L. J., Hanevik, K., Escobedo, A. A., Mørch, K., & Langeland, N. (2010). Giardiasis--why do the symptoms sometimes never stop? *Trends in Parasitology*, *26*(2), 75-82. doi:10.1016/j.pt.2009.11.010
- Romano, V., Duboscq, J., Sarabian, C., Thomas, E., Sueur, C., & MacIntosh, A. J. J. (2016). Modeling infection transmission in primate networks to predict centrality-based risk. *American journal of primatology*, *78*(7), 767-779. doi:10.1002/ajp.22542
- Rondón, S., Ortiz, M., León, C., Galvis, N., Link, A., & González, C. (2017). Seasonality, richness and prevalence of intestinal parasites of three neotropical primates (*Alouatta seniculus*, *Ateles hybridus* and *Cebus versicolor*) in a fragmented forest in Colombia. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, *6*(3), 202-208. doi:10.1016/j.ijppaw.2017.07.006
- Rushmore, J., Bisanzio, D., & Gillespie, T. R. (2017). Making New Connections: Insights from Primate-Parasite Networks. *Trends in Parasitology*, *20*. doi:10.1016/j.pt.2017.01.013
- Rushmore, J., Caillaud, D., Hall, R. J., Stumpf, R. M., Meyers, L. A., & Altizer, S. (2014). Network-based vaccination improves prospects for disease control in wild

- chimpanzees. *Journal of the Royal Society, Interface*, 11(97), 20140349-20140349. doi:10.1098/rsif.2014.0349
- Rushmore, J., Caillaud, D., Matamba, L., Stumpf Rebecca, M., Borgatti Stephen, P., & Altizer, S. (2013). Social network analysis of wild chimpanzees provides insights for predicting infectious disease risk. *Journal of Animal Ecology*, 82(5), 976-986. doi:10.1111/1365-2656.12088
- Ryan, U., & Cacciò, S. M. (2013). Zoonotic potential of *Giardia*. *International Journal for Parasitology*, 43(12-13), 943-956. doi:10.1016/j.ijpara.2013.06.001
- Sahagún, J., Clavel, A., Goñi, P., Seral, C., Llorente, M. T., Castillo, F. J., . . . Gómez-Lus, R. (2008). Correlation between the presence of symptoms and the *Giardia duodenalis* genotype. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 27(1), 81-83. doi:10.1007/s10096-007-0404-3
- Sak, B., Petrzalkova, K. J., Kvetonova, D., Mynárová, A., Pomajbíková, K., Modrý, D., . . . Kvac, Martin. (2014). Diversity of *Microsporidia*, *Cryptosporidium* and *Giardia* in Mountain Gorillas (*Gorilla beringei beringei*) in Volcanoes National Park, Rwanda. *PLoS ONE*, 9(11), e109751. doi:10.1371/journal.pone.0109751
- Sak, B., Petrzalkova, K. J., Kvetonova, D., Mynarova, A., Shutt, K. A., Pomajbíková, K., . . . Kvac, M. (2013). Long-Term Monitoring of *Microsporidia*, *Cryptosporidium* and *Giardia* Infections in Western Lowland Gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*) at Different Stages of Habituation in Dzanga Sangha Protected Areas, Central African Republic. *PLoS ONE*, 8(8), e71840. doi:10.1371/journal.pone.0071840
- Sánchez, A., Munoz, M., Gómez, N., Tabares, J., Segura, L., Salazar, A. n., . . . Ramírez, J. D. (2017). Molecular Epidemiology of *Giardia*, *Blastocystis* and *Cryptosporidium* among Indigenous Children from the Colombian Amazon Basin. *Frontiers in Microbiology*, 8, 248. doi:10.3389/fmicb.2017.00248

- Sarzosa, M., Graham, J., Salinda, L., & Trueba, G. (2018). Potential Zoonotic Transmission of *Giardia duodenalis* in Semi-rural Communities Near Quito, Ecuador. *Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, 16, 6.
- Saunders, C. D., & Hausfater, G. (1988). The Functional Significance of Baboon Grooming Behavior. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 525(1), 430-432. doi:10.1111/j.1749-6632.1988.tb38635.x
- Savioli, L., Smith, H., & Thompson, A. (2006). *Giardia* and *Cryptosporidium* join the Neglected Diseases Initiative. *Trends in Parasitology*, 22(5), 203-208. doi:10.1016/j.pt.2006.02.015
- Silk, M. J., Croft, D. P., Delahay, R. J., Hodgson, D. J., Boots, M., Weber, N., & McDonald, R. A. (2017). Using Social Network Measures in Wildlife Disease Ecology, Epidemiology, and Management. *Bioscience*, 67(3), 245-257. doi:10.1093/biosci/biw175
- Smuts, B., Cheney, D., Seyfarth, R., Wrang-ham, T., & Struhsaker. (1987). *Primate Societies*. Chicago, Illinois, USA.: The University of Chicago Press.
- Soares, R. M., de Souza, S. L. P., Silveira, L. H., Funada, M. R., Richtzenhain, L. J., & Gennari, S. M. (2011). Genotyping of potentially zoonotic *Giardia duodenalis* from exotic and wild animals kept in captivity in Brazil. *Veterinary Parasitology*, 180(3-4), 344-348. doi:10.1016/j.vetpar.2011.03.049
- Solórzano-García, & Pérez-Ponce de León. (2018). Parasites of Neotropical Primates: A Review. *International Journal of Primatology*, 39, 155. doi:10.1007/s10764-018-0031-0
- Soto-Calderón, I. D., Acevedo-Garcés, Y. A., Álvarez-Cardona, J., Hernández-Castro, C., & García-Montoya, G. M. (2016). Physiological and parasitological implications of

- living in a city: the case of the white-footed tamarin (*Saguinus leucopus*). *American journal of primatology*, 78(12), 1272-1281. doi:10.1002/ajp.22581
- Springer, A., Fichtel, C., Calvignac-Spencer, S., Leendertz, F. H., & Kappeler, P. M. (2015). Hemoparasites in a wild primate: Infection patterns suggest interaction of *Plasmodium* and *Babesia* in a lemur species. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 4(3), 385-395. doi:10.1016/j.ijppaw.2015.10.006
- Sricharern, W., Inpankaew, T., Keawmongkol, S., Supanam, J., Stich, R. W., & Jittapalapong, S. (2016). Molecular detection and prevalence of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. among long-tailed macaques (*Macaca fascicularis*) in Thailand. *Infection, Genetics and Evolution*, 40, 310-314. doi:10.1016/j.meegid.2016.02.004
- 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 anthrozoönotic transmission. *American Journal of Physical Anthropology*, 140(3), 498-507. doi:10.1002/ajpa.21098
- Terborgh, J. (1983). *Five New World Primates: A Study in Comparative Ecology*: Princeton University Press.
- Thatcher, H., Downs, C., & Koyama, N. (2018). Using Parasitic Load to Measure the Effect of Anthropogenic Disturbance on Vervet Monkeys. *Ecohealth*, 15(3), 676-681. doi:10.1007/s10393-018-1349-y
- Thompson. (2004). The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Veterinary Parasitology*, 126(1), 15-35. doi:10.1016/j.vetpar.2004.09.008
- Thompson. (2013). Parasite zoonoses and wildlife: One health, spillover and human activity. *International Journal for Parasitology*, 43(12-13), 1079-1088. doi:10.1016/j.ijpara.2013.06.007

- Thompson, & Ash. (2016). Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections. *Infection, Genetics and Evolution*, 40, 315-323. doi:10.1016/j.meegid.2015.09.028
- Thompson, Kutz, & Smith. (2009). Parasite Zoonoses and Wildlife: Emerging Issues. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 6(2), 678-693. doi:10.3390/ijerph6020678
- Thompson, & Monis. (2004). Variation in *Giardia*: Implications for Taxonomy and Epidemiology. *Advances in Parasitology*, 58, 69-137. doi:10.1016/S0065-308X(04)58002-8
- Thompson, & Monis. (2011). Taxonomy of *Giardia* Species. In H. D. Luján & S. G. Svärd (Eds.), *Giardia: a model organism*. (pp. 3-15).
- Tirira, D. (2007a). Monos en la Costa. Los primates de los Bosques en el Occidente de Ecuador *PRIMENET Primates en la Costa de Ecuador* (pp. 8-16).
- Tirira, D. (2007b). Orden Primates: Primates. *Guía de campo de los mamíferos del Ecuador* (pp. 114-124).
- Urcroft, P., & Urcroft, J. A. (2001). Drug Targets and Mechanisms of Resistance in the Anaerobic Protozoa. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(1), 150-164. doi:10.1128/cmr.14.1.150-164.2001
- van Keulen, H., Macechko, P. T., Wade, S., Schaaf, S., Wallis, P. M., & Erlandsen, S. L. (2002). Presence of human *Giardia* in domestic, farm and wild animals, and environmental samples suggests a zoonotic potential for giardiasis. *Veterinary Parasitology*, 108(2), 97-107. doi:10.1016/S0304-4017(02)00181-4
- Van Schaik, C. P. (1983). Why Are Diurnal Primates Living in Groups? *Behaviour*, 87(1), 120-144. doi:10.1163/156853983X00147

- Vasilopoulos, R. J., Rickard, L. G., Mackin, A. J., Pharr, G. T., & Huston, C. L. (2008). Genotypic Analysis of *Giardia duodenalis* in Domestic Cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, *21*(2), 352-355. doi:10.1111/j.1939-1676.2007.tb02974.x
- Verweij, J. J., Vermeer, J., Brienens, 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. doi:10.1007/s00436-002-0808-z
- Villanúa, D., Pérez-Rodríguez, L., Gortázar, C., Höfle, U., & Viñuela, J. (2006). Avoiding bias in parasite excretion estimates: the effect of sampling time and type of faeces. *Parasitology*, *133*(2), 251-259. doi:10.1017/s003118200600031x
- Viney, M., & Lok, J. B. (2015). The biology of *Strongyloides* spp. In T. C. e. R. Community (Ed.), WormBook. doi:10.1895/wormbook.1.141.2
- 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. doi:10.1002/ajp.20309
- Volotão, A. C. C., Júnior, J. C. S., Grassini, C., Peralta, J. M., & Fernandes, O. (2008). Genotyping of *Giardia duodenalis* from Southern Brown Howler Monkeys (*Alouatta clamitans*) from Brazil. *Veterinary Parasitology*, *158*(1-2), 133-137. doi:10.1016/j.vetpar.2008.07.003
- Wang, H., Zhao, G., Chen, G., Jian, F., Zhang, S., Feng, C., . . . Zhang, L. (2014). Multilocus Genotyping of *Giardia duodenalis* in Dairy Cattle in Henan, China. *PLoS ONE*, *9*(6), e100453. doi:10.1371/journal.pone.0100453
- Wenz-MüCke, A., Sithithaworn, P., Petney, T. N., & Taraschewski, H. (2012). Human contact influences the foraging behaviour and parasite community in long-tailed macaques. *Parasitology*, *140*(6), 709-718. doi:Doi: 10.1017/s003118201200203x



- White, L. A., Forester, J. D., & Craft, M. E. (2017). Using contact networks to explore mechanisms of parasite transmission in wildlife. *Biological Reviews*, 92(1), 389-409. doi:10.1111/brv.12236
- WHO. (1996). *The World Health report: 1996 - Fighting disease, fostering development*. Geneva: World Health Organization.
- Wielinga, C., Thompson, R. C. A., Monis, P., & Ryan, U. (2015). Identification of polymorphic genes for use in assemblage B genotyping assays through comparative genomics of multiple assemblage B *Giardia duodenalis* isolates. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 201(1), 1-4. doi:10.1016/j.molbiopara.2015.05.002
- Wrangham, R. W. (1980). An Ecological Model of Female-Bonded Primate Groups. *Behaviour*, 75(3), 262-300. doi:10.1163/156853980X00447
- Ye, J., Xiao, L., Li, J., Huang, W., Amer, S. E., Guo, Y., . . . Feng, Y. (2013). Occurrence of human-pathogenic *Enterocytozoon bieneusi*, *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* genotypes in laboratory macaques in Guangxi, China. *Parasitology International*, 63(1), 132-137. doi:10.1016/j.parint.2013.10.007
- Zanzani, S. A., Gazzonis, A. L., Epis, S., & Manfredi, M. T. (2016). Study of the gastrointestinal parasitic fauna of captive non-human primates (*Macaca fascicularis*). *Parasitology Research*, 115(1), 307-312. doi:10.1007/s00436-015-4748-9
- Zhong, Z., Tian, Y., Li, W., Huang, X., Deng, L., Cao, S., . . . Peng, G. (2017). Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* in captive non-human primates in Sichuan and Guizhou provinces, Southwestern China. *PLoS ONE*, 12(9), e0184913. doi:10.1371/journal.pone.0184913

