

# Summary

Diarrhoea is one of the leading problems requiring veterinary care in captive NHP. Gastrointestinal disorders may be caused by various factors, including nutritional changes, stress and/or pathogenic organisms. The infectious pathogens involved are bacteria, viruses, protozoa and helminths. A risk disease assessment will not only be beneficial from an animals' perspective, since these organisms are also of concern in public health.

In **chapter 1** we identified hazards which should be considered in the surveillance of gastrointestinal protozoa in captive NHP, focussing on *Entamoeba histolytica*, *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp. and *Balantidium coli*. Firstly, these hazards include the clinical importance of the pathogens. Both *E. histolytica* and *B. coli* can result in the most severe clinical symptoms, depending on the NHP species involved. Regarding public health, *E. histolytica* is of major concern and to a lesser extent also *Giardia* and *Cryptosporidium*. Moreover, zoonotic transmission has been described for *E. histolytica* and *Giardia* spp. The importance of *B. coli*, however, is inferior for humans. An analysis of the literature revealed that these protozoa were highly prevalent in captive NHP, probably due to their specific characteristics (such as their direct life cycle or the high levels of (oo)cysts excreted).

Although this hazard identification emphasizes the management of these protozoa in captive NHP, it also points to the weaknesses of the studies conducted. Firstly, the prevalence data available may be biased due to an inappropriate study design. The majority of the studies are conducted after clinical outbreaks and are based on a limited number of animals species. Moreover, samples are often pooled, which does not allow to assess the occurrence of these organisms within groups. However, limited studies indicated large variation in occurrence between infected groups which may contribute to a more powerful risk factor analysis. Unfortunately, factors explaining this variation remain largely unknown. Secondly, for previous studies microscopic examination was the most commonly used technique and molecular characterization of gastrointestinal protozoa in NHP has rarely been performed. However, it is crucial for two reasons. It allows a correct diagnosis of *E. histolytica*, differentiating it from other morphologically identical but non-pathogenic *Entamoeba* spp. In addition, the molecular analysis of *E. histolytica*, *Giardia* and *Cryptosporidium* isolates will contribute to the elucidation of different transmission pathways, including the role of NHP as a reservoir for human

amoebiasis, giardiasis and cryptosporidiasis. Finally, the knowledge of diagnostic properties is essential for a reliable estimate of the prevalence in epidemiological surveys and an adequate diagnosis in clinical surveys, but no studies have focussed on the evaluation of different assays for the diagnosis of gastrointestinal protozoa in NHP.

In **chapter 2**, a cross-sectional survey was conducted to estimate the occurrence of gastrointestinal parasites in NHP of nine zoological gardens and one sanctuary for exotic animals in Belgium and the Netherlands. Between August 2004 and June 2008, 2779 faecal samples were collected from 807 animals housed in 124 groups. The 61 NHP species involved represented prosimians, NW monkeys, OW monkeys and apes. Because individual sampling was impossible, a sufficient sample size was simulated statistically. All samples were examined microscopically after an acetic acid–ether concentration technique for the presence of gastrointestinal parasites. Only for *Cryptosporidium* spp. a commercial immunofluorescence assay was used. Putative risk factors for parasitism were examined using the Generalized Equation Estimating approach. The most prevalent gastrointestinal parasites were *Entamoeba* spp. (65.3%) and *Chilomastix mesnili* (26.6%). Other parasites detected were *Endolimax nana* (19.4%), *Giardia* spp. (18.5%), *Trichuris* spp. (16.9%), *B. coli* (16.1%), *Iodamoeba butschlii* (5.6%), *Strongyloides* spp. (1.6%) and *Cryptosporidium* spp. (1%). The risk factor analysis revealed a significant difference between host species, stocking density and daily cleaning of the indoor enclosures for *Entamoeba* spp. infections. For *Giardia* spp., a difference in host species and study sites was observed. Multiple infections were mostly observed in OW monkeys.

In **chapter 3**, a molecular survey was conducted to determine the distribution of *Entamoeba* spp. in captive NHP. A total of 520 *Entamoeba* samples from 36 animal species were characterized based on a previously described PCR-reverse line hybridization blot (PCR-RLHB) protocol targeting the small subunit rRNA gene. In addition, *E. histolytica* isolates were differentiated using a variant-specific PCR. The molecular identification revealed the presence of *E. histolytica* (NHP variant only), *E. dispar*, *E. moshkovskii*, *E. hartmanni*, *E. coli*. and *E. polecki*-like. Furthermore, unknown *Entamoeba* spp. were identified. These results indicate that *E. histolytica* is present in captive NHP. They also indicate the host specificity of the NHP variant of *E. histolytica*. Furthermore it

was shown that NHP harbour host specific *Entamoeba* spp. This study, therefore, also advocates the use of variant-specific PCRs in endemic regions of *E. histolytica* in order to elucidate the role of NHP as a reservoir for zoonotic transmission.

In **chapter 4**, a total of 258 *Giardia* samples from 31 NHP species were characterized based on an assemblage-specific PCR targeting the triose phosphate isomerase (*tpi*) gene to identify both assemblage A and B infections. In addition, a multi-locus sequencing approach based on the glutamate dehydrogenase, the *tpi* and the  $\beta$ -giardin genes was used to examine both the genetic variability and the ability to allocate these isolates to different NHP groups. Overall, assemblage B was the most prevalent (78.6%), but mixed assemblage A and B infections also occurred in 32.7% of the samples. Sequencing of the isolates revealed the presence of new polymorphisms for both assemblages and at the three loci examined. The majority of the assemblage B isolates could not be grouped into recently described subassemblages, particularly at the *tpi* gene. Isolates could only be allocated to a specific group when polymorphisms of the three loci were combined. The results confirm that NHP are a potential reservoir for zoonotic transmission and advocate the use of assemblage-specific primers in molecular epidemiological surveys, as mixed infections are likely to be underestimated. The high level of heterogeneity within assemblages indicates that a revised nomenclature of these sub-assemblages is needed, but suggests the potency of a multi-locus sequencing approach to unravel the complex epidemiology of *G. duodenalis*.

In **chapter 5**, *Giardia* cyst excretion intensities were examined in 124 groups of NHP using an immunofluorescence assay (IFA). In addition, the test properties of microscopic examination (ME), IFA, ELISA and PCR were estimated in 58 groups excreting different levels of cysts. The results revealed a high variation in cyst excretion intensity between groups, ranging from 1 to 4574 cysts per gram faeces. A Bayesian analysis indicated that PCR (70.8% [38.2-82.3]) and IFA (64.1% [37.3-75.1]) were the most sensitive techniques, followed by ELISA (40.7% [23.2-51.5]) and ME (23.0% [12.1-33.2]). All techniques were highly specific (> 95%). With the exception of PCR, the assays' sensitivity increased with higher levels of cyst excretion, while the specificity of all techniques remained unchanged. The high variation in the intensity of excretion of cysts that was observed suggests that the quantification of cyst

excretion may help to identify groups at risk, consequently improving the management of *Giardia* in captive NHP. The results also indicate that IFA is the preferred diagnostic assay, since it is both a quantitative and sensitive technique, only missing infections with low cyst excretion intensities. Furthermore, the results demonstrate that the intensity of cyst excretion results in a variable sensitivity, which may bias studies on the epidemiology of *Giardia*.

**Chapter 6** discusses (1) the significance of gastrointestinal protozoa as a pathogen in captive NHP examined, (2) the role of NHP as a reservoir for zoonotic transmission, (3) a possible surveillance strategy and (4) the contribution of surveys in captivity to NHP conservation. There is little evidence in the present study that the protozoa are significant as a pathogen. Moreover, it was argued that the role of NHP as a reservoir for zoonotic transmission is inferior. Therefore, radical measures in zoological gardens seem redundant and a surveillance strategy merely focussing on episodes of gastrointestinal disorders is preferred instead. Finally, the findings may also contribute to the conservation of NHP. On the one hand, studies in captivity may provide information on the occurrence of protozoan infections for free-ranging counterparts for which this is unknown. On the other hand, the molecular tools described hold potency to assess the complex epidemiology of *E. histolytica* and *Giardia* spp. in endemic settings where NHP and humans live closely together.



# Samenvatting

Diarree is één van de belangrijkste redenen voor een interventie van de dierenarts bij niet-humane primaten (NHP) in gevangenschap. Gastrointestinale problemen kunnen verschillende oorzaken hebben, zoals veranderingen van dieet, stress of pathogene organismes. Onder de infectieuze pathogenen rekenen we bacteriën, virussen, protozoa en wormen. Het onderzoek naar het voorkomen van de infectieuze ziekten zal niet alleen voor de dieren zelf voordelen opleveren, omdat deze organismes ook belangrijk zijn in de humane geneeskunde.

In **hoofdstuk 1** werden de knelpunten geïdentificeerd die belangrijk zijn voor de controle van gastrointestinale parasieten bij NHP in gevangenschap, in het bijzonder *Entamoeba histolytica*, *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp. en *Balantidium coli*. Eerst werd ingegaan op het klinisch belang van de pathogenen. Zowel *E. histolytica* als *B. coli* kunnen ernstige klinische symptomen veroorzaken, afhankelijk van de NHP species. In de humane geneeskunde is vooral *E. histolytica* van groot belang, en in mindere mate ook *Giardia* en *Cryptosporidium*. Bovendien werd zoönotische transmissie al beschreven voor *E. histolytica* en *Giardia*; *B. coli* is slechts van ondergeschikt belang. Een analyse van de literatuur toonde aan dat deze protozoa in hoge mate aanwezig waren in NHP in gevangenschap, waarschijnlijk omwille van hun specifieke eigenschappen (zoals hun directe levenscyclus of de hoge aantallen (oo)cysten die worden uitgescheiden).

Hoewel deze knelpuntenanalyse de controle van de protozoa in NHP benadrukt, wijst ze ook op de tekortkomingen van de uitgevoerde studies. Allereerst zijn de bekomen prevalenties vertekend door een incorrecte proefopzet. De meerderheid van de studies werd immers uitgevoerd na klinische uitbraken en zijn gebaseerd op slechts een beperkt aantal NHP species en parasietenspecies. Daarenboven werden vaak mengstalen onderzocht, wat de analyse van het voorkomen van deze organismes binnen de groepen verhindert. Toch toont een beperkt aantal studies aan dat er een grote variatie bestaat binnen een groep, wat kan bijdragen tot een sterkere risicofactorenanalyse. Er is spijtig genoeg weinig bekend over factoren die deze variatie kunnen verklaren. Ten tweede was lichtmicroscopie de meest gebruikte techniek in vroeger studies en werden deze gastrointestinale parasieten zelden op moleculair niveau

geïdentificeerd, hoewel dit cruciaal is om de volgende twee redenen. Aan de ene kant laat het een correcte diagnose van *E. histolytica* toe, omdat dit protozoön gedifferentieerd kan worden van andere morfologisch identieke maar niet-pathogene *Entamoeba* spp. Aan de andere kant kan de moleculaire analyse van *E. histolytica*, *Giardia* en *Cryptosporidium* isolaten verschillende transmissieroutes onthullen, waaronder ook de rol van NHP als een reservoir van humane amoebiasis, giardiasis en cryptosporidiasis. Ten slotte is de evaluatie van detectietechnieken essentieel voor een betrouwbare inschatting van de prevalentie in epidemiologische studies en een adequate diagnose in klinische studies. Toch heeft tot nu toe geen enkel onderzoek gefocust op de evaluatie van verschillende detectietechnieken voor de diagnose van gastrointestinale protozoa bij NHP.

In **hoofdstuk 2** wordt een epidemiologische studie beschreven die het voorkomen van gastrointestinale parasieten bepaalt in negen dierentuinen en één opvangcentrum voor exotische dieren in België en Nederland. Tussen augustus 2004 en juni 2008 werden 2779 stoelgangstalen verzameld van 807 dieren gehuisvest in 124 groepen. De 61 betrokken NHP species waren representatief voor halfapen, nieuwe wereld (NW) apen, oude wereld (OW) apen en mensapen. Omdat individuele staalname onmogelijk was, werd de steekproefgrootte bepaald door een statistische simulatie. Al de stalen werden microscopisch onderzocht op het voorkomen van gastrointestinale parasieten na een azijnzuur-ether concentratie techniek, met uitzondering van *Cryptosporidium* spp., waarvoor een commerciële immunofluorescentietest werd gebruikt. Voor het bepalen van vermeende risicofactoren voor parasitisme werd de Generalized Equation Estimation analyse uitgevoerd. De meest prevalentie parasieten waren *Entamoeba* spp. (65.3%) en *Chilomastix mesnili* (26.6%). Andere parasieten die werden teruggevonden, waren *Endolimax nana* (19.4%), *Giardia* spp. (18.5%), *Trichuris* spp. (16.9%), *B. coli* (16.1%), *Iodamoeba butschlii* (5.6%), *Strongyloides* spp. (1.6%) en *Cryptosporidium* spp. (1%). Een significant verschil werd opgemerkt voor *Entamoeba* spp. voor wat betreft gastheren, populatiedichtheid en dagelijks kuisen van de binnenverblijven. Voor *Giardia* spp. toonde de analyse een significant verschil aan tussen gastheren en studiesites. Meervoudige infecties werden het vaakst vastgesteld bij OW apen.

In **hoofdstuk 3** werd een moleculair onderzoek uitgevoerd om de distributie van *Entamoeba* spp. in NHP in gevangenschap na te gaan. In totaal werden 520 *Entamoeba* stalen van 36 dierspecies geïdentificeerd gebaseerd op een vooraf beschreven PCR-reverse lijn hybridisatie blot protocol gebaseerd op het 'small subunit rRNA' gen. Bovendien werden *E. histolytica* isolaten gedifferentieerd met een variantspecifieke PCR. Deze moleculaire identificatie toonde de aanwezigheid van *E. histolytica* (enkel de NHP variant), *E. dispar*, *E. moshkovskii*, *E. hartmanni*, *E. coli*. en *E. polecki*-achtig. Daarenboven werden onbekende *Entamoeba* spp. geïdentificeerd. Deze resultaten bevestigen dat *E. histolytica* aanwezig is in NHP in gevangenschap en dat de NHP-variant van *E. histolytica* gastheerspecifiek is. Daarom pleit deze studie voor het gebruik van variantspecifieke PCR's in endemische regio's van *E. histolytica* om de rol van NHP als reservoir voor zoönotische transmissie op te helderen.

In **hoofdstuk 4** werden in totaal 258 *Giardia* stalen van 31 NHP species geïdentificeerd gebaseerd op een assemblage specifieke PCR (triose fosfaat isomerase (*tpi*) gen) om infecties met de zoönotische assemblages A en B te onderscheiden. Bijkomend werd een subset van de stalen ook geanalyseerd op basis van een multilocus sequentie strategie (glutamaat dehydrogenase, het *tpi* gen en het  $\beta$ -giardin gen). Hierbij werd nagegaan of de oorsprong van de isolaten bepaald kon worden op basis van genetische variatie. In het algemeen was assemblage B het meest prevalent (78,6 %), maar menginfecties van assemblage A en B kwamen ook voor in 32,7 % van de stalen. De analyse van de DNA sequenties toonde de aanwezigheid aan van nieuwe polymorfismes van beide assemblages en dit voor de drie onderzochte loci. De meerderheid van de assemblage B isolaten kon niet ingedeeld worden bij recent beschreven subassemblages, in het bijzonder voor het *tpi* gen. De oorsprong van de isolaten kon alleen worden bepaald als polymorfismes voor de drie loci gecombineerd werden. De resultaten bevestigen dat NHP een potentieel reservoir zijn voor zoönotische transmissie. Daarenboven wordt het gebruik van assemblage specifieke primers in moleculaire epidemiologische studies aanbevolen omdat menginfecties worden onderschat. De hoge genetische variatie binnen assemblages geeft aan dat een herziening van de nomenclatuur van deze subassemblages nodig is. Deze studie wijst zo op het potentieel van een

multilocus sequentie strategie voor het ontrafelen van de complexe epidemiologie van *G. duodenalis*.

In **hoofdstuk 5** werd de intensiteit van de cyste excretie voor *Giardia* onderzocht met een immunofluorescentietest (IFT) in 124 groepen van NHP. Aanvullend werden de kenmerken van vier detectietechnieken (lichtmicroscopie, IFT, ELISA en PCR) geëvalueerd in 58 groepen met een verschillend niveau van cyste excretie. De resultaten toonden een hoge variatie aan intensiteit van cyste excretie tussen groepen, gaande van 1 tot 4574 cysten per gram faeces. De Bayesiaanse analyse toonde aan dat PCR (70.8% [38.2-82.3]) en IFT (64.1% [37.3-75.1]) de meest sensitieve technieken waren, gevolgd door ELISA (40.7% [23.2-51.5]) en lichtmicroscopie (23.0% [12.1-33.2]). Alle technieken waren in hoge mate specifiek (> 95 %). Met uitzondering van PCR steeg de sensitiviteit van de technieken bij een hogere intensiteit van cyste excretie. De specificiteit bleef ongewijzigd. De grote variatie in cyste excretie suggereert dat het kwantificeren van de cyste excretie kan bijdragen tot het identificeren van risicogroepen, waardoor ook de controle van *Giardia* bij NHP in gevangenschap verbeterd wordt. De resultaten geven aan dat bij voorkeur IFT wordt gebruikt als diagnostische techniek, omdat het zowel een kwantitatieve als sensitieve techniek is, die enkel infecties met een lage graad van cyste excretie mist. Bovendien tonen de resultaten ook aan dat de intensiteit van cyste excretie resulteert in een variabele sensitiviteit, wat in belangrijke mate de resultaten van epi-demiologische studies over *Giardia* beïnvloedt.

In **hoofdstuk 6** wordt aandacht besteed aan het belang van gastro-intestinale parasieten als pathogenen in NHP in gevangenschap, de rol van NHP als reservoir voor zoönotische transmissie, een mogelijke controlestrategie en ten slotte de bijdrage van onderzoek in gevangenschap aan conservatie in het wild. In deze studie zijn er weinig aanwijzingen dat protozoa belangrijke pathogenen zijn. Bovendien is er weinig evidentie voor de rol van NHP als reservoir voor zoönotische transmissie. Daarom lijken omvangrijke maatregelen in dierentuinen overbodig en wordt de voorkeur gegeven aan een controlestrategie ge-baseerd op gastro-intestinale problemen. Ten slotte kunnen deze resultaten ook bijdragen aan de conservatie van NHP. Aan de ene kant kunnen studies in gevangenschap informatie opleveren over het voorkomen van

## *Samenvatting*

protozoaire infecties in het wild voor species waarvoor die kennis ontbreekt in het wild. Aan de andere kant bieden de moleculaire technieken de mogelijkheid om de complexe epidemiologie van *E. histolytica* en *Giardia* spp. te analyseren in endemische settings waar mensen en NHP nauw samenleven.