

Evaluación de técnicas para la conservación y cultivo de parásitos gastrointestinales en primates de vida silvestre¹

Fernando Nassar Montoya* / Victoria Pereira Bengoa** /
Diana Marcela Barrera Pinillos***

RESUMEN

La obtención en campo de una muestra de materia fecal de buena calidad de un primate del nuevo mundo es normalmente un proceso costoso que toma tiempo, por lo que es necesario asegurar su buen manejo mediante la optimización de las técnicas de preservación y diagnóstico. En los estudios parasitarios realizados por el Centro Araguatos, se han obtenido larvas a partir de coprocultivos junto con la preservación de materia fecal en medios conservantes (MIF), lo que ha permitido profundizar en el estudio de los parásitos de los monos en vida libre. Sin embargo, se han presentado algunos inconvenientes como el desecamiento rápido de las muestras de cultivo fecal y limitaciones en la implementación de las pruebas cuantitativas de diagnóstico. Este trabajo evaluó efecto, utilidad y limitaciones de las técnicas de coprocultivos y conservación de huevos y ooquistes en medio MIF, para los estudios de los endoparásitos de micos del nuevo mundo en vida silvestre. Los resultados muestran que se puede implementar una metodología eficiente y de fácil acceso para la conservación y análisis parasitario de las muestras fecales de los primates del nuevo mundo, mediante la utilización conjunta de los cultivos fecales y la conservación de huevos en un medio (MIF). Esto incrementa el alcance de los estudios y mejora las posibilidades de diagnóstico. Las larvas en los cultivos fecales presentan un mejor crecimiento en una proporción de muestra: sustrato (aserrín) de 1:1 en períodos comprendidos entre 7 y 15 días. Una buena dilución de muestra fecal: MIF para la conservación de huevos y ooquistes es de 1:10.

Palabras clave: primates del nuevo mundo, parásitos de primates, coprocultivo, conservación de parásitos, MIF.

EVALUATION OF PROCEDURES FOR THE CONSERVATION AND CULTURE OF GASTROINTESTINAL PARASITES FROM FREE RANGING PRIMATES

ABSTRACT

Obtaining good quality fecal samples from free-ranging New World Primates is normally a slow and expensive task. So, it is necessary to ensure good sample handling for the optimisation of preservation and diagnosis. During some parasitological studies carried out by the Centro Araguatos, we obtained larvae from coprocultures and fecal samples preserved in a preservative (MIF). These procedures allowed us to study deeper the parasites of free-ranging monkeys. However, we have found problems: like the rapid desiccation of fecal samples in the coprocultures and some limitations on the implementation of the quantitative diagnostic procedures. This study evaluated the effect, use and limitations of using coprocultures and conserving the parasite eggs and cysts in MIF for the study of parasites in free-ranging New World Primates. The results show that it is possible to implement an efficient methodology for the conservation and parasitological analysis of fecal samples of New World Primates using both coprocultures and eggs conserved in MIF. This enhances the capacity of studies and improves diagnostic possibility. The larvae in the fecal samples show better growth in a proportion of fecal sample: substrate (sawdust) of 1:1, in culturing periods ranging from 7 to 15 days. A good dilution of feces: MIF for the conservation of eggs and quists is 1:10.

Key words: new world primates, primate parasites, coprocultures, parasite preservation, MIF.

¹ Investigación financiada por la Fundación Araguatos y Centro de Primatología Araguatos. Grupo de Investigación Medicina de la Conservación, Universidad de La Salle-Fundación Araguatos. Carrera 7 No. 172-85, Bogotá, Colombia. Correo electrónico: araguatos@etb.net.co

* Médico Veterinario, ULS. Fundación Araguatos y Centro de Primatología Araguatos. E-mail: araguatos@etb.net.co

** Médica Veterinaria, ULS. Profesora asistente Facultad de Medicina Veterinaria.

*** Médica Veterinaria, ULS.

INTRODUCCIÓN

El estudio de las infecciones parasitarias en los primates no humanos en vida silvestre ha despertado el interés de los investigadores de diferentes disciplinas por varios motivos, como por ejemplo las estrechas relaciones entre el ser humano y este grupo animal, de gran interés para la salud pública; las relaciones coevolutivas parásito-huésped proveen información sobre los eventos de especiación y filogenia y el efecto de la intervención antropogénica sobre la dinámica de los parásitos es importante en el análisis de la conservación de las especies (Walsh *et al.*, 1993; Stuart & Strier, 1995; Sorci *et al.*, 1997; Muriuki *et al.*, 1998; Stoner, 1996; Fandeur *et al.*, 2000). Sin embargo, el conocimiento de los parásitos de los primates del nuevo mundo es limitado por varias razones, entre las que se mencionan la confusión en la nomenclatura de los parásitos y huéspedes, la falta de interés en el examen del contenido intestinal por los investigadores, la dificultad en el acceso a las revistas latinoamericanas especializadas, la falta de recursos y de experiencia en la región, y que los trabajos comprenden pocos grupos parasitarios (Stuart *et al.*, 1998; Nassar-Montoya *et al.*, 2003).

Las muestras fecales obtenidas en primates de vida silvestre pueden proporcionar amplia información, no solamente sobre parasitismos intestinales, sino también sobre la ecología alimenticia, dispersión de semillas y endocrinología de la especie (Setchell & Curtis, 2003). La materia fecal se colecta directamente del recto cuando se capturan individuos o es posible recogerla en el campo inmediatamente después de depositada, para lo que es necesario observar y seguir los animales. Una vez obtenidas, en el sitio se pueden mirar al microscopio utilizando diferentes técnicas para la identificación de los parásitos (Ancrenaz *et al.*, 2003); pero la efectividad de este examen es limitada en muchas especies

silvestres por la similitud de los huevos, larvas y ooquistes, y por la falta de helmintos adultos que ayuden a confirmar los diagnósticos (Stuart & Strier, 1995; Stuart *et al.*, 1998). Es recomendable entonces, conservar las muestras hasta que puedan ser examinadas detalladamente en un laboratorio y en lo posible utilizar métodos que enriquezcan los procedimientos de identificación y evaluación del parásito.

La literatura ofrece una amplia gama de técnicas para la preservación y examen de los parásitos fecales (ver por ejemplo, Lamonthé, 1997; Cordero del Campillo & Rojo Vásquez, 1999; Hendrix, 1999), que lógicamente pueden ser utilizadas en primates no humanos. Sin embargo, para la buena toma y preservación de las muestras de primates del nuevo mundo en vida silvestre se presentan algunos retos, que finalmente definen la calidad y confiabilidad de los resultados. Éstos son entre otros, los pequeños volúmenes de las deposiciones en muchas especies, la dificultad de colección dentro del bosque debido a los hábitos arbóreos de los micos, las variaciones de humedad y temperatura en el trópico, las altas precipitaciones en algunas zonas y la dificultad de acceso a las áreas boscosas. También el temperamento tímido y huidizo de la mayoría de las especies, hace difícil obtener muestras recién evacuadas, a excepción del mono aullador (*Alouatta* sp.) que es relativamente más fácil de seguir y con frecuencia defeca volúmenes grandes de materia fecal al detectar observadores, lo que definitivamente facilita los estudios parasitológicos y explicaría por qué una buena parte de la información proveniente de la vida silvestre sobre los parásitos gastrointestinales corresponden a este género (Stuart *et al.*, 1998).

Por tanto, obtener en campo una muestra de buena calidad de un primate del nuevo mundo no es una tarea fácil, ya que normalmente es un proceso

costoso que toma tiempo. Es indispensable, por tanto, asegurar su buen manejo mediante la optimización de las técnicas de preservación y diagnóstico. En el Centro Araguatos se han obtenido larvas a partir de coprocultivos, que es procedimiento económico y viable en el contexto latinoamericano para ser implementado en el estudio de los primates en campo, ya que definitivamente incrementa las posibilidades de identificación taxonómica de los nemátodos (Chaker *et al.*, 1984; Pit *et al.*, 1999). Esta técnica, junto con la preservación de materia fecal en medios conservantes, ha permitido un estudio más detallado, preciso y exacto (válido) (Brieva, 2002; Nassar-Montoya *et al.*, 2003).

Sin embargo, se han identificado algunos problemas, como por ejemplo el desecamiento rápido de las muestras de cultivo fecal y limitaciones en la implementación de las pruebas cuantitativas de diagnóstico. Esto demostró la necesidad de evaluar los métodos utilizados para estandarizar los procedimientos. Entonces, este trabajo tuvo como objetivo la evaluación del efecto, utilidad y limitaciones de las técnicas de coprocultivos y conservación de huevos y ooquistes en medio MIF, para los estudios cuantitativos y cualitativos de los endoparásitos de micos del nuevo mundo en vida silvestre.

MATERIALES Y MÉTODOS

CULTIVO FECAL PARASITOLÓGICO

Tamaño contenedor y proporción muestra-sustrato. Se realizaron 30 cultivos fecales en cajas de Petri plásticas de 100 x 15 mm (Tamaño 1: T1) y 30 en cajas de 65 x 15 mm (Tamaño 2: T2), con aserrín grueso como sustrato. Cada tamaño se dividió en tres grupos de 10 cajas, a las que se les colocaron las siguientes cantidades de muestra fecal - sustrato: 1 gr de muestra fecal + 1 gr de sustrato: (1:1), 1 gr de

muestra fecal + 0.75 gr de sustrato: (1:0.75) y 1 gr de muestra fecal + 0 gr de sustrato: (1:0). Fue necesario utilizar la materia fecal de un bovino para obtener suficiente cantidad para hacer el cultivo y disminuir el efecto de la muestra *per se* sobre los resultados (Ye *et al.*, 1997). Se adicionaron unas gotas de carbonato de calcio al 1.5% para evitar el crecimiento de hongos. Los cultivos se guardaron en el laboratorio a temperatura ambiente y se abrieron y airearon periódicamente hasta que se cosecharon a los 12 días de sembrados, cuando se realizó la técnica de Baermann para obtener las larvas (Vélez, 1983). Los tubos se centrifugaron posteriormente durante dos minutos a 1500 r.p.m. (Centrifuga Clay Adams®. Estados Unidos) y con una pipeta se tomó el sedimento, para realizar el conteo de larvas en tercer estadio (L3) y adultos de vida libre (AVL) al microscopio de luz (CHT, Olympus Optical Co, Japón). Los resultados se analizaron con la ayuda de la prueba de ANOVA y de correlación de Spearman, con un nivel de significancia ≤ 0.05 .

Tiempo de cultivo. Para evaluar el efecto del tiempo de cultivo en la cosecha de larvas de nemátodos, se utilizó materia fecal de mono ardilla (*Saimiri sciureus*) que se obtuvo en el Zoológico Parque Jaime Duque, de la misma manera que se obtienen las muestras en campo; es decir, una vez se observó un animal defecando, se buscó la muestra en el sitio y se recogió. Posteriormente se hizo un pool con todas las muestras fecales colectadas del grupo para realizar 10 cultivos de similares características con 1 gr de materia fecal + 1 gr de aserrín grueso en cajas de Petri plásticas de 100 x 15 mm. Los cultivos se mantuvieron de la misma manera que el experimento anterior, y de cada uno se cosecharon las larvas a los 7 y 15 días para su conteo de acuerdo con los procedimientos descritos para éste. En este caso se contabilizaron también larvas en estadio 2 (L2). Para los análisis estadísticos se hizo una correlación de Spearman, con un nivel de significancia ≤ 0.05 .

EFFECTO DE LA DILUCIÓN DE LA MUESTRA EN MEDIO MIF

El medio MIF se preparó según las indicaciones de Vélez (1983). Para esta parte del estudio se hizo un pool de materia fecal del grupo de monos maiceros (*Cebus apella*) del Zoológico Parque Jaime Duque de la misma manera que se describió para los monos ardillas. Posteriormente, en 10 frascos de vidrio color ámbar de 20 ml se colocó 1 gr de muestra fecal + 10 ml de MIF, para obtener una proporción de Muestra: MIF de 1:10, y en 10 frascos, 1 gr de muestra fecal + 5 ml de MIF, para obtener una proporción de Muestra: MIF de 1:5. Después de 10 días el contenido del frasco se homogenizó y se tomó un gramo de muestra, que se centrifugó para obtener el sedimento con el cual se realizó el conteo de huevos de nemátodos y de eimerias mediante las técnicas de McMaster en solución salina (5 muestras para cada dilución) y MIF concentración (5 muestras para cada dilución) (Muller & Beer, 1979; Vélez, 1983; Esteban, 1999). Los resultados se analizaron con la ayuda de la prueba de ANOVA y de correlación de Spearman, con un nivel de significancia ≤ 0.05 .

RESULTADOS

CULTIVO FECAL PARASITOLÓGICO

Tamaño del contenedor y proporción muestra-sustrato. En la Tabla 1, se muestran los resultados de los conteos de L3 y AVL. Los datos fueron normalizados transformándolos a logaritmo natural para lo cual a los valores de 0 se les adicionó 1 con anterioridad. La proporción muestra-sustrato afectó significativamente los conteos (ANOVA: $n = 60$, $F = 13.881$, $P < 0.001 < 0.05$) y como se puede ver en la Figura No. 1, los conteos de L3 y AVL fueron mayores cuando la proporción del sustrato fue mayor. En la proporción 1:1 se obtuvieron mayores conteos de L3 (Media = 66.50, DS = 44.780) y de AVL (Media = 5.32, DS = 5.24); en la proporción 1 :0.75 se obtuvieron conteos medios de L3 (Media = 48.84, DS = 44.78) y de AVL (Media = 3.3, DS = 2.85); mientras que cuando la proporción fue de 1:0 los conteos de L3 (Media = 26.45, DS = 19.4) y AVL fueron bajos (Media = 0.75, DS = 1.02).

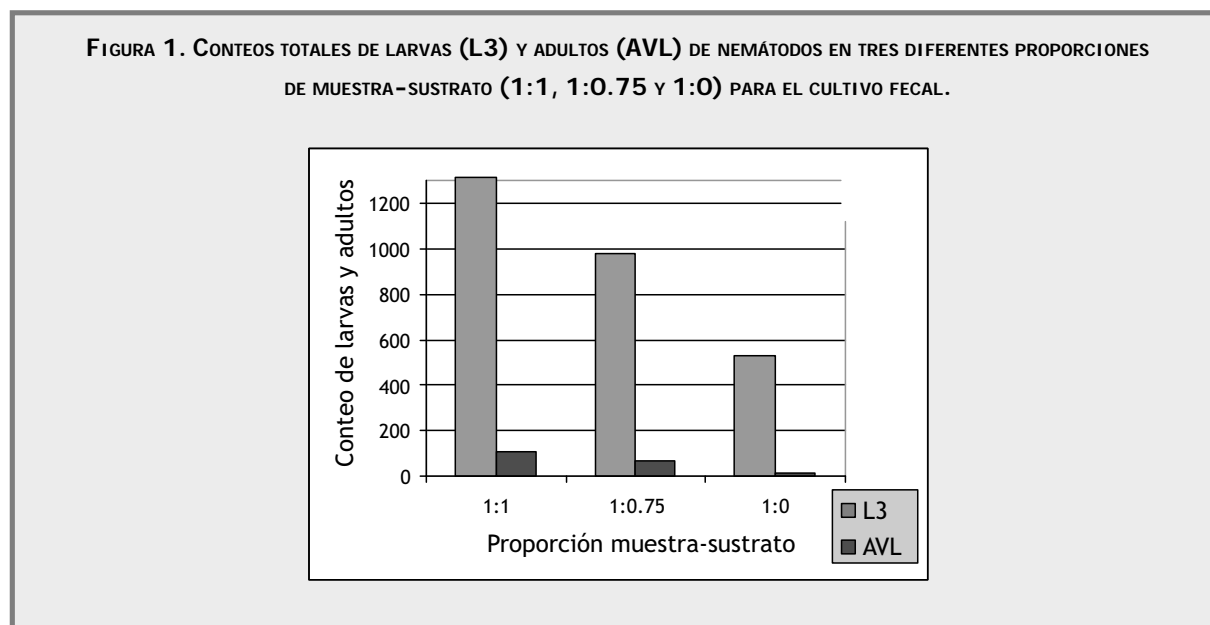


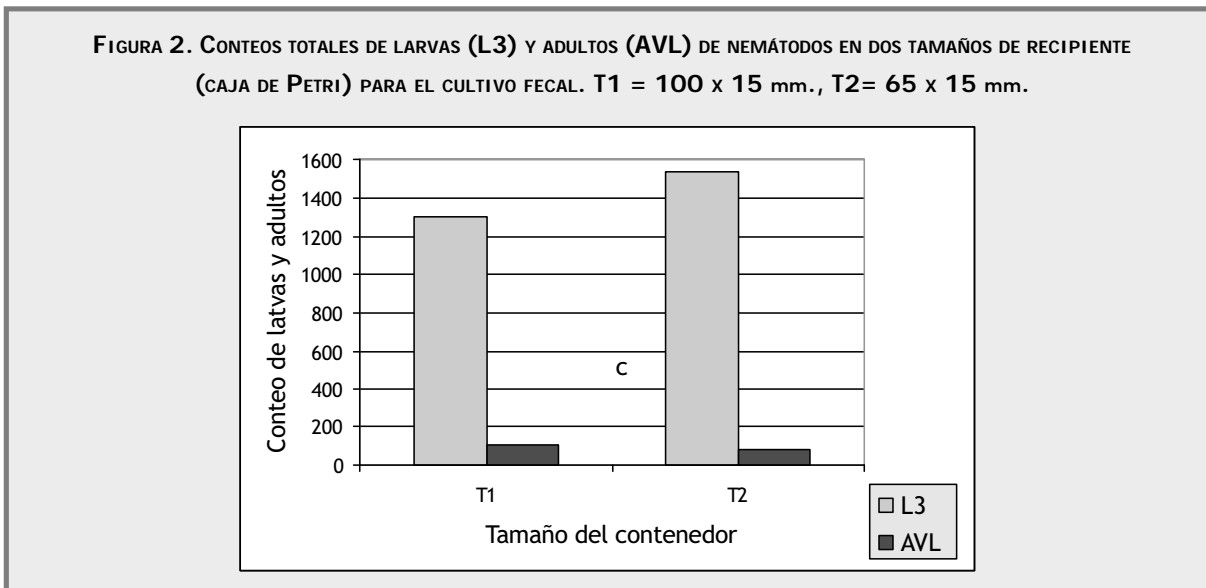
TABLA 1. RESULTADOS DE LOS CONTEOS DE LARVAS (L3) Y ADULTOS DE VIDA LIBRE (AVL) EN LAS MUESTRAS ORGANIZADAS SEGÚN EL TAMAÑO DE LA CAJA Y LA PROPORCIÓN MUESTRA-SUSTRATO DE ACUERDO CON EL DISEÑO EXPERIMENTAL DEL ESTUDIO. T

= TAMAÑO CAJA DE PETRI, T1 = 100 x 15 mm. T2= 65 x 15 mm., S = PROPORCIÓN MUESTRA: SUSTRATO, S1 = 1:1, S2= 1:0.75, S3= 1:0.

M	T	S	L3	AVL	M	T	S	L3	AVL
1	T1	S1	8	22	31	T2	S1	86	1
2	T1	S1	57	7	32	T2	S1	49	0
3	T1	S1	96	3	33	T2	S1	130	4
4	T1	S1	41	6	34	T2	S1	104	4
5	T1	S1	10	12	35	T2	S1	62	6
6	T1	S1	110	2	36	T2	S1	25	0
7	T1	S1	29	0	37	T2	S1	64	8
8	T1	S1	37	5	38	T2	S1	176	3
9	T1	S1	54	10	39	T2	S1	40	1
10	T1	S1	125	3	40	T2	S1	27	9
11	T1	S2	67	3	41	T2	S2	41	6
12	T1	S2	46	3	42	T2	S2	74	5
13	T1	S2	30	0	43	T2	S2	71	2
14	T1	S2	12	4	44	T2	S2	101	6
15	T1	S2	145	4	45	T2	S2	11	4
16	T1	S2	38	10	46	T2	S2	38	2
17	T1	S2	26	0	47	T2	S2	4	0
18	T1	S2	16	0	48	T2	S2	35	1
19	T1	S2	40	3	49	T2	S2	61	3
20	T1	S2	48	1	50	T2	S2	72	9
21	T1	S3	47	1	51	T2	S2	21	2
22	T1	S3	10	1	52	T2	S2	25	0
23	T1	S3	14	0	53	T2	S2	15	0
24	T1	S3	5	0	54	T2	S2	14	0
25	T1	S3	6	0	55	T2	S2	28	1
26	T1	S3	27	3	56	T2	S2	16	0
27	T1	S3	83	0	57	T2	S2	15	0
28	T1	S3	27	1	58	T2	S2	47	1
29	T1	S3	43	0	59	T2	S2	48	3
30	T1	S3	5	0	60	T2	S2	33	2

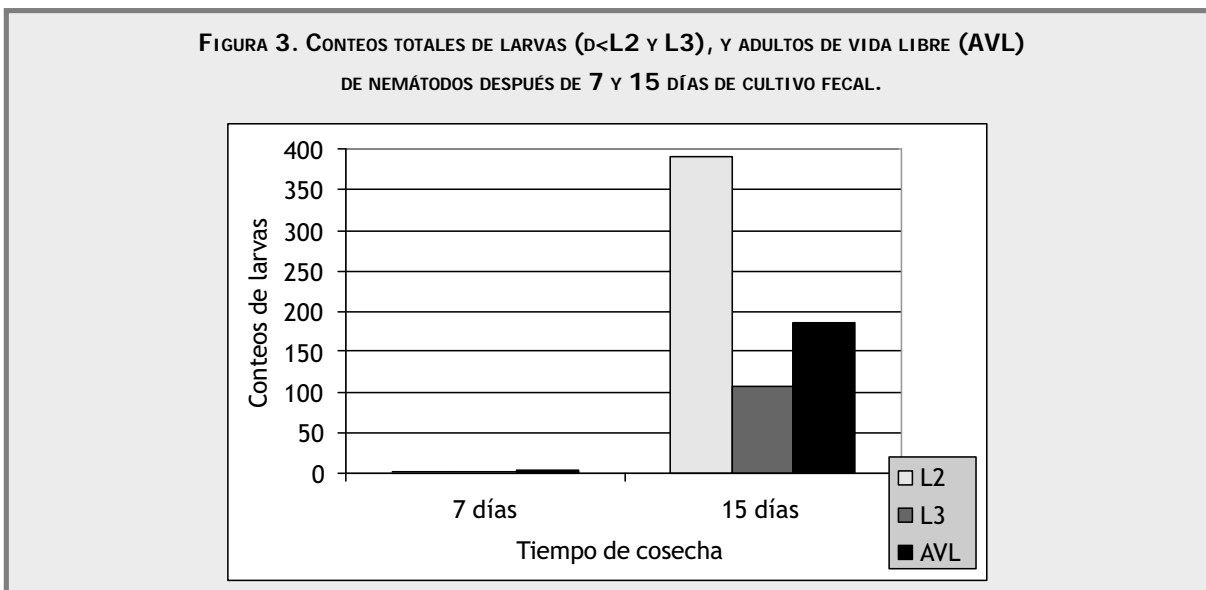
Por otra parte, los conteos de L3 (ANOVA: $n = 60$, $F = 0.770$, $P = 0.384 > 0.05$) y AVL (ANOVA: $n = 60$, $F = 0.108$, $P = 0.744 > 0.05$) no variaron significativamente por el tamaño de la caja de Petri (Figura 2), siendo

bastante parejos para L3: T1 (Media = 43.4, DS = 36.39 y T2 (Media = 51.1, DS = 38.73) y AVL: T1 (Media = 3.47, DS = 4.81 y T2 (Media = 2.77, DS = 2.79).



La Figura 3 muestra los resultados de los conteos de larvas $\leq L2$, L3 y AVL en los diferentes períodos de tiempo de cosecha. Se encontró significancia entre el tiempo de cultivo y el conteo de $\leq L2$ (Sperman;

$n = 10$, $r = 0.884$, $p = 0.001$), L3 (Sperman; $n = 10$, $r = 0.898$, $p = 0.001$) y AVL (Sperman; $n = 10$, $r = 0.898$, $p = 0.001$), es decir que entre más largo fue el tiempo de cultivo, mayor el conteo de larvas en los dos estadios y de adultos de vida libre.



EFEECTO DE LA DILUCIÓN DE LA MUESTRA EN MEDIO MIF

Debido a que los resultados no fueron normales, los datos se transformaron a logaritmo natural para lo que a los valores de 0 se les adicionó 1 con anterioridad, para poder realizar la prueba de ANOVA. La Tabla 2 muestra los resultados de los conteos de huevos de nemátodos y de eimerias para las dos técnicas empleadas, McMaster en solución salina y MIF Concentración. La dilución de la muestra en el medio MIF afectó significativamente el conteo de

huevos de nemátodos (ANOVA: $n = 20$, $F = 4.605$, $P = 0.046 < 0.05$) y de eimerias (ANOVA: $n = 20$, $F = 5.934$, $P = 0.025 < 0.05$), siendo los conteos de huevos de nemátodos y eimerias mayores cuando la proporción de materia fecal en el medio MIF fue 1:10.

En la Tabla 2 se observan mayores conteos parasitarios cuando se concentraron por la técnica de MIF. Los resultados de los nemátodos no variaron significativamente (ANOVA: $n = 20$, $F = 0.04$, $P = 0.098 > 0.05$), pero sí los de las eimerias (ANOVA: $n = 20$, $F = 19.467$, $P = 0.001 < 0.05$).

TABLA 2. RESULTADOS DE LOS CONTEOS DE HUEVOS DE NEMÁTODOS Y EIMERIAS EN LAS MUESTRAS CONSERVADAS EN MEDIO MIF EN DILUCIÓN MUESTRA: MIF 1:5 Y 1:10, CON EL USO DE LA SOLUCIÓN SALINA DE LA TÉCNICA McMASTER Y MIF CONCENTRACIÓN.

Técnica	Muestra	Dilución Muestra: MIF	Nemátodos		Eimerias	
			Conteo	Huevos/Gr.	Conteo	Eimeria/gr.
McMaster	1	1:5	0	0	2	71,1
	2	1:5	0	0	0	0
	3	1:5	1	50	1	35,6
	4	1:5	0	0	1	35,6
	5	1:5	1	50	0	0
	6	1:10	3	150	8	284,4
	7	1:10	0	0	5	177,8
	8	1:10	2	100	16	568,9
	9	1:10	0	0	3	106,7
	10	1:10	0	0	4	142,2
MIF Concentración	11	1:5	0	0	45	1600
	12	1:5	0	0	22	782,2
	13	1:5	0	0	31	1102,2
	14	1:5	0	0	24	853,3
	15	1:5	0	0	40	1422,2
	16	1:10	4	200	147	5226,7
	17	1:10	3	150	150	5333,3
	18	1:10	1	50	144	5120
	19	1:10	0	0	152	5404,4
	20	1:10	1	50	100	3555,6

DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo demuestran que las cajas de Petri plásticas son un buen recipiente para el coprocultivo de parásitos debido a que permiten un buen crecimiento parasitario de L3 y son de fácil transporte y manejo en campo donde las condiciones pueden ser muy variables. El tamaño de la caja no influyó en el crecimiento de los parásitos en coprocultivos con pequeñas cantidades de materia fecal, a pesar que observaciones anteriores de los autores habían sugerido que la desecación podría ser mayor en recipientes más grandes debido a que la muestra tiende a esparcirse en la caja aumentando la superficie de contacto con el aire. Por otra parte, el uso de las cajas pequeñas presenta ventajas para el trabajo de campo debido a que ocupan menor espacio, lo que las hace más manejables.

El aserrín presentó buenos resultados para los cultivos de materia fecal de primates. La proporción del sustrato con la muestra sí produjo un efecto significativo en el crecimiento larvario, y parecería que es de alta importancia en el coprocultivo de pequeñas muestras, que tienden a desecarse más fácilmente. Su acción podría explicarse por la forma como se comporta la materia fecal en el medio natural, además de su cualidad para mejorar la textura de la muestra y servir como vehículo vermicular (Niec, 1968; Vélez, 1983).

En las muestras fecales puras se tiende a formar una costra superficial gruesa que estaría disminuyendo la circulación y el intercambio de gases; mientras que el sustrato por otra parte, estaría simulando las condiciones naturales, cuando la materia fecal de los animales cae en un golpe y se esparce en superficies irregulares como hojarasca, troncos de ramas, piedras, hojas, etc. Esto facilitaría el intercambio gaseoso y rompería el aislamiento por la formación de la costra externa.

En los dos tiempos de cultivo utilizados en este trabajo (7 y 15 días) se observó crecimiento larvario, resultados acordes con las recomendaciones encontradas en la literatura que reportan un rango de aproximadamente 7-20 días para la cosecha de nemátodos según las condiciones de temperatura y humedad (Niec, 1968; Vélez, 1983; Pit *et al.* 1999). Aunque evidentemente el crecimiento de L3 fue más abundante a los 15 días que a los 7 días, también a este día se incrementó AVL que correspondería al desarrollo de las formas adultas de los parásitos.

Por otra parte, es interesante que a pesar de los bajos conteos de huevos de nemátodos observados en la muestra, se encontraron cambios significantes en las dos diluciones de muestra en el medio MIF, de la misma manera que ocurrió con los conteos de las eimerias. En ambos casos, los recuentos fueron mayores en la dilución 1:10 que en 1:5, que demuestra la importancia de este factor. Los más bajos recuentos en la concentración mayor de muestra (1:5) se explicarían por mortalidad de huevos y ooquistes debido a que la cantidad del conservante es insuficiente para la cantidad de muestra fecal. El almacenamiento de las muestras fecales en MIF en una dilución 1:10 es una buena alternativa para conservar los huevos de los parásitos de los primates; hecho que se corroboró por el examen adicional de algunas muestras que llevaban tres años en este medio y en las que se observó la buena conservación de las estructuras parasitarias.

Los conteos menores para nemátodos y eimerias con la solución salina de McMaster que se observaron en el estudio, pueden deberse a la precipitación de la solución por la reacción con el medio MIF, que conllevaría una variación en la densidad y la disminución de la precisión de la prueba (Cringoli *et al.*, 2004). Por tanto, cuando se utilice MIF para conservar los parásitos, es más recomendable

complementar la técnica con MIF concentración para el recuento de huevos y ooquistes. De todas formas es importante que futuros trabajos se enfoquen a evaluar más detalladamente ésta y otras técnicas de conservación y análisis de huevos que podrían ser más útiles para el estudio de los primates en vida libre (Bawden, 1994; Odongo-Aginya *et al.* 1995).

CONCLUSIONES

Los resultados del presente trabajo demuestran que es posible implementar de manera sencilla y a bajo costo una metodología para la conservación de las muestras fecales de los primates del nuevo mundo para el análisis parasitario, a pesar de los inconvenientes que representa el trabajo en campo con estas especies. La utilización conjunta del cultivo

fecal y la conservación en el medio MIF, permite no solamente trabajar en lugares remotos durante un período prudencial de tiempo antes de tener acceso al laboratorio, sino que incrementa el alcance de los estudios al mejorar las posibilidades de diagnóstico.

Para la realización de los cultivos fecales en pequeñas cantidades es necesario utilizar un sustrato como el aserrín, en una proporción con la muestra de 1:1, ya que en proporciones menores se disminuye el crecimiento larvario. El período de cultivo recomendable está entre los 7 y 15 días, tiempo que está comprendido dentro del rango reportado por la literatura. La mejor dilución de muestra: MIF para la conservación de huevos y ooquistes es de 1:10, para lo que el almacenamiento en frascos de vidrio ámbar de 20 ml es una buena alternativa para las muestras pequeñas de los primates en campo.

BIBLIOGRAFÍA

- Ancrenaz, M., Setchell, J. & Curtis, D.J. «Handling, anaesthesia, health evaluation and biological sampling». In: Setchell, J.M. and Curtis, D.J. (editors). 2003. *Field and laboratory methods in Primatology: a practical guide*. Cambridge University Press.
- Bawden, M.P. «Improvement of the Merthiolate-Iodine-Formalin (MIF) fecal technique for hookworm, *Trichuris trichiura*, and *Ascaris lumbricoides* eggs». *J Parasitol.* 80. 3. (1994): 474-475.
- Brieva, C. 2002. *Preliminary observations on gastrointestinal nematode parasites in wild red howler monkeys (*Alouatta seniculus seniculus*) from the eastern and northern plains of Colombia*. MsC dissertation thesis. England: University of London.
- Chaker, E., Dedit, Y., Kremer, M., Lienhart, E & Vantillard, M. «Comparative value of egg size and larval morphology in the diagnosis of species of ancylostomids. Existence of abnormal larvae». *Med Trop* 44. 2. (1984):143-148.
- Cordero del Campillo, M. & Rojo Vásquez, F.A. 1999. *Parasitología Veterinaria*. McGraw Hill, Interamericana.
- Cringoli, G., Rinaldi, L., Veneziano V., Capelli G. & Scala A. «The influence of flotation solution, sample dilution and choice of McMaster slide area (volume) on the reliability of the McMaster technique in estimating the egg counts of gastrointestinal *Strongyloides* and *Dicrocoelium dentriticum* in sheep». *Vet Parasitol.* 123.1-2. (2004): 121-131.
- Esteban, J.C. 1999. *Coprología Parasitaria: Diagnóstico Etiológico*. I. Reactivos, II. Métodos y Técnicas. Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, España. Master Internacional en enfermedades Parasitarias Tropicales. Documento inédito.
- Fandeur T., Volney B., Peneau C., De Thoisy B. «Monkeys of the rainforest in French Guiana are natural reservoirs for *P. brasilianum* / *P. malariae* malaria». *Parasitology* 120. (2000): 11-21.
- Hendrix, C.M. 1999. *Diagnóstico Parasitológico Veterinario*. 2ª edición. Mosby, Madrid: Harcourt Brace.
- Lamonthe, R. 1997. *Manual de técnicas para preparar y estudiar los parásitos en animales silvestres*. México: AGT Editor.
- Muller, WA., Beer, F. «The identification of intestinal parasite stages using the Merthiolate-Iodine-Formalin concentration method (MIF-method)». *Z Med Lab Diagn.* 1. (1979): 51-5.
- Muriuki, S.M.K., Murugu M.K., Munene, E., Karere, G.M. & Chai, D.C. «Some gastrointestinal parasites of zoonotic importance commonly observed in old world non-human primates in Kenya». *Acta Tropica* 71. (1998): 73-82.
- Nassar-Montoya, F., Pereira-Bengoa, V. & Vodovoz, T. «Medicina de la conservación en el estudio de los primates en Colombia». En: Pereira-Bengoa, V; Nassar-Montoya, F.; Savage, A & Contribuidores. 2003. *Primatología del Nuevo Mundo: biología, medicina, manejo y conservación*, Centro de Primatología Araguatos: Bogotá.
- Niec, R. 1968. *Cultivo e identificación de larvas infectantes de nemátodos gastrointestinales del bovino y ovino*. Argentina: Instituto de Patología Animal, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Secretaría de Estado de Agricultura y Ganadería de la Nación.

- Odongo-Aginya, E.I, Taylor, M.G., Sturrock, R.F., Ackers, J.P. & Doehring, E. «Field evaluation of an improved Kato-Katz thick smear technique for quantitative determination of helminth eggs in faeces». *Med. Parasitol.* 46. 4. (1995):275-277.
- Pit, D.S., De Graaf W., Snoek, H., De Vlas, S.J., Baeta, S.M. & Polderman, A.M. «Diagnosis of Oesophagostomum bifurcum and hookworm infection in humans: day-to-day and within-specimen variation of larval counts». *Parasitology* 118. 3. (1999): 283-288.
- Setchell, J.M. & Curtis, D.J. (editors).2003. *Field and laboratory methods in Primatology: a practical guide*. Cambridge University Press.
- Sorci, G, Morand, S. & Hugot, J.P. «Host-parasite coevolution: comparative evidence for covariation of life history traits in primates and oxuriid parasite». *Proc. R. Soc. London B.* 264. (1997): 285-289.
- Stoner, K.E. «Prevalence and intensity of intestinal parasites in mantled howling monkeys (*Alouatta palliata*) in northeastern Costa Rica: implications for conservation biology». *Conservation Biology* 10. (1996): 539-546.
- Stuart, M. & Strier, K., «Primate and parasites: A case for a multidisciplinary approach». *International Journal of Primatology* 16. 4. (1995): 577-593.
- Stuart, M., Pendergast, V., Rumpfellt, S., Pierberg, S., Greenspan, L., Glander, K. & Clarke, M. «Parasites of Wild Howlers (*Alouatta* spp.)» In: *International Journal of Primatology* 19. 3. (1998): 493-512.
- Vélez, A. 1983. *Guía en parasitología veterinaria*. Colombia: Exitodinámica editores.
- Walsh J.F, Molynerz D.H., Birley M.H. «Deforestation effects on vector borne disease». *Parasitology* 106. (1993): S55-S75.
- Ye, X.P., Donnelly, C.A., Fu, Y.L., Wu, Z.X. «The non-randomness of the distribution of *Trichuris trichiura* and *Ascaris lumbricoides* eggs in faeces and the effect of stirring faecal specimens». *Trop Med Int Health* 2. 3. (1997): 261-264.