






Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma de Barcelona
Facultat de Veterinària

PARASITOSIS EN COLECTIVOS FELINOS:

ANÁLISIS DE FACTORES DE RIESGO

Xavier Blasco Suñé

Setembre 2018

**PARASITOSIS EN COLECTIVOS FELINOS:
ANÁLISIS DE FACTORES DE RIESGO**

Memoria presentada por

Xavier Blasco Suñé

Para optar al grado de Doctor

Bajo la dirección de la **Dra. Anna Maria Ortuño i Romero**
Del Departamento de Anatomía y Sanidad Animal, de la UAB

La presente tesis está adscrita al programa de doctorado en Medicina y Sanidad Animal

Dra. Anna Maria Ortuño i Romero

Doctorand: Xavier Blasco Suñé



FACULTAT DE VETERINÀRIA

Bellaterra, 2018

RESUMEN

Los colectivos animales presentan unas características que favorecen la transmisión y el mantenimiento de determinados patógenos. Una alta densidad de animales, contaminación ambiental, el estrés, o la existencia de portadores asintomáticos son algunos de los factores implicados en la epidemiología de los procesos infecto-contagiosos.

En el caso de los colectivos felinos, los parásitos internos consituyen uno de los problemas más habituales con una importante repercusión, no sólo en sanidad animal sino también en salud pública. Estudios epidemiológicos realizados en distintos colectivos han evidenciado que, a menudo, los mecanismos de control establecidos no son suficientemente efectivos.

Con el objetivo de determinar la prevalencia de infección de parásitos internos y poder establecer estrategias de control eficientes, se procedió a un estudio epidemiológico en el que se evaluaron distintos colectivos felinos, que incluían centros de acogida, gateras, criaderos y colonias. Para ello se tomaron muestras de heces que se analizaron mediante técnicas coprológicas e inmunológicas. Algunas de ellas, además, se procesaron mediante técnicas de biología molecular para poder identificar los genotipos de *Giardia* spp. i especies de *Cryptosporidium*.

Para poder establecer unas medidas de control adecuadas, se evaluaron aquellos factores considerados de riesgo y que podrían ser modificables, como factores vinculados al ambiente o al manejo. Paralelamente, y teniendo en cuenta que el estrés puede desempeñar un rol destacable en la presentación clínica de determinadas parasitosis, se evaluó la respuesta al estrés como otro indicador que hay que tener en cuenta a la hora de diseñar unas estrategias de control apropiadas.

La prevalencia total de parasitosis observada en colectivos felinos fue del 53%. Todos los colectivos evaluados mostraron prevalencias de infección que oscilaron del 8.3% al 94%. Los colectivos que presentaron prevalencias más elevadas fueron las colonias felinas (70.4%), seguido de los centros de acogida (58.8%), y las gateras (41.4%). En los criaderos, se observaron las prevalencias más bajas (20.8%) e, incluso, en uno de los centros evaluados no se detectó infección por parásitos. Además, los parásitos detectados fueron distintos en función al tipo de colectivo. Así, los gatos de colonia, animales que viven en semi-libertad y presentan un marcado comportamiento depredador, presentaban prevalencias significativamente superiores a helmintos, mientras que los centros de acogida, las gateras, y los criaderos, constituidos por animales que viven confinados y sin acceso, o muy limitado, al exterior, presentaron prevalencias mucho más altas frente a protozoos. En el caso concreto de los criaderos, no se detectaron helmintos.

El parásito más prevalente resultó ser *Giardia* spp., identificándose tanto el genotipo F, propio de los felinos, como el A, considerado potencialmente zoonótico. En el caso de *Cryptosporidium* spp., *C. felis* fue la única especie identificada.

El nivel de bienestar de los animales, se evaluó a partir de la cuantificación de los metabolitos de glucocorticoides fecales (FGM), en dos muestreos diferentes. Para ello, se validó bioquímicamente un enzimoimmunoensayos para la especie y la matriz biológica objeto de estudio. Con la metodología validada, se procedió a la cuantificación de los FGM, y se relacionaron los valores medios obtenidos con diferentes variables de interés. Los criaderos fueron los centros donde los valores medios de FGM fueron más elevados, lo que se atribuyó al estado fisiológico de los animales en reproducción. Los centros de acogida mostraron niveles significativamente más altos que las gateras y las colonias felinas. Los dos primeros son ambientes donde los animales viven confinados, mientras que las colonias se relacionan con un estilo de vida libre.

RESUM

Els col·lectius animals presenten unes característiques que afavoreixen la transmissió i manteniment de determinats patògens. L'elevada densitat d'animals, la contaminació ambiental, l'estrés, o l'existència de portadors asimptomàtics, són alguns dels factors implicats en l'epidemiologia dels processos infecto-contagiosos.

En el cas dels col·lectius felins, els paràsits interns constitueixen un dels problemes més habituals amb important repercussió, tant en salut animal com en salut pública. Estudis epidemiològics realitzats en diferents col·lectius han evidenciat que, sovint, els mecanismes de control establerts no són suficientment efectius.

Amb l'objectiu de determinar la prevalença d'infecció de paràsits interns, i poder establir estratègies de control adients, es va dur a terme un estudi epidemiològic en el qual es van avaluar diferents col·lectius felins, incloent centres d'acollida, gateres, colònies felines i criadors. Per això, es van recollir mostres de femta i es van analitzar mitjançant tècniques coprològiques i immunològiques. Algunes mostres, a més a més, es van processar mitjançant tècniques de biologia molecular per a poder identificar els genotips de *Giardia* spp. i espècies de *Cryptosporidium* spp. Per a poder establir unes mesures de control adients, es van avaluar aquells factors considerats de risc i que poden ser modificables, com ara factors vinculats a l'ambient o al maneig. Paral·lelament, i tenint en compte que l'estrés pot exercir un rol destacable en la presentació clínica de determinades parasitosis, es va avaluar la resposta d'estrés com un altre indicador a tenir en compte a l'hora de dissenyar unes estratègies de control apropiades.

La prevalença total de parasitosis observada en col·lectius felins fou de 53%. Tots els col·lectius mostrejats van mostrar prevalences d'infecció que oscil·laven del 83% al 94%. Els col·lectius que van presentar les prevalences més elevades van ser les colònies felines (70.4%), seguides dels centres d'acollida (58.8%), i les gateres (41.4%). Als criadors, es van observar les prevalences més baixes (20.8%) i, fins i tot, a un dels centres avaluats no es va detectar cap paràsit. No obstant, els paràsits observats van ser diferents en els diversos col·lectius. Així, els gats de colònia, animals que viuen en semi-llibertat i mostren un marcat comportament depredador, van presentar prevalences significativament superiors a helmints, mentre que els centres d'acollida, les gateres i els criadors, constituïts per animals que viuen confinats i sense accés, o molt limitat, a l'exterior, van presentar prevalences molt més altes a protozous. En el cas concret dels criadors, no es van detectar helmints.

El paràsit més prevalent va ser *Giardia* spp., identificant-se tant el genotip F, propi dels felins, com l'A considerat potencialment zoonòtic. En el cas de *Cryptosporidium* spp., *C. felis* va ser l'única espècie identificada.

El nivell de benestar dels animals, es va avaluar a partir de la quantificació de metabòlits de glucocorticoides fecals (FGM), en dos mostrejors diferents. Per això, es va validar bioquímicament un immunoassaig per a l'espècie i la matriu biològica objectes d'estudi. Amb la metodologia validada, es va procedir a la quantificació dels FGM, i es van relacionar els valors mitjos obtinguts amb diferents variables d'interès. Els criadors van ser els centres on els valors mitjos de FGM van ser més elevats, fet que es va atribuir a l'estat fisiològic dels animals en reproducció. Els centres d'acollida van mostrar nivells significativament més alts que les gateres i les colònies felines. Els dos primers són ambients on els animals viuen confinats, mentre que les colònies es relacionen amb un estil de vida lliure.

SUMMARY

In animal collectivities, infectious diseases are difficult to prevent and control. Several factors such as high animal density, environmental contamination, stress, or the existence of subclinical carriers, may contribute to the spread and maintenance of such diseases.

Particularly, in multi-cat environments, endoparasite infections are both of veterinary and public health concern. Epidemiological studies have demonstrated that, frequently, the routine measures adopted fail in the control effectiveness of such infections.

In order to evaluate the prevalence of endoparasite infections, and to establish efficient control strategies, an epidemiological study was performed in several multi-cat environments, including rescue shelters, catteries, feline colonies and breeding catteries. Fecal samples were collected and analyzed by coprological and immunological techniques. Moreover, a certain amount of samples were analyzed by molecular methods in order to identify *Giardia* spp. assemblages, and *Cryptosporidium* species.

With the aim to establish such control measures, those risk factors that can be modified, regarding the environment and the management, were evaluated. Furthermore, and taking into account the important role of stress in the clinical presentation of some parasite infections, we evaluated the stress response as an indicator when designing appropriate control strategies.

In this study, the overall prevalence of parasite infection was 53%. Infections were noted in 26 out of 27 of the facilities sampled with prevalence ranging from 8.3% to 94%. Feline colonies showed the highest prevalence (70.4%) followed by rescue shelters (58.8%) and catteries (41.4%). Breeding catteries showed the least prevalences (20.8%), and in one of such no parasite infection was detected. In addition, the parasite population was different according to the kind of collectivity. Thus, in feline colonies, free roaming cats which show a markedly predatory behavior were significantly more parasitized by helminths, whereas in cats living in the other collectivities involving confinement and with limited or no contact outdoors, protozoa infections were predominant. It is noteworthy to note that, in breeding catteries no helminth infection was detected.

Giardia spp. was the most prevalent intestinal parasite reported, and both the cat specific (assemblage F), and assemblage A, regarded as potentially zoonotic, were identified. Concerning *Cryptosporidium* spp., only *C. felis* was detected.

Finally, animal welfare was evaluated by quantifying fecal glucocorticoid metabolites (FGM), by two different sampling. Thus, an enzyme immunoassay was previously validated for the species and biological matrix of interest. Once validated, FGM were quantified, and the results were statistically analyzed. Breeding catteries showed the highest mean value of FGM, probably because of the physiological alterations during the reproductive process. Rescue shelters showed significantly higher levels than both catteries and feline colonies. The first two involved confinement, whereas feline colonies are related to free-ranging lifestyle.

ABREVIATURAS

18S rRNA	subunidad 18S del RNA ribosomal
18S rDNA	subunidad 18S del DNA ribosomal
<i>bg</i>	beta-giaridna
CER	captura, esterilización y retorno
COWP	proteína de la pared del ooquiste (<i>Cryptosporidium</i> oocyst wall protein)
CV	coeficiente de variación
DNA	ácido desoxiribonucleico (desoxyribonucleic acid)
<i>ef1α</i>	factor de elongación 1-alfa
EIA	Enzimoimmunoensayos
ELISA	ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (Enzyme-linked immunosorbent assay)
FDA	Food and Drug Administration
FeLV	virus de la leucemia felina (Feline leukemia virus)
FGM	metabolitos de glucocorticoides fecales (fecal glucocorticoid metabolites)
FITC	isotiocianato de fluoresceína
FIV	virus de la inmunodeficiencia felina (Feline immunodeficiency virus)
GC	Glucocorticoides
<i>gdh</i>	glutamato deshidrogenasa
IFA	ensayo de inmunofluorescencia (immunofluorescence assay)
HIV	virus de la inmunodeficiencia humana (human immunodeficiency virus)
HPA	hipotálamo-hipófisis-adrenal (hypothalamic-pituitary-adrenal axis)
ITS-1 / 2	regiones intergénicas 1 y 2
n/r	no referido
PCR	reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction)
RFLP	fragmentos de restricción de longitud polimórfica
RIA	Radioimmunoensayo
RNA	ácido ribonucleico (ribonucleic acid)
SSU-rRNA	Subunidad pequeña del RNA ribosomal
<i>tpi</i>	Triosafosfatisomerasa
ZnSO ₄	sulfato de zinc

ÍNDICE

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN GENERAL	3
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	7
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	47
OBJETIVOS	48
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	51
Estudio coprológico	52
Estudio molecular	54
Estudio bienestar	59
V. RESULTADOS	65
Estudio coprológico	65
Estudio molecular	74
Estudio bienestar	84
VI. DISCUSIÓN.....	99
Centros de acogida y gateras	101
Colonias felinas	110
Criaderos	114
Técnicas diagnósticas	116
Técnicas coprológicas	116
Técnicas inmunológicas	125
VII. CONCLUSIONES	129
VIII. ANEXOS	133
ANEXO I. Escala de consistencia fecal	133
ANEXO II. Protocolo de la técnica coprológica de concentración por flotación en sulfato de zinc ($\delta=1.18$)	134
ANEXO III. Protocolo de la técnica de inmunofluorescencia directa	135
ANEXO IV. Protocolo de la técnica de cultivo selectivo para <i>Tritrichomonas</i> spp.	136
ANEXO V. Protocolo de la técnica de tinción Diff-Quick	137
ANEXO VI. Protocolo para la identificación del genotipo de <i>Giardia</i> spp. por nested-PCR /RFLP; y de la especie de <i>Cryptosporidium</i> por nested-PCR.	138
ANEXO VII. Protocolo de extracción de esteroides en muestras fecales	143
ANEXO VIII. Protocolo de cuantificación de cortisol fecal	144
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	147

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

En las últimas décadas, el gato doméstico ha adquirido una gran importancia como animal de compañía (The Statistical Portal: Number of dogs and cats in the European Union in 2017, by country). En el Estado español, por ejemplo, se ha documentado un notable crecimiento del número de hogares con gatos en los últimos años (Figura 1).



Figura 1. Evolución del número de gatos en España, desde 2005 a 2014.

Fuente: (Análisis y Caracterización del sector de los animales de compañía, 2015)

En consecuencia, se ha observado una proliferación de colectivos felinos, ya sea debido a la actividad lucrativa en la compra-venta del gato como animal de compañía, o bien a causa del abandono/pérdida de los animales (Fundación Affinity Petcare S.A.: Infografía del estudio de abandono y adopción, 2018). De acuerdo con la legislación vigente en Cataluña en materia de protección animal, es competencia de los ayuntamientos la recogida de estos animales abandonados, y su reubicación en emplazamientos públicos donde velar por su bienestar (Generalitat de Catalunya, Ley 22/2003, del 4 de julio, de protección y defensa de los animales de compañía). Cabe añadir la existencia de asociaciones privadas, sin ánimo de lucro, quienes también pueden hacerse cargo de este proceso. En función de sus características, se pueden definir diferentes colectivos felinos: por un lado, aquellos centros públicos o privados que alojan gatos abandonados y se encargan de gestionar actividades de adopción, como son los centros de acogida o las gateras. Por otro lado, colonias de gatos asilvestrados que se establecen en núcleos urbanos, y cuyo control compete a entidades públicas o privadas. Y finalmente, los criaderos, como centros privados que destinan los animales a la reproducción y la posterior venta o cesión de la descendencia.

En un colectivo, el contacto entre individuos, así como la coexistencia de animales de diferentes edades, orígenes y estados inmunitarios (Lucio-Forster and Bowman, 2011), favorecen la transmisión y el mantenimiento de enfermedades infecto-contagiosas. Un ejemplo de agentes infecto-contagiosos son los parásitos intestinales, los cuales se presentan en elevada prevalencia en colectivos felinos, a nivel mundial (Coelho *et al.*, 2009; Waap *et al.*, 2014; Kostopoulou *et al.*, 2017). La importancia de estos agentes no solo reside en su potencial patógeno para los animales, sino que algunos son considerados de importancia en salud pública. Entre otros, destacan los protozoos intestinales *Giardia* spp., y *Cryptosporidium* spp., o el nematodo *Toxocara* spp., capaces de infectar a un amplio rango de mamíferos, incluyendo el ser humano (Fletcher *et al.*, 2012). El diagnóstico laboratorial de estas protozoosis se basa en el análisis de las heces, sin embargo, las técnicas rutinarias a menudo fracasan en su detección (Payne and Artzer, 2009). Es por ello que se propone combinar estos métodos con otros más sensibles, que aporten certeza en el diagnóstico. Las técnicas de biología molecular a partir de material fecal, no sólo cuentan con altos índices de sensibilidad, sino que, adicionalmente, permiten la identificación a nivel de genotipo o especie, lo cual es imprescindible para notificar si entrañan peligro o no, para la salud pública (Nantavisai *et al.*, 2007).

La circulación de infecciones parasitarias se ve favorecida por factores ambientales y de manejo, a la vez que puede suponer un desafío para el bienestar de los animales alojados. Este parámetro ha suscitado mucho interés en las últimas décadas (Schatz and Palme, 2001), de tal manera que se han desarrollado diversas herramientas para su análisis. Una de ellas, se basa en medir la respuesta fisiológica de estrés (Millsbaugh and Washburn, 2004; Stewart *et al.*, 2005), mediante la cuantificación de glucocorticoides, ya que estas hormonas son el resultado final de esta compleja cascada endocrina, mediada por el eje hipotálamo-hipófisi-adrenal (Charmandari *et al.*, 2005; Le Moal, M., 2007; Romero and Butler, 2007). Debido a sus características de metabolización y eliminación, los glucocorticoides se acumulan en diversas matrices biológicas como sangre, saliva, pelo, heces u orina (Sheriff *et al.*, 2011). En estas poblaciones de gatos estudiadas, la recogida de material fecal resulta una buena opción, por la facilidad de muestreo, y su bajo carácter invasivo. Los métodos para la detección de glucocorticoides más utilizados a día de hoy son los inmunoensayos (Möstl *et al.*, 2005), especialmente aquellos que emplean marcadores enzimáticos. Previamente a la interpretación de los resultados, no obstante, estas técnicas deben ser validadas para cada especie y matriz biológica (Möstl *et al.*, 2005; Sheriff *et al.*, 2011).

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Desde su domesticación en el Antiguo Egipto, el gato doméstico (*Felis silvestris catus*), se ha extendido por todo el mundo (McDonald *et al.*, 2000; Driscoll *et al.*, 2009), con una población estimada de 600 millones (McLamb, E., 2013). De acuerdo con estudios filogenéticos realizados sobre felinos modernos (Randi and Ragni, 1991; O'Brien, J., 1997), esta especie evolucionó a partir de ancestros de hábitos solitarios. Sin embargo, se ha observado que los gatos domésticos que no viven en cautividad se comportan como animales gregarios, aunque también pueden vivir de manera independiente (Genovesi *et al.*, 1995). Devillard *et al.*, afirman que esta variación en los patrones sociales, así como la densidad de población, se establecen en función de la disponibilidad de alimento en una determinada área. En entornos rurales, donde se agrupan aproximadamente menos de 2.5 gatos por hectárea, estos animales muestran, generalmente, estilos de vida solitarios o constituyen pequeños grupos (Devillard *et al.*, 2003). En áreas urbanas, en cambio, donde la disponibilidad de alimento es más abundante, se concentran entorno a 10 gatos por hectárea, y los individuos se congregan en grupos más numerosos (Genovesi *et al.*, 1995).

El principal rol del gato en nuestra sociedad ha estado vinculado a una función en el control de roedores. Sin embargo, en las últimas décadas, está adquiriendo una mayor importancia como animal de compañía. Un informe recientemente publicado por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio ambiente (Análisis y Caracterización del sector de los animales de compañía, 2015) refleja un incremento en el número de hogares españoles que tienen gatos como animal de compañía. Esta tendencia es mucho más significativa en otros países europeos, como Alemania o Francia, donde datos sobre el censo de animales de compañía recogidos durante el 2017, informan de la presencia de 9.2 millones de perros y 13.7 millones de gatos, en el primero, y 7.4 millones y 13.5 millones, respectivamente, en el segundo (The Statistical Portal, Number of dogs and cats in the European Union in 2017, by country). En consecuencia, se ha producido una proliferación de colectivos felinos, debido a la actividad lucrativa en la compra-venta del gato como animal de compañía, o bien a causa del abandono/pérdida del animal. Los diferentes tipos de colectividades donde son ubicados los gatos domésticos, presentan características particulares, pero todas ellas se rigen por el principio fundamental de velar por las necesidades básicas de los animales. Éstas incluyen las necesidades fisiológicas, como la disponibilidad de alimento y el confort térmico, las necesidades de comportamiento, en referencia a la estimulación apropiada mediante el enriquecimiento ambiental, que permite desarrollar los patrones comportamentales inherentes de su especie y las necesidades de alojamiento, con condiciones de humedad, iluminación y espacio, adecuadas. En función de las características y los objetivos de estos emplazamientos donde son alojadas poblaciones de gatos domésticos, se pueden definir diferentes colectividades.

Los centros de acogida, son refugios pertenecientes a asociaciones legalmente constituidas y sin ánimo de lucro, que albergan animales perdidos o abandonados, a la espera de ser adoptados o devueltos a sus legítimos propietarios (Generalitat de Catalunya, Ley 22/2003, del 4 de julio, de protección y defensa de los animales de compañía). Se pueden subclasificar en función del tipo de animales que son alojados. Por un lado, se presentan los centros de acogida de perros y gatos, donde cohabitan ambas especies, y las gateras, donde sólo se aceptan gatos. Independientemente de las especies animales que sean acogidas, ambos colectivos funcionan, en términos generales, del mismo modo.

En países desarrollados, el número de gatos perdidos o abandonados no es, en absoluto, una cuestión desdeñable. Datos recopilados en el Reino Unido ilustraron que fueron albergados 156.826 gatos durante el año 2012, y un 70% de los refugios operaban a la máxima capacidad (Stavisky *et al.*, 2012). En los Estados Unidos diversas instituciones estimaron que se abandonaban anualmente de dos a tres millones de gatos, de los cuales el 70-75% tenían que ser eutanasiados debido a problemas de sobrepoblación (Stella and Croney, 2016). Según un estudio de la Fundación Affinity sobre el abandono, la pérdida y la adopción de animales de compañía en España en 2017, un total de 33.473 gatos fueron recogidos por las sociedades protectoras españolas, el 91% de los cuales, fueron encontrados o capturados en la vía pública (Fundación Affinity Petcare S.A.: Infografía del estudio de abandono y adopción, 2018). La principal causa de abandono de gatos eran las camadas indeseadas (15.5%), mientras que el temor a contraer toxoplasmosis durante el embarazo sólo representó un 1.3% de los casos.

De los animales recogidos en refugios, el 40.5% fueron adoptados y sólo el 3.7% de los gatos fueron recuperados por sus propietarios. Uno de los motivos de este bajo porcentaje radica en el reducido número de gatos convenientemente identificados, mediante microchip. El resto permanecen en el refugio (15.4%), fallecen o son sacrificados por motivos médicos (13.5%), o bien son reubicados en colonias (13.1%), especialmente gatos asilvestrados o no adoptables o, en caso contrario, en casas de acogida (5%) (Fundación Affinity Petcare S.A.: Infografía estudio de abandono y adopción, 2018). Cabe destacar que, en el caso de Cataluña, la Ley de Protección animal (Generalitat de Catalunya, Ley 22/2003, del 4 de julio, de protección y defensa de los animales de compañía) exige la admisión en centros de acogida de animales abandonados, y prohíbe su sacrificio, excepto cuando existan razones sanitarias o humanitarias que así lo justifiquen. Como consecuencia, los centros para el mantenimiento de animales de compañía han de adaptarse a estas medidas, lo que conlleva, en muchos casos, a una sobrepoblación de los colectivos.

Las entidades a cargo de estos centros pueden ser públicas o privadas. La legislación vigente en materia de protección animal, obliga a los ayuntamientos a disponer de centros de acogida en condiciones adecuadas y con capacidad suficiente, donde alojar animales abandonados, o perdidos. El plazo para recuperar un animal es de 20 días, si transcurrido dicho plazo no ha sido

reclamado por el propietario, el animal se considera abandonado, y puede ser cedido, acogido temporalmente, o adoptado. La acogida de animales de compañía se debe ajustar a una serie de requerimientos. Cada centro debe llevar el libro de registro de cada animal que ingresa, con las circunstancias de su captura, hallazgo o entrega, y con los datos del animal. Los centros deben estar habilitados para garantizar la integridad física y psíquica de los animales, evitar su huida, y limitar la densidad de individuos, con el fin de minimizar el riesgo de peleas y la propagación de enfermedades infecto-contagiosas. Las personas adoptantes deben compartir presencialmente el proceso de adopción, con los profesionales del centro y, antes de recoger la documentación del animal, deben rellenar una solicitud de adopción, y otros documentos específicos, así como abonar las tasas pertinentes.

Al tratarse de entidades sin ánimo de lucro, su financiación proviene principalmente de socios, padrinos, subvenciones, donativos, o eventos benéficos, y su funcionamiento depende en gran parte de la labor que desempeñan los voluntarios.

Entre las rutinas diarias más importantes en este tipo de colectivos, se incluyen: inspección visual de los animales, limpieza y desinfección de las instalaciones y los utensilios de alimentación, bandejas de deposición, etc., y alimentación de los animales.

Las colonias felinas consisten en agrupaciones controladas de gatos ferales, debidamente esterilizados, que conviven en una área no delimitada, pública o privada, a cargo de organizaciones o entidades cívicas sin afán de lucro, con el objetivo de velar por su bienestar y donde reciben atención, vigilancia sanitaria y alimentación (Generalitat de Catalunya, Ley 22/2003, del 4 de julio, de protección y defensa de los animales de compañía). Este mismo código legislativo, define el gato feral como especie felina doméstica, que no está socializada con los seres humanos y que, por lo tanto, no es adoptable. Los gatos ferales aparecen por el abandono o la huida de gatos domésticos sin esterilizar, que se asilvestran tras sobrevivir un tiempo por sí mismos, o son gatos descendientes de otros gatos ferales (Generalitat de Catalunya, Ley 22/2003, del 4 de julio, de protección y defensa de los animales de compañía). Se atribuye a los ayuntamientos la gestión de los animales asilvestrados, que deben ser ubicados en localizaciones que permitan tanto la protección, como el control poblacional, y que consiste en la captura, esterilización y retorno (CER). Una vez capturados, los animales son sometidos a una inspección veterinaria para descartar que sufran alguna enfermedad infecto-contagiosa. Después de ser esterilizados por un veterinario cualificado, se marcan con un pequeño corte del pabellón auditivo, para evitar que vuelvan a entrar en el proceso CER y, finalmente, se devuelven al entorno donde fueron capturados. La identificación y censo se realizará siempre a nombre del ayuntamiento respectivo, al que compete la vigilancia sanitaria y el control de estas poblaciones. Cuando las constituyan particulares o entidades de defensa de los animales, requerirán una autorización municipal previa, siendo éstos responsables de garantizar el

mantenimiento de las condiciones higiénico-sanitarias y de salubridad especificadas y que, en su caso, se establezcan en dicha autorización. Los gatos pertenecientes a colonias serán alimentados con pienso y dispondrán de agua, *ad libitum*.

Los criaderos de gatos se definen como aquellos centros privados que destinan los animales a la reproducción y la posterior venta o cesión de la descendencia, ya sea directamente al público en general, o indirectamente a establecimientos de venta. Los animales deberán ser vendidos en perfecto estado sanitario y libres de cualquier enfermedad; con la certificación de un facultativo veterinario que acredite la veracidad de estas circunstancias. Además, las personas que trabajen en estos establecimientos deberán estar en posesión del carnet de cuidador y manipulador de animales. Los centros de venta de animales no podrán sacrificarlos, salvo cuando existan razones sanitarias o humanitarias que así lo justifiquen, y en cuyo caso será efectuado por los procedimientos que reglamentariamente se determinen, siempre previa supervisión y bajo control de un facultativo veterinario. En todo caso, antes de proceder a su sacrificio, se procurará su cesión a otros establecimientos autorizados, a su donación a particulares o a su entrega a centros de acogida de animales (Generalitat de Catalunya, Ley 22/2003, del 4 de julio, de protección y defensa de los animales de compañía).

Pese a la existencia de numerosos estudios y directrices que avalan el correcto manejo de un colectivo felino con el fin de garantizar en la medida de lo posible el bienestar de los animales, en muchos casos aparecen factores que lo desafían. Uno de estos factores podría ser la limitación del espacio; según Rochlitz *et al.*, el mero hecho de permanecer confinado en un espacio limitado con otros conoespecíficos, podría no ser adecuado para un óptimo nivel de bienestar (Rochlitz *et al.*, 1999). Si un recinto es demasiado pequeño en relación al número de individuos, se puede incrementar la probabilidad de encuentros agonísticos y, con la finalidad de evitarlos, estos animales pueden responder con una disminución de su actividad. Adicionalmente, la alta densidad de individuos compartiendo el mismo espacio favorece la presencia de procesos infecto-contagiosos (Turner *et al.*, 2012). Factores ambientales, de manejo, densidad poblacional, o constante flujo de individuos –generalmente de diferentes edades, orígenes, o estados inmunitarios–, son factores que contribuyen de manera decisiva a la endemidad de determinados procesos infecto-contagiosos en el colectivo (Pesavento and Murphy, 2014; Polak and Smith-Blackmore, 2014).

Algunos de estos agentes infecto-contagiosos, ya sean virus, bacterias, parásitos u hongos; son eliminados al exterior a través de las secreciones de los animales infectados, y contaminan el medio ambiente. Esta estrategia de transmisión es especialmente eficaz en aquellas áreas donde se concentra un gran número de individuos, puesto que existe mayor probabilidad de contactos efectivos. De acuerdo con Möstl *et al.*, la prevalencia de microorganismos patógenos y, por lo

tanto, de enfermedades infecto-contagiosas, se puede correlacionar con la densidad de población, y el tamaño del grupo (Möstl *et al.*, 2013). De esta manera, en cualquier colectivo animal deben instaurarse medidas de control adecuadas, en relación a las instalaciones y el manejo, con el fin de reducir especialmente el número de individuos portadores asintomáticos (Pesavento and Murphy, 2014, Polak and Smith-Blackmore, 2014; Addie *et al.*, 2015). Para ello, es conveniente contar con una zona de cuarentena, separada del recinto ocupado por el resto de individuos, donde poder vigilar a los animales durante un tiempo prudencial (mínimo 3 semanas) (Möstl *et al.*, 2013), antes de ser introducidos en el colectivo, así como salas de aislamiento para aquéllos que presenten síntomas de infección (como por ejemplo cuadros respiratorios o intestinales), o sean positivos para los virus de la inmunodeficiencia (HIV) o leucemia felina (FeLV). Las diferentes áreas deben estar separadas, para evitar el contacto directo de gatos infectados con gatos sanos; y, además, cada una debe estar provista con sus propios cuencos de agua y comida, bandejas de deposición, y objetos varios para los animales. También se debe restringir el movimiento del personal de un recinto a otro, para evitar la propagación de agentes infecto-contagiosos via fómites (Pesavento and Murphy, 2014). En este sentido, es importante garantizar un aprendizaje continuado de los trabajadores en procedimientos higiénico-sanitarios. Por un lado, éstos deben equiparse debidamente en el momento de realizar las tareas, con ropa, guantes, cubrezapatos desechables o calzado adecuado, que convendría sumergir en pediluvios antes de acceder a las diferentes áreas. Por el otro, se deben aplicar los protocolos de limpieza y desinfección, de manera rigurosa. Así, las instalaciones deben limpiarse y desinfectarse a diario, lo que implica retirar la materia orgánica de los cuencos, bandejas del recinto y, posteriormente, desinfectar. La elección de este último método es importante, y se hará en función de su eficacia contra los diferentes patógenos, y de su seguridad para los animales y el personal (Addie *et al.*, 2015). Por ejemplo, en el caso de las formas de resistencia parasitarias, algunos estudios han demostrado que ciertos compuestos químicos son ineficaces en la inactivación de algunos huevos de nematodos. Morrondo *et al.*, y Verocai *et al.*, demostraron en diferentes estudios que un porcentaje considerable de huevos de *Toxocara canis* continuaban el desarrollo larvario tras permanecer durante un tiempo prolongado (1 mes) en soluciones desinfectantes de uso común, como el formaldehído y el cloruro de benzalconio (Verocai *et al.*, 2010). Kopper y Mansfield, revelaron efectos ovicidas del hipoclorito sódico (lejía), en *Toxocara* spp., y *Trichuris* spp. (Kopper and Mansfield, 2010). Sin embargo, Morrondo *et al.*, documentaron que el tratamiento con este mismo producto, deformaba los huevos de *Toxocara* spp., pero la larva seguía desarrollándose en su interior, hasta inactivarse completamente al cabo de 15 días (Morrondo *et al.*, 2006). Por otro lado, la desinfección con vapor de agua también mostró una eficacia frente a ooquistes de *Toxoplasma* spp., o *Cystoisospora* spp. y, además, se considera el producto más seguro por su reducida toxicidad (Wood *et al.*, 2014; Addie *et al.*, 2015). Finalmente, los compuestos de

amonio cuaternario, ya sea de aplicación individual o en combinación con otros productos, son efectivos para la inactivación de quistes de *Giardia* spp. (Geurden *et al.*, 2006).

En consecuencia, la presencia de procesos infecto-contagiosos en un colectivo es elevado por muchos factores que, entre otros, favorecen la transmisión de los diferentes patógenos y dificultan su previsión y control. A lo largo de su ciclo biológico, la mayoría de ellos eliminan formas de transmisión parásita al exterior (Zajac and Conboy, 2012). Estas estructuras, ya sean quistes, ooquistes, huevos o larvas, contaminan el entorno y gracias a sus propiedades físico-químicas, que les confieren alta resistencia a las condiciones ambientales, pueden mantenerse infectivas durante largos períodos de tiempo (Cordero deL Campillo *et al.*, 1999). Diferentes estudios realizados en colectivos felinos ponen de manifiesto que las parasitosis son intrínsecas a los colectivos animales y están consideradas como uno de los principales problemas de salud animal (Lucio-Forster and Bowman, 2011) (Tabla 1). La importancia de estos parásitos no sólo radica en su eventual poder patógeno para los animales, sino que algunos también son potencialmente zoonóticos. Este es el caso de algunos protozoos intestinales de transmisión feco-oral, como *Giardia* spp. o *Cryptosporidium* spp., que están implicados en cuadros de diarreas, aunque algunos individuos presentan infecciones subclínicas (Cacciò *et al.*, 2005; Fletcher *et al.*, 2012; Tysnes *et al.*, 2014). Asimismo, también destacan las zoonosis provocadas por las fases larvianas de algunos helmintos como el ascárido *Toxocara* spp. o los ancilostómidos *Ancylostoma* spp. y *Uncinaria* spp. (Traversa, D., 2012). De igual modo, también destacan otros agentes protozoarios asociados a cuadros gastrointestinales, como son *Cystoisospora* spp. y *Tritrichomonas* spp., a pesar de no tener ninguna implicación sobre la salud pública (Hinney *et al.*, 2015).

COLECTIVO	PAÍS	PREVALENCIA TOTAL	PARÁSITOS MÁS FRECUENTES	REFERENCIA
REFUGIOS ANIMALES	Polonia	48.5%	<i>Toxocara cati</i> (27.9%) <i>Cystoisospora</i> spp. (11.8%)	(Szwabe and Blaszkowska, 2017)
	Grecia	55.9%	<i>Giardia</i> spp. (39%) <i>Cystoisospora</i> spp. (8.3%)	(Kostopoulou <i>et al.</i> , 2017)
	Canada	31.8%	<i>Toxocara</i> spp. (16.5%) <i>Cystoisospora</i> spp. (14%)	(Villeneuve <i>et al.</i> , 2015)
	Austria	18.8%	<i>Giardia</i> spp. (12.4%) <i>Cystoisospora</i> spp. (4%)	(Hinney <i>et al.</i> , 2015)
	Alemania	33.6%	<i>Toxocara cati</i> (27.1%) <i>Isospora</i> spp. (7.5%)	(Becker <i>et al.</i> , 2012)
	Estados Unidos	50.9%	<i>Cystoisospora</i> spp. y <i>Toxocara cati</i> (21%) <i>Giardia</i> spp. (8.9%)	(Lucio-Forster and Bowman, 2011)
	España	34%	<i>Toxocara cati</i> (22%) <i>Giardia</i> spp. (6%)	(Gracenea <i>et al.</i> , 2009)
	Portugal	100%	<i>Ancylostoma</i> spp. (96%) <i>Toxocara cati</i> (43.1%)	(Coelho <i>et al.</i> , 2009)
	Australia	26.8%	<i>Giardia</i> spp. (11.5%) <i>Cystoisospora</i> spp. (9.8%)	(Bissett <i>et al.</i> , 2009)
	Cataluña	57%	<i>Giardia</i> spp. (27%) <i>Toxocara</i> spp. (16.7%)	(Blasco <i>et al.</i> , 2017)
COLONIAS FELINAS	Turquía	48.9%	<i>Isospora</i> spp. (65.9%) <i>Toxocara</i> spp. (48.9%)	(Korkmaz <i>et al.</i> , 2016)
	Iran	86.4%	<i>Toxocara</i> spp. (45%) <i>Isospora</i> spp (21.4%)	(Khademvatan <i>et al.</i> , 2014)
	Portugal	90.7%	<i>Cystoisospora</i> spp. (46.3%) <i>Dipylidium caninum</i> (53.1%)	(Waap <i>et al.</i> , 2014)
	Italia	50.4%	<i>Toxocara cati</i> (33.1%) <i>Ancylostoma tubaeforme</i> (7.2%)	(Spada <i>et al.</i> , 2013)
	Egipto	91%	Taenidae (22%) <i>Toxocara cati</i> (9%)	(Khalafalla, R., 2011)
	Portugal	23.1%	<i>Toxocara cati</i> (10.8%) <i>Isospora felis</i> (5.4%)	(Duarte <i>et al.</i> , 2010)
	Brasil	87.9%	<i>Cystoisospora</i> spp. (74.2%) <i>Ancylostoma</i> spp. (60.6%)	(Serra <i>et al.</i> , 2003)
CRIADEROS	Japón	20.8%	<i>Gairdia</i> spp. (18.7%) <i>Cystosisospora</i> spp. (5%)	(Ito <i>et al.</i> , 2016)
SANTUARIOS	Estados Unidos	n/r	<i>Giardia</i> spp. (56%) <i>Tritrichomonas foetus</i> (39%)	(Polak and Smith-Blackmore, 2014)

Tabla 1. Prevalencia de infección parasitaria en diferentes colectivos felinos, a nivel mundial. Fuente: autor

En las últimas décadas, estudios epidemiológicos en diferentes colectivos felinos sobre parásitos que eliminan formas de transmisión en heces, han observado prevalencias de infección muy variables. La mayoría de ellos, no obstante, coinciden en la detección de protozoos (sobre todo, *Giardia* spp. y *Cystoisospora* spp., y *Toxocara* spp., como los parásitos más prevalentes.

El género *Cystoisospora* (sin. *Isospora*) se enmarca dentro del grupo de los coccidios (Dubey, J., 2014). Su clasificación taxonómica incluye el Reino protista; Phylum Apicomplexa, Clase Conoidasida; Orden Eucoccidiorida; Familia Eimeriidae; Género *Isospora/Cystoisospora* (Taylor *et al.*, 2016). Originalmente, se calificó como *Isospora* spp. para hacer referencia a estos protozoos monoxenos, pero más adelante se propuso el nombre de *Cystoisospora* spp., para aquellas especies que utilizaban hospedadores paraténicos en su ciclo biológico (Frenkel, J., 1977). No obstante, esta denominación no llegó a ser totalmente reconocida entre la comunidad científica (Lindsay *et al.*, 1997) y, de hecho, hoy en día muchos autores emplean ambos nombres indistintamente. Se trata de un protozoo intestinal que se caracteriza por su ubicuidad y elevada especificidad hospedatoria.

Diversas publicaciones realizadas a nivel mundial, en gatos domésticos alojados en colectivos, han estimado prevalencias que oscilan del 4% en Austria, al 74.2% en Brasil (Serra *et al.*, 2003; Bisset *et al.*, 2009; Duarte *et al.*, 2010; Lucio-Forster and Bowman, 2011; Becker *et al.*, 2012; Khademvatan *et al.*, 2014; Hinney *et al.*, 2015; Villeneuve *et al.*, 2015; Ito *et al.*, 2016; Korkmaz *et al.*, 2016; Kostopoulou *et al.*, 2017; Szwabe and Blaszkowska, 2017). Las especies que infectan a los felinos domésticos, *C. felis* y *C. rivolta*, afectan con más frecuencia a individuos jóvenes, especialmente por debajo de los 4 meses (Bowman *et al.*, 2002), y su prevalencia disminuye con la edad (Gow *et al.*, 2009), a medida que el sistema inmune va madurando. La infección en animales adultos se manifiesta, especialmente, en individuos geriátricos o inmunocomprometidos (Tzannes *et al.*, 2008; Petry *et al.*, 2011).

El ciclo biológico de *Cystoisospora* spp. es directo y tiene lugar en tres fases, características de los coccidios: esporogonia, merogonia y gametogonia. En cada una de ellas, el parásito presenta diferentes morfologías (Sinski and Behnke, 2004; Taylor *et al.*, 2016). Se inicia cuando el hospedador definitivo ingiere, o bien los ooquistes esporulados en el medio ambiente; o los esporozoítos presentes en tejidos extraintestinales de un hospedador paraténico (Lindsay *et al.*, 1997). Durante la fase de merogonia, los esporozoítos contenidos en los ooquistes, se desenquistan, e invaden las células del epitelio intestinal, donde comienzan un proceso de división asexual por endodiogenia, que resultará en la producción de merozoítos de primera y segunda generación (Dubey *et al.*, 2014). Éstos colonizan las células vecinas y prosiguen su multiplicación hasta que, en cierto momento, se diferencian en gametocitos masculinos (microgametos) y femeninos (macrogametos). En la fase de reproducción sexual o gametogonia, estos gametocitos se reproducen sexualmente y dan lugar a los cigotos, los cuales, a su vez,

formarán los ooquistes (Cordero del Campillo *et al.*, 1999). Estas formas de resistencia se eliminan al exterior a través de las heces, produciéndose una esporulación exógena (fase de esporogonia), y durante la cual se desarrollarán en su interior dos esporocistos, con cuatro esporozoítos infectivos, cada uno.

La patogenia de estas parasitosis está relacionada con la invasión de las células intestinales y el proceso de multiplicación (Lindsay *et al.*, 1997). De las dos especies, *C. felis* es la que presenta mayor patogenicidad. Microscópicamente, produce erosión de la superficie de los enterocitos, atrofia de las microvellosidades, e infiltrado inflamatorio de predominio neutrofílico. En los gatos adultos e inmunocompetentes, la infección cursa de manera asintomática, pero en individuos jóvenes (menores de 1 año) o inmunodeprimidos, se puede observar un cuadro clínico de diarrea mucosa (Bowman *et al.*, 2002; Pallant *et al.*, 2015).

El diagnóstico se basa, principalmente, en la detección e identificación de ooquistes tras la aplicación de métodos coprológicos de concentración, como la flotación o la sedimentación. El tamaño medio de los ooquistes es de aproximadamente 45 x 33 μm , para *C. felis*; y 23 x 26 μm , para *C. rivolta* (Lindsay *et al.*, 1997).

En cuanto al tratamiento farmacológico, la administración de sulfamidas durante 5-10 días es eficaz para controlar la diarrea, aunque no la excreción de ooquistes. Toltrazuril y diclazuril son los fármacos de elección para las cistisosporosis felinas (Petry *et al.*, 2011).

El parásito intestinal *Tritrichomonas* spp., es un protozoo flagelado que se hospeda en el tracto intestinal de los felinos domésticos. Taxonómicamente, se clasifica en el Reino Protista; Phylum Parabasalia, Clase Trichomonadea, Orden Trichomonadida, Familia Trichomonadidae, Género *Tritrichomonas* (Taylor *et al.*, 2016). Muchos autores señalan que el agente etiológico es *Tritrichomonas foetus* (Gookin *et al.*, 1999; Levy *et al.*, 2003), un protozoo considerado un parásito del aparato reproductor del ganado bovino. Sin embargo, estudios moleculares llevados a cabo por diferentes grupos de investigadores, sugieren que el tricomonádido que afecta al gato es genéticamente distinto del bovino, y merece una nueva entidad taxonómica, por lo que se propuso el nombre de *Tritrichomonas blagburni* (Slapeta *et al.*, 2010; Slapeta *et al.*, 2012; Xenoulis *et al.*, 2013; Walden *et al.*, 2013). Algunas de estas divergencias se han hallado en la secuenciación de dos espaciadores internos transcritos (ITS-1 e ITS-2), junto con genes del RNA ribosomal (rRNA) 18S, 5.8S y 28S; y, más recientemente, con el factor de elongación eucariota (EF1-alfa) y el gen de la proteasa cisteína 8 (CP8) (Gookin *et al.*, 2017). Stockdale *et al.*, refuerzan esta hipótesis con los resultados de su estudio, donde infectaron experimentalmente un grupo de vacas con un aislado bovino de *T. foetus*, y otro grupo con un aislado felino del mismo agente. En ambos grupos se observaron cambios patológicos en el aparato reproductor, pero en las posteriores evaluaciones histológicas se apreciaron diferentes lesiones en el epitelio uterino. Por un lado, todas las vacas infectadas con el aislado bovino de *T.*

foetus, presentaban la superficie epitelial alterada, e incluso ausencia de glándulas subepiteliales; mientras que seis de las siete vacas infectadas con el aislado felino, mostraban tanto el borde epitelial como glándulas subepiteliales, intactas (Stockdale *et al.*, 2007). Los mismos autores concluyen que, aunque los aislados felinos son capaces de desarrollar cambios patológicos en el ganado bovino, la incapacidad de provocar pérdida de la superficie epitelial podría ser debido a divergencias genéticas. Todos estos hallazgos, sin embargo, entran en conflicto con los documentados por otros autores, quienes revelan que los datos obtenidos del análisis comparativo de ambos transcriptomas, son insuficientes para catalogar dos especies diferentes (Morin-Adeline *et al.*, 2014). En su lugar, sugieren que se trata de dos genotipos que pertenecen a una misma especie. Actualmente no se reconoce la especie *T. blagburni* como una categoría taxonómica propia, sino que se utiliza este nombre meramente para distinguirlo del organismo que parasita a los bóvidos ya que, en algunos países, la tricomoniasis bovina es de declaración obligatoria (Gookin *et al.*, 2017).

A nivel epidemiológico, la infección se presenta, especialmente, en animales jóvenes (el 75% de los casos aparece en individuos menores de 1 año de edad), y en gatos procedentes de colectivos, particularmente de colonias felinas (Gruffydd-Jones *et al.*, 2013b). En Europa, diferentes estudios realizados en gatos que residen en grupos, documentan prevalencias de infección por *Tritrichomonas* spp. que oscilan del 14.3% en Francia al 32% en Italia (Holliday *et al.*, 2009; Xenoulis *et al.*, 2010; Kuehner *et al.*, 2011; Tysnes *et al.*, 2011; Profizi *et al.*, 2013); mientras que, en los Estados Unidos y Nueva Zelanda, se registraron valores de 31% y 82%, respectivamente (Kingsbury *et al.*, 2010; Foster *et al.*, 2004).

En el ciclo biológico directo de *Tritrichomonas* spp., los trofozoítos son eliminados a través de las heces, y la transmisión a otro hospedador se produce por la vía feco-oral (Gruffydd-Jones, *et al.*, 2013b). A diferencia de otros parásitos, que cuentan con formas de resistencia para propagarse al exterior, este protozoo mantiene la fase vegetativa durante todo el ciclo. En este aspecto, los trofozoítos son muy lábiles en el medio ambiente, por lo que la transmisión se produce tras el contacto íntimo entre individuos, como el que se da entre una madre y su camada, o en ambientes con una alta densidad de animales (Profizi *et al.*, 2013). Cuando estos tricomonádidos alcanzan la luz intestinal, se adhieren a la superficie epitelial gracias a la acción de una serie de moléculas propias del parásito, entre las que se incluyen adhesinas, lipofosfoglican, y proteasas (Tolbert and Gookin, 2016). Algunas de ellas no sólo están implicadas en mecanismos de adherencia, sino que también intervienen en funciones de evasión de la actividad inmunitaria del hospedador. Es el caso de las proteasas, que se encargan de degradar algunos elementos no específicos de la respuesta inmune, como fibrinógeno, fibronectina, albúmina y lactoferrina; pero también otro tipo de moléculas, como inmunoglobulinas (Doumecq and Soto, 2012). La patogenia de esta parasitosis se relaciona con el efecto citotóxico provocado por la secreción de estos componentes por parte del trofozoíto.

Además, estos organismos se localizan en la superficie del epitelio intestinal, desencadenando una respuesta inflamatoria linfocítica y neutrofílica, pero algunos estudios histológicos han demostrado que pueden llegar a zonas más profundas del epitelio, lo que resulta en una respuesta inflamatoria más severa (Taylor *et al.*, 2016). Generalmente el curso de la infección es asintomático, pero en animales inmunodeprimidos puede aparecer un cuadro clínico característico de diarrea crónica (Bissett *et al.*, 2009).

Los métodos laboratoriales para el diagnóstico de la tricomoniasis felina incluyen técnicas tradicionales, como el examen directo de heces y el cultivo selectivo, y modernos basados en biología molecular (Dos Santos *et al.*, 2015). Las primeras, que se basan en el uso de microscopía convencional, presentan una serie de limitaciones relacionadas con el tipo de muestra y la identificación del parásito a nivel de especie. Por un lado, el examen debe hacerse con muestras fecales muy frescas, ya que los trofozoítos tienen un tiempo de supervivencia reducido en el exterior (Gookin *et al.*, 2003). Por otro lado, el medio de cultivo no es exclusivo para *Tritrichomonas* spp., ya que también permite el crecimiento de otras especies de tricomonádidos, como es el caso de *Pentatrichomonas hominis*, por lo que se requiere la aplicación de otros métodos que establezcan un diagnóstico definitivo (Caplecha *et al.*, 2013). Son las técnicas de biología molecular las que ofrecen mejores índices de sensibilidad y especificidad, y permiten la identificación inequívoca de la especie (Grellet *et al.*, 2013).

Actualmente no se cuenta con ningún producto registrado para el tratamiento de la tricomoniasis felina (Gruffydd-Jones *et al.*, 2013b). El ronidazol (30 mg/kg, repartido en dos veces al día durante dos semanas) se ha utilizado con éxito, en aquellos casos con diarreas graves. Sin embargo, se ha descrito un estrecho margen entre la seguridad del medicamento y su eficacia, en gatos (Rosado *et al.*, 2007).

Giardia spp. es otro protozoo intestinal del grupo de los flagelados. Taxonómicamente, pertenece al Reino Protista; Phylum Fornicata; Clase Metamonadea; Orden Giardiida; Familia Giardiidae; Género *Giardia* (Taylor *et al.*, 2016). Las seis especies que se incluyen dentro del género son las causantes de la giardiasis en un amplio rango de animales: *G. agilis* en anfibios, *G. ardeae* y *G. psittaci* en aves, *G. microti* y *G. muris* en roedores, *G. varani* en reptiles y *G. duodenalis* en numerosas especies de mamíferos (Cacciò and Ryan, 2008). En base a la morfología y ultraestructura de los trofozoítos, se pueden llegar a identificar y diferenciar todas ellas (Tabla 2).

Species	Hosts	Morphological characteristics	Trophozoite dimensions	
			Length	Width
<i>G. duodenalis</i>	Wide range of domestic and wild mammals, including humans	Pear-shaped trophozoites with claw-shaped median bodies	12–15 µm	6–8 µm
<i>G. agilis</i>	Amphibians	Long, narrow trophozoites with club-shaped median bodies	20–30 µm	4–5 µm
<i>G. muris</i>	Rodents	Rounded trophozoites with small round median bodies	9–12 µm	5–7 µm
<i>G. ardeae</i>	Birds	Rounded trophozoites, with prominent notch in ventral disc and rudimentary caudal flagellum. Median bodies round-oval to claw shaped.	~10 µm	~6.5 µm
<i>G. psittaci</i>	Birds	Pear-shaped trophozoites, with no ventro-lateral flange. Claw-shaped median bodies.	~14 µm	~6 µm
<i>G. microti</i>	Rodents	Trophozoites similar to <i>G. duodenalis</i> . Mature cysts contain fully differentiated trophozoites.	12–15 µm	6–8 µm

Tabla 2. Características morfométricas de los trofozoítos y quistes, en las diferentes especies de *Giardia*. Fuente: (Monis *et al.*, 2009)

G. duodenalis está considerado un complejo multiespecie (Feng and Xiao, 2011). Estudios filogenéticos de una amplia gama de secuencias nucleotídicas de diferentes genes, han permitido subclasificarla en 8 genotipos (A-H). Los genotipos A y B, entre otras muchas especies de mamíferos, también pueden afectar al ser humano, por lo que a menudo son referidos como “genotipos zoonóticos” (Lalle *et al.*, 2005; Sotiriadou *et al.*, 2013), mientras que los ensamblajes C-H son específicos de hospedador (Pallant *et al.*, 2015). En base a esta especificidad y características genéticas, se han propuesto nombres exclusivos para cada genotipo: (Tabla 3) *G. duodenalis* (genotipo A), *G. enterica* (genotipo B), *G. canis* (genotipos C y D), *G. bovis* (genotipo E), *G. cati* (genotipo F), y *G. simondi* (genotipo G) (Thompson *et al.*, 2008).

Assemblage	Host distribution	Proposed species name
A	Humans and other primates, livestock, dogs, cats and some species of wild mammals	<i>Giardia duodenalis</i>
B	Humans and other primates, dogs, cats and some species of wild mammals	<i>Giardia enterica</i>
C	Dogs and other canids	<i>Giardia canis</i>
D	Dogs and other canids	
E	Hoofed livestock	<i>Giardia bovis</i>
F	Cats	<i>Giardia cati</i>
G	Rats	<i>Giardia simondi</i>
H	Marine mammals (pinnipeds)	?

Tabla 3: Genotipos de *Giardia* spp., reconocidos actualmente, su distribución de hospedores, y la taxonomía propuesta. Fuente: (Ryan and Cacciò, 2013)

Sin embargo, de acuerdo con Heyworth, es posible detectar algunos de estos genotipos en especies diferentes de su hospedador específico (Heyworth, M., 2016). En carnívoros domésticos, por ejemplo, estudios realizados en China, Europa y Australia, documentan la presencia de los genotipos C y/o D, en colectivos de gatos domésticos (Read *et al.*, 2004; Sprong *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2016). No obstante, en la mayoría de ellos los porcentajes de prevalencia observados son muy bajos: Xu *et al.*, detectaron el genotipo C en un 1% (2/160) y el genotipo D en un 0.6% (Xu *et al.*, 2016); Zheng *et al.*, también observaron el genotipo C en un 1% (1/102) (Zheng *et al.*, 2015); y Sprong *et al.*, documentaron el genotipo C en un 3% (5/158) y el genotipo D en un 2% (3/158) (Sprong *et al.*, 2009). Así, todos ellos

concluyen que la presencia de estos genotipos propios de la especie canina son hallazgos aislados, sin relevancia clínica para los animales, o incluso, fruto de una posible contaminación cruzada (Zheng *et al.*, 2015). En el estudio de Read *et al.*, en cambio, se detectó el genotipo D en un porcentaje considerable de los gatos muestreados (57%, 12/21), aunque no se hace referencia a sus estados clínicos (Read *et al.*, 2004). Inversamente, Sommer *et al.* en Alemania, detectaron el genotipo F en un 3% (1/33) de los perros estudiados, lo que también fue considerado un hallazgo aislado (Sommer *et al.*, 2018). Algunas publicaciones, incluso, han demostrado que los genotipos C, D y F, pueden parasitar a seres humanos (Gelanew *et al.*, 2007; Sprong *et al.*, 2009). Sprong *et al.*, observaron el genotipo C en un 0.1% (2/1658), y los genotipos D y F en un 0.2% (3/1658), cada uno (Sprong *et al.*, 2009); mientras que Gelanew *et al.*, documentaron la presencia del genotipo F en un 12% (7/59) de los sujetos objeto de estudio, seis de los cuales presentaban un cuadro clínico de diarrea (Gelanew *et al.*, 2007). De acuerdo con Sprong *et al.*, estos hallazgos son muy poco frecuentes, y todavía se desconoce si los genotipos propios de perros y gatos pueden provocar un cuadro clínico en seres humanos (Sprong *et al.*, 2009). Sin embargo, su potencial zoonótico ha sido ampliamente debatido. Son pocos los estudios que tratan este aspecto en colectividades felinas. En 2015 y 2016, se evidenció la circulación de los genotipos A y B en refugios de perros y gatos en China (Zheng *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2016), al igual que en Australia (Yang *et al.*, 2015). En España, se identificaron gatos procedentes de refugios, infectados con el genotipo A (Gil *et al.*, 2017; Dado *et al.*, 2012). Por otra parte, un estudio realizado en Italia también reportó la circulación de genotipos zoonóticos, en colonias felinas (Papini *et al.*, 2007). La mayoría de autores concluyen que el genotipo circulante más habitual en colectivos felinos es el específico de gato, que parece no tener impacto en la salud pública (Kváč *et al.*, 2017). Del mismo modo que ocurre con la especie canina, las variedades potencialmente zoonóticas se han identificado, sobre todo, en gatos que mantienen una estrecha relación con sus propietarios (Vasilopoulos *et al.*, 2007; McDowall *et al.*, 2011; Tysnes *et al.*, 2014; Zanzani *et al.*, 2014; Pallant *et al.*, 2015; Piekarska *et al.*, 2016). Actualmente, se estima que la giardiasis afecta a 280 millones de personas, cada año (Einarsson *et al.*, 2016). La incidencia es mayor en países subdesarrollados donde se registran prevalencias que fluctúan del 1 al 50%, mientras que en países desarrollados los porcentajes varían del 0.4 al 7% (Fletcher *et al.*, 2012; López-Romero *et al.*, 2015). En estos últimos, *Giardia* spp. ha sido considerado como uno de los parásitos reemergentes, tanto de transmisión alimentaria como por agua (Soliman *et al.*, 2011). Dorny *et al.*, atribuyen esta reemergencia a factores como la globalización del suministro de alimentos, al aumento de los viajes internacionales, o a la mejora de las herramientas diagnósticas y la comunicación, lo que ha propiciado un incremento de la detección del parásito y una mayor posibilidad de documentar los brotes de infección (Dorny *et al.*, 2009). A nivel veterinario, *Giardia* spp. es capaz de parasitar a todos los animales domésticos, siendo los rumiantes los más comúnmente infectados (O'Handley and Olson,

2006), aunque pueden no manifestar signos clínicos. Por otra parte, en carnívoros domésticos, la prevalencia de infección depende de la población estudiada y la técnica diagnóstica empleada (Thompson *et al.*, 2008), presentándose más habitualmente en animales jóvenes y en individuos que residen en colectivos (Tzannes *et al.*, 2008; Payne and Artzer, 2009; Gates and Nolan., 2009). Estudios realizados en diferentes poblaciones caninas estiman un 10% de prevalencia en perros que habitan con sus propietarios, entre un 36% y 50% en cachorros; y hasta del 100% en criaderos caninos y perreras (Thompson *et al.*, 2008). En la población felina, en cambio, la frecuencia de infección es menor (Janeczko and Griffin, 2010). Numerosos estudios sobre parasitosis intestinales en colectivos felinos, reflejan prevalencias de infección por encima de cualquier otra especie parásita, con valores que oscilan del 11.5% en Australia, al 39% en Grecia (Bissett *et al.*, 2009; Hinney *et al.*, 2015; Ito *et al.*, 2016; Kostopoulou *et al.*, 2017). En Cataluña, un estudio desarrollado sobre gatos adultos alojados en distintos refugios animales, detectó *Giardia* spp. como el parásito más frecuente, con una prevalencia de infección del 27%, y estando presente en todos los centros muestreados (Blasco *et al.*, 2017). Las prevalencias detectadas en diferentes estudios concernientes a gatos que viven con sus propietarios, varía del 0.7% al 24% (Mircean *et al.*, 2010; Itoh *et al.*, 2012; Zanzani *et al.*, 2014). Beugnet *et al.*, en un estudio multicéntrico sobre gatos de propietarios, en diferentes países europeos, detectaron una prevalencia de infección por *Giardia* spp. del 3.2% (48/1.519) (Beugnet *et al.*, 2014). Las muestras fueron obtenidas en hospitales veterinarios, y sólo se recogían si los animales no se presentaban por un proceso relacionado con infección parasitaria, y si no habían recibido un tratamiento antihelmíntico durante los dos meses previos al estudio.

El ciclo biológico de *Giardia* spp. es monoxeno y alterna dos estados morfológicos, el trofozoíto y el quiste. El primero corresponde a la fase vegetativa, localizada en el tracto intestinal, principalmente duodeno, mientras que, el segundo, es la forma de propagación que se elimina al medio ambiente. Los trofozoítos son estructuras piriformes, de 10-20 μm de longitud y 5-15 μm de anchura; y los quistes son elipsoidales o esféricos, de 11-14 μm de longitud y 7-10 μm de ancho (Rajurkar *et al.*, 2012). La pared quística de 0,3 μm de espesor le confiere resistencia a las condiciones ambientales. Aunque son sensibles a la desecación, con buenas condiciones de temperatura y humedad pueden mantenerse viables hasta más de 2 meses (Feng and Xiao, 2011).

Los trofozoítos de *Giardia* spp. causan un expolio de los principales nutrientes, tomando para su propio metabolismo proteínas, carbohidratos y grasas, entre otros (Einarsson *et al.*, 2016). Además, debido a que permanecen adheridos al epitelio intestinal, ejercen una acción traumático-irritativa que resulta en un acortamiento de las microvellosidades, destrucción del borde en cepillo, ruptura de las uniones estrechas e incluso apoptosis de los enterocitos (Scott *et al.*, 2000; Elmendorf *et al.*, 2003; Panaro *et al.*, 2007). También se ha demostrado que pueden afectar a la actividad de ciertos enzimas digestivos como lipasas, proteasas y disacaridasas

(Roxström-Lindquist *et al.*, 2006). Como consecuencia, hay importantes alteraciones en la digestión y un cuadro general de malabsorción (Buret, A., 2007), que puede traducirse en un cuadro clínico de diarrea y pérdida de peso (Taylor *et al.*, 2016). A esta sintomatología también contribuyen otros mecanismos tales como: incremento de la permeabilidad y la secreción de cloro (Cl⁻), hipermotilidad intestinal, hiperplasia de las criptas y aumento de la secreción de moco (Andersen *et al.*, 2006; Einarsson *et al.*, 2016).

El diagnóstico laboratorial de la giardiasis es complejo. De hecho, pese a los elevados índices de prevalencia, se considera una enfermedad infradiagnosticada (Payne and Artzer, 2009). Generalmente, se basa en la identificación morfológica de los quistes y, en menor medida, de los trofozoítos, en muestras fecales (Alles *et al.*, 1995). Normalmente, esta fase vegetativa se alimenta y multiplica en el intestino de su hospedador, sin embargo, en casos de diarrea profusa pueden ser desplazados y eliminados a través de las heces (Dryden *et al.*, 2006). Es entonces cuando se pueden detectar mediante un frotis directo, o una técnica de concentración, siempre y cuando se practique sobre heces frescas, pues los trofozoítos son muy lábiles en el medio ambiente. La detección mediante microscopía tradicional, tras la aplicación de técnicas coprológicas de concentración, especialmente a partir de flotación en sulfato de zinc y centrifugación (Barr *et al.*, 1992; Zajac *et al.*, 2002), es el procedimiento más habitual. Sin embargo, debido a la presentación subclínica y al patrón de eliminación intermitente de los quistes, la infección puede pasar desapercibida (Mircean *et al.*, 2010). De hecho, de acuerdo con Dryden *et al.*, son necesarias tres flotaciones en sulfato de zinc ($\delta = 1.18$) consecutivas, para alcanzar un 94% de sensibilidad en el diagnóstico (Dryden *et al.*, 2006). Por ello, algunos autores (Payne and Artzer, 2009; Koehler *et al.*, 2014) sugieren combinar dichas técnicas con otras más sensibles, con el fin de aportar certeza al diagnóstico. Por un lado, destacan los tests de detección antigénicos, que incluyen enzimoimmunoensayos (EIA), ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) o ensayos de inmunofluorescencia directa (IFA) (Fuentes *et al.*, 2010; Fletcher *et al.*, 2012). Estos métodos se basan en el uso de anticuerpos monoclonales o policlonales, que reconocen de manera específica estructuras presentes exclusivamente en un determinado parásito, o en sus formas de transmisión (Fuentes *et al.*, 2010). Cirak y Bauer compararon la efectividad de detección de quistes de *Giardia* spp. en carnívoros domésticos, mediante técnicas de flotación y kits ELISA. En un total de 98 muestras de gato, no observaron el parásito mediante flotación, mientras que, con el segundo, el protozoo fue detectado en 22 muestras (Cirak and Bauer, 2004). En un estudio publicado por Mearu *et al.*, donde comparaban la eficacia de diferentes inmunoensayos para el diagnóstico de *Giardia* spp. en gatos, se observaron valores de sensibilidad y especificidad de 72.7%-79.4% y 99%, respectivamente, para inmunoensayos no enzimáticos; y 85.3%-91.2% y 99.4%-100%, respectivamente, para EIA (Mearu *et al.*, 2007). Los IFA se basan en el mismo principio antígeno-anticuerpo, pero este último está conjugado con fluoresceína, y el producto de la

reacción puede ser observado con un microscopio de fluorescencia. Alles *et al.*, documentaron un 99.2% de sensibilidad y un 100% de especificidad, en un kit comercial de inmunofluorescencia directa, a partir de heces humanas (Alles *et al.*, 1995). Por otro lado, existen las técnicas de diagnóstico molecular, basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Además de contar con mejores índices de sensibilidad y especificidad (Bertrand *et al.*, 2005), éstas últimas permiten la identificación del genotipo de *Giardia* spp. Con la PCR se amplifican secuencias nucleotídicas de diferentes genes del parásito, entre los que se incluyen los que codifican para la subunidad pequeña del RNA ribosomal (SSU-rRNA), la proteína beta-giardina (bg), las enzimas triosafosfatisomerasa (tpi) y glutamato deshidrogenasa (gdh); o el factor de elongación alfa-1 (ef1 α), entre otros (Cacciò and Ryan, 2008; Feng and Xiao, 2011; Heyworth, M., 2016; Thompson and Ash, 2016). En un estudio desarrollado por Nantavisai *et al.*, se detectaron índices de sensibilidad del 97.3%, para la PCR, y del 91.9% para la inmunofluorescencia directa. Para ambas técnicas se calculó un 100% de especificidad (Nantavisai *et al.*, 2007).

Entre los fármacos más comúnmente utilizados para el tratamiento de la giardiasis en humanos, se encuentran los nitroimidazoles (metronidazol, tinidazol y ornidazol) y benzimidazoles (albendazol, mebendazol, fenbendazol) (Watkins and Eckmann, 2014). En veterinaria, una opción es el fenbendazol (50 mg/kg, una vez al día durante cinco días) o la combinación de febantel/pirantel/praziquantel a la dosis estándar, una vez al día durante tres días. El metronidazol (25 mg/kg, dos veces al día durante cinco días) y el tinidazol también son efectivos (Gruffydd-Jones *et al.*, 2013a).

Cryptosporidium spp. es un coccidio intestinal que también afecta a un amplio espectro de animales, incluyendo el ser humano. Su clasificación taxonómica engloba el Reino protista; Phylum Apicomplexa, Clase Conoidasida; Orden Eucoccidiorida; Familia Cryptosporidiidae; Género *Cryptosporidium* (Taylor *et al.*, 2016). Actualmente se integran 35 especies dentro del género, que han sido catalogadas de acuerdo a estudios de caracterización molecular realizados por todo el mundo (Slapeta, J., 2013). No obstante, entre estas especies existe una gran diversidad de formas o genotipos que pueden merecer o no, una entidad específica (Thompson and Ash., 2016) (Tabla 4).

La prevalencia de esta enfermedad parasitaria en seres humanos es más alta en países subdesarrollados y en áreas rurales, donde el riesgo de infección es superior debido a deficientes prácticas higiénicas y a una mayor tasa de contacto con animales salvajes y domésticos, que actúan como reservorios (Ryan *et al.*, 2014; Thompson *et al.*, 2016). A nivel mundial, la criptosporidiasis es principalmente una infección pediátrica que aparece con más frecuencia en individuos menores de 5 años (Cacciò and Chalmers, 2016; Shrivastava *et al.*, 2017), de hecho, este coccidio se ha considerado como el mayor causante de mortalidad por diarrea en niños de

12-23 meses (Chen *et al.*, 2002). La infección por *Cryptosporidium* spp. en el ámbito veterinario presenta una elevada morbilidad y baja mortalidad (Vogue and Larson, 2011). Además, se ha documentado en una gran variedad de animales, dado que es capaz de parasitar a todas las clases de vertebrados y, posiblemente, todas las especies de mamíferos (Fletcher *et al.*, 2012). Entre los animales domésticos, los que presentan mayor índice de infección son los ruminantes, concretamente el ganado bovino y ovino (Vogue and Larson, 2011). Son escasos los estudios que involucran a colectividades felinas. Kostopoulou *et al.* en Grecia; Xu *et al.* en China y Yang *et al.*, en Australia; documentaron prevalencias de 4.2%, 7.5% y 13.4%, respectivamente, en refugios de gatos (Yang *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2016; Kostopoulou *et al.*, 2017). En el mismo tipo de colectivo, Gil *et al.* encontraron un 4.6%, en el norte de España (Gil *et al.*, 2017). Datos procedentes de colonias felinas de Turquía e Irán, muestran prevalencias de infección por este coccidio de 2.1% y 18%, respectivamente, (Mirzaghavami *et al.*, 2016; Korkmaz *et al.*, 2016); y Kváč *et al.* notificaron un 7.4% de prevalencia en colonias de gatos en un estudio multicéntrico realizado en diferentes países centroeuropeos (República Checa, Polonia y Eslovaquia) (Kváč *et al.*, 2017).

De todas las especies que se integran dentro del género *Cryptosporidium*, cinco de ellas (*C. hominis* y *C. parvum* “genotipo bovino” (= *C. pestis*), *C. meleagridis*, *C. canis* y *C. felis*) son las más comúnmente implicadas en casos clínicos en seres humanos (Fayer *et al.*, 2010; Chalmers and Katzer, 2013; Ryan *et al.*, 2014; Slapeta, J., 2017), siendo *C. felis* la especie propia de los felinos (Xu *et al.*, 2016). En humanos, se considera que el riesgo de contraer la enfermedad provocada por *C. felis* es relativamente bajo (Gil *et al.*, 2017). Lucio-Forster *et al.*, publicaron un estudio donde se recogían 97 casos de infecciones provocadas por *C. felis* en humanos, documentadas en un total de 29 publicaciones entre los años 1999 y 2009, por todo el mundo (Lucio-Forster *et al.*, 2010). Los 6 casos notificados en los Estados Unidos correspondían a sujetos adultos, y positivos para el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV). En Kenia, aparecen dos casos que afectaron a individuos jóvenes. De los 15 casos documentados en Sudamérica, 12 eran personas adultas HIV positivas, mientras que los otros 3 eran jóvenes inmunocompetentes. En Europa, entre los 60 casos de los que se tiene evidencia, se encontraban 19 adultos y 1 adolescente, HIV positivos; 2 adultos afectados por otros procesos patológicos y 6 sujetos inmunocompetentes. De los 32 pacientes restantes, se desconocía la edad, así como los estatus inmunitario y clínico. Finalmente, se documentaron 14 casos en el continente asiático, que correspondían a 10 adultos HIV positivos y 4 jóvenes. Cabe observar, pues, que la mayoría de casos de criptosporidiasis en la especie humana, de los que se tiene evidencia, están asociados a inmunodeficiencias, ya sea por procesos infecciosos concomitantes o por respuesta inmune ineficaz. Asimismo, se ha descrito que los gatos también se pueden infectar otras especies de *Cryptosporidium* de importancia en salud pública, como por ejemplo *C. parvum* (Sotiriadou *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2015).

El ciclo biológico de *Cryptosporidium* spp. es directo y alterna las tres fases típicas de los coccidios: esporogonia, merogonia y gametogonia. La infección tiene lugar con la ingestión de ooquistes esporulados por un hospedador (Thompson *et al.*, 2005). Durante la fase de esporogonia, estos ooquistes de entre 4.5 y 7.9 μm , desarrollan cuatro esporozoítos en su interior. Una vez alcanzan el tracto gastrointestinal, varios factores como las fluctuaciones de pH, la concentración de dióxido de carbono, la temperatura, o la presencia de enzimas pancreáticos y sales biliares (Bouزيد *et al.*, 2013; Lendner and Dauschies, 2014), desencadenan el proceso de desenquistamiento. De esta manera los esporozoítos se liberan a la luz intestinal a través de una fisura de la pared del ooquiste y alcanzan la superficie de los enterocitos mediante movimientos de contracción-extensión y deslizamiento (Cordero del Campillo *et al.*, 1999). Por la acción de determinados componentes presentes en un orgánulo conocido como complejo apical, exclusivo de las especies del Phylum Apicomplexa, el parásito se adhiere a la banda luminal de los enterocitos y es encapsulado en el interior de una vacuola parasitófora, donde permanece protegido de las condiciones adversas del tracto intestinal, y donde obtiene nutrientes procedentes de las condiciones adversas del tracto intestinal, y donde obtiene nutrientes procedentes de la célula hospedadora (Tomley and Soldati, 2001; Chen *et al.*, 2004). En este punto, el esporozoíto sufre un cambio morfológico y se transforma en un cuerpo esférico llamado trofozoíto, que inicia la fase de merogonia. En el curso de esta fase tiene lugar la reproducción asexual por fisión múltiple, en la cual el núcleo se divide varias veces y cada fragmento adquiere una porción de citoplasma. La célula resultante se denomina meronte de tipo I, y contiene ocho merozoítos. Éstos son liberados y colonizan las células epiteliales, donde repiten el proceso dando lugar a nuevos merontes de tipo I, o a una segunda generación, los merontes de tipo II, que se diferencian de los anteriores porque contienen cuatro merozoítos (Hoepelman, A., 1996; Chalmers and Katzer, 2013). Esta segunda generación de merozoítos inicia la fase de gametogonia, en la cual se diferencian en gametos masculinos (microgametocitos) y femeninos (macrogametocitos), que se reproducirán sexualmente. El resultado de esta fertilización es un cigoto, encargado de iniciar la fase de esporogonia que, a diferencia de *Cystoisospora* spp., es endógena (Lendner and Dauschies, 2014). Posteriormente, se desarrollan dos tipos de formas de propagación: los ooquistes de pared fina y de pared gruesa. Los primeros constituyen un 20% del total producido y se caracterizan por estar rodeados de una sola unidad de membrana. Su pared, relativamente débil, se rompe pronto tras su liberación y los esporozoítos penetran en las células epiteliales adyacentes, produciéndose una autoinfección (Sinski and Behnke, 2004). El 80% restante son ooquistes de doble pared, que son expulsados al exterior a través de las heces y son los responsables de la transmisión entre hospedadores.

Clínicamente, la criptosporidiasis felina no se caracteriza por causar un cuadro clínico a nivel sistémico y, además, la invasión del parásito es mínima ya que no penetra profundamente en el

epitelio intestinal, sino que se localiza en estratos superficiales de los enterocitos (Okhuysen and Chappell, 2002). No obstante, provoca anormalidades significativas en las funciones de absorción y secreción intestinales (Bouزيد *et al.*, 2013), que pueden ser consecuencia directa de la acción del parásito sobre las células hospedadoras, o indirecta por el efecto de células inflamatorias y/o citoquinas que se acumulan en el foco infeccioso (Okhuysen and Chappell, 2002). La intensidad de los signos clínicos también puede estar determinada por la localización de la infección (Thompson *et al.*, 2005). La colonización de la porción proximal del intestino delgado se asocia frecuentemente a diarrea acuosa, mientras que la localización en íleon o intestino grueso suele causar diarrea intermitente o, incluso, puede cursar de forma asintomática (Huang and White, 2006). Generalmente, la invasión parasitaria daña y/o destruye los enterocitos (Cordero del Campillo *et al.*, 1999). La formación de la vacuola parasitófora en el borde luminal, produce atrofia parcial de las vellosidades y fusión de éstas. Como mecanismo compensatorio, el organismo intenta reemplazar el epitelio afectado mediante la hiperplasia de las criptas, sustituyendo las células lesionadas por otras nuevas cuya funcionalidad absorptiva y enzimática es menor, siendo, además, secretoras de iones (Cl⁻) (Tzipori and Ward, 2002). La combinación de estos factores conlleva a un cuadro de malabsorción, que implica una menor captación de fluidos, electrolitos y nutrientes presentes en la luz intestinal. El proceso se agrava cuando aparece un cuadro de mala digestión debido a la pérdida de enzimas digestivos asociados a membrana, fundamentalmente la lactasa (Cordero del Campillo *et al.*, 1999). Las acciones que ejerce el parásito sobre el epitelio intestinal desencadenan una respuesta inmune, en la cual se produce un infiltrado de células inflamatorias en la lámina propia, que contribuyen a la sintomatología clínica (Chen *et al.*, 2002; Leitch and He, 2011).

Del mismo modo que pasaba con *Giardia* spp., el diagnóstico laboratorial de la criptosporidiasis también es complejo. El procedimiento más ampliamente utilizado es la detección de ooquistes en las heces (Fletcher *et al.*, 2012), que se puede llevar a cabo mediante diferentes técnicas de microscopía convencional, métodos de detección antigénicos o por biología molecular (Chalmers and Katzer, 2013). La primera de ellas, se basa en técnicas de tinción, y es la que presenta índices de sensibilidad y especificidad más bajos (Thompson *et al.*, 2016). En ocasiones, es difícil discernir los ooquistes de otros componentes fecales con formas y dimensiones semejantes, como por ejemplo levaduras o algas microscópicas. Además, mediante microscopía convencional, aparece la dificultad añadida por el reducido tamaño de los ooquistes, el patrón de secreción intermitente y/o la baja tasa de eliminación que muestran los carnívoros domésticos, en comparación con otras especies (Scorza and Tangtrongsup, 2010). Es por ello que se aconseja establecer el diagnóstico a partir de otro tipo de pruebas más fiables, como la inmunofluorescencia directa (García *et al.*, 2003), que emplea anticuerpos monoclonales fluorescentes, que reconocen epítopos específicos de la pared del ooquiste de *Cryptosporidium* (Rossle and Latif, 2013). Sin embargo, son las técnicas de caracterización

molecular las que ofrecen mejor sensibilidad y especificidad (Mekaru *et al.*, 2007; Chalmers *et al.*, 2011). La PCR y sus variantes son las más utilizadas (Xiao, L., 2009) y los principales genes de elección son el que codifica para la subunidad 18S del RNA ribosomal (18S RNA), para una proteína de la pared del ooquiste (COWP) o las regiones intergénicas 1 y 2 (ITS-1 e ITS-2) (Navarro i Martínez *et al.*, 2010). Un estudio publicado por Morgan *et al.*, obtuvo valores de sensibilidad y especificidad de 83.7% y 98.9%, respectivamente, para la tinción Ziehl-Nielsen; en comparación al porcentaje de 100% obtenido para ambos parámetros, en la PCR (Morgan *et al.*, 1998).

Para el tratamiento de la criptosporidiasis en seres humanos, se han testado diferentes fármacos, pero sólo la nitazoxanida ha sido aprobada por la FDA (Food and Drug Administration) (White, C., 2004). En medicina veterinaria, no hay tratamientos registrados disponibles para la cryptosporidiasis en perros y gatos. Dado que la infección se resuelve de forma espontánea, en la mayoría de los casos, se recomienda solamente utilizar tratamientos sintomáticos (fluidoterapia y medicación espasmolítica) (Bowman and Lucio-Forster, 2010).

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

ESPECIE	HOSPEDADORES	IMPORTANCIA EN SALUD PÚBLICA
<i>C. muris</i>	Mamíferos y aves	Menor
<i>C. parvum</i>	Mamíferos	Menor
<i>C. meleagridis</i>	Mamíferos y aves	Moderada
<i>C. wrairi</i>	Mamíferos	Ninguna
<i>C. agni</i>	Mamíferos	Ninguna
<i>C. bovis</i>	Mamíferos	Ninguna
<i>C. cuniculus</i>	Mamíferos	Moderada
<i>C. felis</i>	Mamíferos	Moderada
<i>C. serpentis</i>	Reptiles y mamíferos	Ninguna
<i>C. nasoris</i>	Peces	Ninguna
<i>C. baileyi</i>	Aves	Ninguna
<i>C. varanii</i>	Reptiles	Ninguna
<i>C. cichlidis</i>	Peces	Ninguna
<i>C. reichenbachklinkei</i>	Peces	Ninguna
<i>C. galli</i>	Aves	Ninguna
<i>C. andersoni</i>	Mamíferos	Menor
<i>C. canis</i>	Mamíferos	Menor
<i>C. hominis</i>	Mamíferos	Mayor
<i>C. molnari</i>	Peces	Ninguna
<i>C. suis</i>	Mamíferos	Menor
<i>C. scopthalmi</i>	Peces	Ninguna
<i>C. pestis</i>	Mamíferos	Mayor
<i>C. fayeri</i>	Mamíferos	Menor
<i>C. ryanae</i>	Mamíferos	Ninguna
<i>C. fragile</i>	Anfibios	Ninguna
<i>C. macropodum</i>	Mamíferos	Ninguna
<i>C. ducismarci</i>	Reptiles	Ninguna
<i>C. ubiquitousum</i>	Mamíferos	Menor
<i>C. viatorum</i>	Mamíferos	Moderada
<i>C. scrofarum</i>	Mamíferos	Menor
<i>C. erinacei</i>	Mamíferos	Ninguna
<i>C. rubeyi</i>	Mamíferos	Ninguna
<i>C. avium</i>	Mamíferos	Ninguna
<i>C. proliferans</i>	Mamíferos	Ninguna
<i>C. testudinis</i>	Mamíferos	Ninguna

Tabla 4. Especies conocidas de *Cryptosporidium*, rango de hospedadores e importancia en salud pública.

Fuente: (Slapeta, J., 2017).

Como se ha mencionado anteriormente, la transmisión de *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. se produce principalmente por la vía feco-oral, mediante la ingestión de las formas de resistencia (quistes u ooquistes, respectivamente), los cuales son inmediatamente infectivos una vez se eliminan al exterior a través de las heces (Esch and Petersen., 2013; Ryan *et al.*, 2014). Ambos protozoos ejercen una acción irritativa sobre los enterocitos, lo cual provoca una lesión de los mismos y, en consecuencia, alteraciones en las funciones de absorción y secreción intestinales, que puede resultar en la aparición de diarrea (Scott *et al.*, 2000; Bouzid *et al.*, 2013). Sin embargo, no todos los animales parasitados muestran síntomas de infección. Algunos actúan como portadores asintomáticos, siendo diseminadores del patógeno sin manifestar cuadro clínico. La severidad de ambas protozoosis intestinales puede estar condicionada por diferentes factores dependientes del propio parásito y del hospedador (Ankarlev *et al.*, 2010; Esch and Petersen, 2013). Por un lado, influye el tipo de cepa o especie, por la virulencia inherente de cada una de ellas; y también la cantidad de formas de propagación ingeridas, con mayor probabilidad de desarrollo cuanto mayor sea el número (Cordero del Campillo *et al.*, 1999). Y por el otro, la edad del animal, así como su condición sanitaria o nutricional y, en consecuencia, el estado inmunitario, especialmente si se encuentra comprometido debido a procesos patológicos concomitantes o a estímulos estresantes (Roxström-Lindquist *et al.*, 2006; Shirley *et al.*, 2012). En la especie felina, generalmente, la infección por *Cryptosporidium* spp. cursa de forma asintomática, o como un proceso autolimitante en individuos inmunocompetentes. No obstante, en individuos jóvenes o inmunodeficientes, como por ejemplo aquéllos infectados por los virus de la inmunodeficiencia y/o leucemia felina, puede representar un problema grave (Chen *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2016). Algunos autores han documentado que aquellos animales que manifiestan signos clínicos, ocasionalmente presentan una infección mixta entre ambos agentes, o con otros protozoos como *Cystoisospora* spp. o *Tritrichomonas* spp. (Epe *et al.*, 2010; Slapeta, J., 2013; Pallant *et al.*, 2015; Blasco *et al.*, 2017). Las prevalencias de coinfección documentadas, oscilan del 2.9% al 83% (Vasilopoulos *et al.*, 2007; Tzannes *et al.*, 2008; Ito *et al.*, 2016). A pesar de la gran variabilidad observada, se ha sugerido que existe la posibilidad de que la presencia de un agente, puede favorecer la colonización de otras especies parasitarias (Vasilopoulos *et al.*, 2007). Estos autores propusieron este fenómeno, basándose en la infección concomitante entre *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. Se sugirió que la acción patógena del coccidio, consistente en la destrucción del epitelio de los enterocitos, entre otras, posibilitaba el contacto directo de los trofozoítos de *Giardia* spp., y facilitaba su posterior adhesión. El hecho de que *Cryptosporidium* spp. tenga tropismo intracelular, y *Giardia* spp. (Dubey *et al.*, 1993), se localice a nivel superficial, evita la competencia por los nichos intestinales, y ambos protozoos pueden ejercer su acción patógena simultáneamente.

Los helmintos que parasitan al gato doméstico se enmarcan taxonómicamente en el Reino Animalia, donde destacan los cestodos (Phylum Platyhelminthes; Clase Cestoda) y los nematodos (Phylum Nematoda) (Taylor *et al.*, 2016). Sus ciclos biológicos pueden ser monoxenos, con la ingestión de formas de resistencia como principal vía de transmisión, o heteroxenos, cuando intervienen otros animales como hospedadores intermediarios. La paratenesis también constituye una vía de propagación importante en sus ciclos biológicos, con la participación de un amplio rango de animales tales como, roedores, aves, reptiles, o artrópodos. Generalmente, la fase adulta de los helmintos que eliminan formas de transmisión parásita en heces es de localización intestinal, a excepción de algunos nematodos strongiloideos (Orden Strongilida; Superfamilia Metastrongyloidea), y triquiuroideos (Orden Enoplida; Superfamilia Trichuroidea), que parasitan el sistema respiratorio. Tanto la patogenia como los signos clínicos de estas infecciones dependen de las especies implicadas y de su localización, así como de la intensidad de infección, la duración de la misma, y el estado inmunitario del hospedador (Cordero del Campillo *et al.*, 1999). En términos generales, causan un expolio de nutrientes esenciales, acciones mecánicas derivadas de algunos hábitos histiófagos, u obstrucciones en caso de parasitaciones masivas. En la especie *Toxocara cati*, un efecto patógeno importante es consecuencia de las migraciones larvares a través de diferentes tejidos y órganos (Overgaauw and Knapen, 2013). Algunas especies de ancilostómidos causan anemias hemorrágicas debido a su actividad hematófaga (Bowmann *et al.*, 2010). La sintomatología está relacionada con la aparición de un cuadro gastrointestinal, normalmente de diarrea, vómitos o malnutrición; o de tipo respiratorio (disnea o tos), como consecuencia de la embolización de huevos, larvas y/o adultos en los capilares alveolares, y de la irritación mecánica que producen las larvas. En el caso de los cestodos, se produce una acción traumática ligada a la fijación del escólex a la mucosa intestinal, con un efecto irritativo directo sobre la misma.

El principal método diagnóstico de las helmintiasis consiste en la detección de las formas de transmisión en las heces. Los métodos de concentración basados en sedimentación o flotación, son las técnicas habituales, y permiten la identificación de huevos y/o larvas a nivel de familia o género. Para concretar la especie, son necesarias técnicas de biología molecular como la PCR. En cuanto al tratamiento, existen muchas opciones terapéuticas que poseen un espectro de acción contra un amplio rango de helmintos.

De acuerdo con Petney *et al.*, el sistema inmunitario es un factor relevante en la prevalencia de infecciones concurrentes (Petney *et al.*, 1998), de tal manera que aquellos individuos inmunocomprometidos serán más susceptibles de albergar, simultáneamente, diversas especies de parásitos. De hecho, y a pesar de que todavía se desconocen con detalle los mecanismos de interacción, se han descrito sinergismos y asociaciones antagónicas, entre diferentes especies de

parásitos (Cox, F., 2001). En algunas ocasiones, la naturaleza de estas interacciones responde a un patrón ecológico, cuando los agentes comparten el mismo nicho y compiten por recursos como el espacio o los nutrientes; mientras que, en otras, se basan en su capacidad para estimular la actividad inmunitaria (Supali *et al.*, 2010; Thompson and Smith, 2011). Un ejemplo de asociación sinérgica, entre diferentes helmintos intestinales, se ha documentado en ratones infectados por el nematodo tricostrongílido, *Heligmosomoides polygyrus*. La supervivencia de este parásito se basa en su capacidad de secretar factores inmunomoduladores, que interfieren en la regulación de la respuesta inflamatoria mediada por linfocitos T y citoquinas (Behnke *et al.*, 2001). Particularmente, la infección por *H. polygyrus*, perjudica la respuesta de la línea celular mastocítica. Como cabría esperar, la actividad inmune contra otras especies de nematodos intestinales, que depende principalmente de la función mastocítica, se encuentra mermada en infecciones por este tricostrongílido, permitiendo a las especies heterólogas prolongar su supervivencia. Por ejemplo, los estadios adultos de *Trichinella spiralis*, que normalmente sobreviven 2-3 semanas en el intestino de ratones, persisten por más de 6 semanas, cuando *H. polygyrus* también está presente.

Por otro lado, un ejemplo de antagonismo fue demostrado en coinfecciones por el nematodo tricuroideo, *T. spiralis*, y el protozoo flagelado *Giardia muris*. Roberts-Thomson *et al.*, diseñaron un estudio experimental en ratones, que incluía dos ensayos en los cuales se inoculaban quistes de *G. muris*, 7 días antes y 7 días después, de la infección experimental por larvas de *T. spiralis*. Adicionalmente, efectuaron un tercer ensayo, donde inocularon quistes de *G. muris*, 10 semanas después de la infección experimental de *T. spiralis*. Los investigadores observaron que, en los dos primeros ensayos, se producía una reducción significativa del número de trofozoítos intestinales, así como del número de quistes fecales, de *G. muris*, coincidiendo con la fase intestinal del nematodo, en la cual estos tricuroideos permanecen en fase adulta (Roberts-Thomson *et al.*, 1976). Este efecto, sin embargo, no se detectó en el tercer ensayo, cuando los quistes fueron administrados tras la resolución de la fase intestinal de la triquinosis. Estos autores sugirieron que los cambios producidos en el ecosistema intestinal, como consecuencia de la acción de los nematodos adultos, resultaban en una inhibición de la proliferación del protozoo. Así, este antagonismo no sólo se debía a la competición por los nutrientes esenciales, sino que, también, a la secreción de compuestos tóxicos, y/o a cambios en la morfología de los enterocitos, que contribuían a crear un ambiente hostil para el protozoo (Roberts-Thomson *et al.*, 1976).

Uno de los factores que recientemente se ha considerado como influyente en la patogenia de estas infecciones, es la microbiota intestinal (Tysnes *et al.*, 2014). Además de intervenir en el proceso de digestión, metabolizando algunos sustratos complejos y aportando nutrientes esenciales, los microorganismos comensales del tracto digestivo de los mamíferos forman una

línea de defensa frente a patógenos intestinales (Sekirov *et al.*, 2010; Halliez and Buret, 2013). Así, alteraciones en la flora intestinal provocadas por factores estresantes, nutricionales, coinfecciones o tratamientos farmacológicos (Tysnes *et al.*, 2014), pueden favorecer el contacto directo de los agentes parasitarios con las células intestinales y, por lo tanto, incrementar su acción patógena. A pesar de que el rol de la microbiota sigue siendo objeto de debate entre la comunidad científica, su estrecha relación con la respuesta inmune le confiere una importancia capital en la integridad de la mucosa intestinal y, en consecuencia, del huésped. Tal vez, una de las funciones más importantes es su papel inmunomodulador, pues promueven la maduración de células inmunes y el curso normal de la actividad inmune (O'Hara and Shanahan, 2006; Chow *et al.*, 2010). Parece ser que, tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa, precisan de la mediación de la microbiota para su desarrollo completo (Clemente *et al.*, 2012). Estudios realizados con ratones axénicos, han documentado que en estos animales disminuye la secreción de inmunoglobulina A intestinal, aparecen defectos en el desarrollo del tejido linfoide intestinal, y se observan placas de Peyer y linfonodos mesentéricos, en menor cantidad y anormalmente pequeños (Round and Mazmanian, 2009). Adicionalmente, la microbiota ha demostrado tener un impacto en la diferenciación de algunas poblaciones de linfocitos T (Clemente *et al.*, 2012).

Por otro lado, también se han notificado los efectos de las infecciones parasitarias sobre la flora intestinal de algunos mamíferos (Cantacessi *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2014; Reynolds *et al.*, 2014; Duarte *et al.*, 2016; Vlčková *et al.*, 2018). En el ser humano, por ejemplo, Lee *et al.*, llevaron a cabo un estudio comparativo en un total de 51 voluntarios, entre los que se incluían 36 individuos infectados por helmintos (*Trichuris* spp., *Ascaris* spp. y/o ancilostómidos) y 15 negativos a tales infecciones. Los resultados obtenidos mostraron una mayor cantidad y diversidad bacteriana, en los sujetos positivos a estas helmintiasis, y concluyeron que la colonización por estos nematodos se asocia a un incremento en la abundancia y variedad de especies de la microbiota intestinal (Lee *et al.*, 2014).

Estos hallazgos no coincidían con los documentados por Cantacessi *et al.*, quienes no encontraron diferencias significativas entre la cantidad y composición de la microbiota intestinal, en una serie de sujetos, antes y después de ser infectados experimentalmente con el ancilostómido *Necator americanus*. Los autores, no obstante, sugieren que el tamaño muestral era insuficiente, y que la carga parasitaria (20 larvas via percutánea, por individuo) no era apropiada para provocar un cambio significativo en la población bacteriana (Cantacessi *et al.*, 2014).

En modelos animales, un estudio que comparaba la microbiota de gatos positivos y negativos, a la infección por *Toxocara cati*, reveló un incremento en el número de bacterias, así como una mayor diversidad de géneros y especies, en aquellos individuos positivos (Duarte *et al.*, 2016). Entre los organismos comensales detectados, los clasificados dentro del filo Firmicutes (como,

por ejemplo, *Lactobacillus* spp.), resultaron ser los predominantes. De acuerdo con los investigadores, los lactobacilos son especialmente conocidos por sus propiedades probióticas. Curiosamente, otro estudio también notificó una mayor abundancia de este género de bacterias, en el duodeno de ratones C57BL/6, tras la infección por el helminto *Heligmosomoides polygyrus*; mientras que el resultado contrario se observó en ratones BALB/c infectados, cuya cepa es conocida por ser relativamente resistente a la infección por *H. polygyrus* (Reynolds *et al.*, 2014).

Por otra parte, Vlčková *et al.*, en un estudio reciente llevado a cabo en gorilas, no documentaron una relación positiva entre el recuento bacteriano y la infección por helmintos. Sin embargo, sí asociaron la presencia del protozoo intestinal *Entamoeba* spp. con cambios cuantitativos y cualitativos en la población comensal (Vlčková *et al.*, 2018).

Este aspecto, parece ser especialmente trascendente en la giardiasis, donde algunos autores sugieren que no se trata de un patógeno primario, sino que su virulencia está asociada a la interacción de la microbiota y el sistema inmunitario. Cuando los trofozoítos alcanzan la luz intestinal, establecen interacciones, tanto positivas como negativas, con la población bacteriana residente. Aunque este aspecto todavía se desconoce profundamente (Bartelt and Sartor, 2015), se han documentado evidencias de que tal interacción podría contribuir en variaciones en la patogenia y el cuadro clínico, asociados a la giardiasis (Singer and Nash, 2000). De acuerdo con Barash *et al.*, este protozoo es capaz de alterar la microbiota, provocando cambios cualitativos y cuantitativos en su composición, cambios en su funcionamiento o actividades metabólicas, o bien, cambios en su distribución (Barash *et al.*, 2017). Estas alteraciones en la microbiota, independientemente del mecanismo, podrían explicar por qué individuos con infección asintomática pasan a desarrollar un cuadro clínico, tras estar expuestos a los estímulos estresantes que se pueden presentar, por ejemplo, en un colectivo animal (Möstl *et al.*, 2013; Tysnes *et al.*, 2014).

Tal y como se ha comentado anteriormente, las medidas terapéuticas para combatir *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp., deben incluir un tratamiento médico administrado conjuntamente con un tratamiento ambiental (Pesavento and Murphy, 2014). En el caso de *Giardia* spp., se han evidenciado fallos en las terapias farmacológicas y, a menudo, hay que recurrir a la combinación de principios activos en sustitución a la monoterapia (Tangtrongsup and Scorza, 2010). En los últimos años, se ha propuesto como medida de terapéutica la administración de probióticos. Goyal *et al.*, concluyeron en un estudio que la administración oral de lactobacilos anterior, o simultáneamente, a la inoculación de trofozoítos de *Giardia* spp. en ratones, reducía tanto la severidad como la duración del cuadro clínico (Goyal *et al.*, 2013). Estos autores sugirieron que podía ser debido a un incremento de los niveles de antioxidantes y,

paralelamente, a una disminución de la concentración de compuestos oxidantes, en el intestino delgado.

Shukla *et al.*, dividieron una población de ratones experimentalmente infectados por *Giardia* spp. en varios grupos y se les aplicó diferentes terapias a cada uno: albendazol, tinidazol, metronidazol, nitrazoxanida, y albendazol en combinación con probióticos (*Lactobacillus casei*). Al final del estudio, se comprobó que los animales tratados con albendazol, mostraban una mayor reducción del número de quistes excretados, así como una menor cantidad de trofozoítos intestinales; en comparación a los otros compuestos farmacológicos. La coadministración de probióticos y albendazol, todavía mostró mejores resultados, ya que los efectos terapéuticos se detectaban una semana antes que en el tratamiento con albendazol (Shukla *et al.*, 2013). De acuerdo con los autores, el mecanismo de acción del fármaco, en combinación con el probiótico, inhibía la multiplicación del parásito, así como su adhesión al epitelio.

Humen *et al.*, observaron que la administración de *Lactobacillus johnsonii*, diluidos en el agua de jerbos infectados por *Giardia* spp., disminuía significativamente la proporción de animales con trofozoítos activos en el intestino, y conducía a la resolución de la infección, a las dos semanas de tratamiento (Humen *et al.*, 2005). Los investigadores atribuyeron los resultados obtenidos, a un mayor rendimiento de la respuesta inmune celular y humoral, en el grupo tratamiento, frente al grupo control. Concretamente, se detectó un incremento de linfocitos T y B, a los 14 y 21 días post-infección, respectivamente.

Por otro lado, algunos autores sugieren aplicar el tratamiento médico sólo en aquellos casos con manifestaciones clínicas o infecciones potencialmente zoonóticas (Tysnes *et al.*, 2014). Lo mismo sucede en la parasitación por *Cryptosporidium* spp. (Bouزيد *et al.*, 2013), donde el tratamiento tiene como prioridad controlar la sintomatología clínica (Scorza and Tangtrongsup, 2010). Así, se plantea un dilema clínico en el momento de establecer un tratamiento médico, especialmente ante a la ausencia de síntomas, pero con el eventual riesgo zoonótico. Además, puesto que la duración del efecto terapéutico de muchos protocolos antiparasitarios puede ser demasiado corto para prevenir la reinfección, en un ambiente contaminado (Geurden *et al.*, 2006), es necesario establecer medidas higiénicas y de desinfección adecuadas (Pesavento and Murphy, 2014; Addie *et al.*, 2015) para inactivar aquellos quistes u ooquistes potencialmente infectivos que permanecen en el ambiente.

La respuesta inmunitaria juega un papel crucial en la patogenia de estas parasitosis, al igual que en cualquier proceso infecto-contagioso, de tal manera que aquellos individuos inmunocompetentes presentan menor susceptibilidad ante estas infecciones y, en caso de contraerlas, cuentan con menor probabilidad de manifestar sintomatología clínica (Möstl *et al.*, 2013). Para un óptimo rendimiento del sistema inmune, y, en general, un buen estado de salud,

es necesario que los animales confinados estén alojados garantizando un cierto nivel de bienestar. El concepto de bienestar animal incluye tres elementos: el correcto funcionamiento del organismo (lo que entre otras cosas supone que los animales estén sanos y bien alimentados), el estado emocional del animal (incluyendo la ausencia de emociones negativas tales como el dolor y el miedo crónico) y la posibilidad de expresar las conductas normales propias de la especie (Fraser *et al.*, 1997). La actividad inmunitaria requiere de un consumo energético muy elevado, para la producción de células y otros componentes (Nicholson, L., 2016). Es por ello que un aporte nutricional apropiado, es esencial para asegurar su integridad. En el caso de los gatos, algunos procesos víricos como la leucemia felina o la panleucopenia felina, cursan con una inmunosupresión severa, lo que expone a los animales a la infección por toda clase de agentes infecto-contagiosos (Möstl *et al.*, 2013). Así, es importante monitorizar aquellos individuos afectados, para asegurar su bienestar, y protegerlos, en la medida de lo posible, de los patógenos ambientales. Finalmente, es conveniente proporcionar un alojamiento libre de estresores crónicos, que fomente los lazos afectivos entre conespecíficos, y que facilite la expresión de comportamientos e instintos naturales, tales como escalar, excavar, rascar, etc. (Staley *et al.*, 2008).

El interés social sobre el bienestar animal ha cobrado protagonismo en diferentes campos de la investigación durante las últimas décadas (Schatz and Palme, 2001). Por ejemplo, se valora en animales salvajes para estudiar las condiciones ambientales y las consecuencias de la actividad humana sobre los ecosistemas (Tempel and Gutiérrez, 2003). En animales en cautividad, se aplica para evaluar el manejo en referencia al espacio, la disponibilidad de alimento o las interacciones sociales (Wielebnowski *et al.*, 2002; Fuller *et al.*, 2017). Y finalmente, en especies domésticas se utiliza para valorar las condiciones de confinamiento (Accorsi *et al.*, 2008) o la respuesta al transporte, y su posterior efecto sobre la calidad de la carne (Möstl *et al.*, 2002). Una de las herramientas más utilizadas para analizar el bienestar animal es la respuesta de estrés (Millspaugh and Washburn, 2004; Stewart *et al.*, 2005) Fraser *et al.*, definieron el concepto de estrés como un estado que aparece cuando un animal es forzado a realizar ajustes anormales o extremos a nivel fisiológico o de comportamiento, con el fin de lidiar con estímulos adversos de su entorno o manejo (Fraser *et al.*, 1975). El sistema nervioso central y otros componentes periféricos son los encargados de regular esta respuesta endocrina (Charmandari *et al.*, 2005; Romero and Butler, 2007; Le Moal, M., 2007), que tiene lugar en dos fases. La primera de ellas, comúnmente conocida como la respuesta de “Lucha o Huída” (“Fight or Flight”), se da inmediatamente después de la aparición del estímulo estresante (Manteuffel, G. 2002) y termina con la secreción inminente de catecolaminas (adrenalina y noradrenalina). Mientras que, la segunda, está mediada por el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA) y, aunque también se desencadena en el momento de detectar el estímulo estresante, sus efectos finales, que consisten

en la secreción de glucocorticoides (cortisol y corticosterona), no son visibles hasta 3-5 minutos después (Sapolsky *et al.*, 2000; Sheriff *et al.*, 2011). La respuesta de estrés no es inherentemente perjudicial para los animales, pero hay que tener en cuenta la intensidad y el tiempo de exposición (Palme, R., 2012). Una respuesta leve o de corta duración sólo precisa de recursos biológicos de reserva, que pueden ser repuestos rápida y fácilmente. Sin embargo, la liberación crónica de estas hormonas puede tener consecuencias nocivas sobre el bienestar animal, el desarrollo y la función reproductora (Keay *et al.*, 2006; Bardi *et al.*, 2003). Asimismo, los glucocorticoides (GC) son depresores de las respuestas inmunes celular y humoral ya que producen una atrofia significativa de todo el tejido linfoide del organismo, lo que a su vez hace disminuir la producción tanto de células T como de anticuerpos; además de inhibir la secreción de citoquinas producidas por macrófagos y otras células inmunitarias (Pineda and Dooley, 2003).

Debido a sus características de metabolización y eliminación, los GC (o sus metabolitos) pueden ser cuantificados en diferentes matrices biológicas: pelo, plumas, saliva, plasma, orina, heces, etc. Dichas muestras son obtenidas mediante técnicas que requieren diferente grado de invasión, y registran la actividad del eje HPA en distintos intervalos de tiempo (Sheriff *et al.*, 2011; Stevenson *et al.*, 2017).

- Sangre (plasma o suero):

La sangre ha sido la sustancia de elección para analizar los niveles de GC en muchas especies de vertebrados. Con estas muestras se obtiene información del estado del organismo en un momento puntual. Este estado es una suma de tres componentes: ciclos endógenos (ritmos estacionales y circadianos); experiencias previas recientes (factores estresantes agudos como la exposición a un ataque o fenómenos meteorológicos); y experiencias a largo plazo (factores estresantes crónicos como los inducidos por conoespecíficos, nutrición o la presencia de depredadores).

A diferencia de otras matrices, con el plasma se cuantifica la cantidad total de GC, es decir, la fracción libre y la que circula unida a proteínas plasmáticas. De acuerdo con Rosner, es esta primera la que determina cuánto cortisol y corticosterona es capaz de atravesar los capilares y alcanzar los tejidos diana (Rosner, W., 1990).

La obtención de muestra sanguínea es un procedimiento muy invasivo y estresante, por lo que desencadena la liberación de GC. Este aumento puntual aparece tan sólo en 3 minutos desde la exposición al factor estresante (Romero and Reed, 2005), de tal manera que puede llevar a una interpretación errónea de los resultados (Keay *et al.*, 2006). Sin embargo, con este tipo de

muestras se obtiene la hormona inalterada, tal y como se sintetiza en la corteza adrenal y, además, simultáneamente permite la recopilación de datos referentes a otros parámetros sanguíneos, como índices de glucosa o ácidos grasos, hematocrito, perfiles inmunológicos, entre otros, que aportan información útil sobre el estado del animal (Sheriff *et al.*, 2011).

- Saliva:

Los niveles de GC en saliva se han utilizado como alternativa al análisis sanguíneo (Pearson, *et al.*, 2008). Se trata de un método menos invasivo que refleja el 10%-60% de GC libres en plasma, en función de la especie (Wood, P., 2009).

La obtención de la muestra puede resultar una tarea complicada puesto que los principales métodos consisten en la extracción directa en cavidad bucal o la masticación de material absorbente. Aunque el primero es inductor de estrés porque precisa de la manipulación del animal, en este caso no supone un inconveniente ya que el aumento de la concentración de GC en saliva es detectable 20-30 minutos después de la aparición del factor estresante (Sheriff *et al.*, 2011). Contrariamente, la segunda opción no es invasiva, pero resulta difícil de aplicar en condiciones de campo y conviene asegurarse de que la muestra es depositada individualmente. Cabe destacar que se trata de un tipo de muestra que permite una extracción seriada en cortos periodos de tiempo y que se puede conservar a temperatura ambiente durante días, puesto que los GC en saliva se mantienen relativamente estables (Lutz *et al.*, 2000).

- Heces y orina:

La monitorización de la actividad adrenal a partir de la cuantificación de metabolitos de GC en excretas (heces y orina) ha cobrado protagonismo debido a su bajo grado de invasión (Palme, R., 2005). En este tipo de muestras, la cantidad de hormona obtenida corresponde a la concentración plasmática en un período de tiempo anterior: 6-24h en heces, dependiendo de la especie (Hulsman *et al.*, 2011; Sheriff *et al.*, 2011), u horas antes en orina (Zeugswetter *et al.*, 2013; Galeandro *et al.*, 2014). Los GC plasmáticos son conjugados en el hígado y secretados vía renal e intestinal. Mientras que el total de GC presentes en heces se encuentra metabolizado, en orina puede aparecer una pequeña cantidad inalterada (Bahr *et al.*, 2000; Touma and Palme., 2005; Palme *et al.*, 2013). Para la elección de uno u otro tipo de muestra, hay que tener en

cuenta la especie animal objeto de estudio. En mamíferos, la proporción y estructura de los metabolitos de GC secretados en orina y heces difiere entre especies, e incluso entre sexos (Touma *et al.*, 2003; Palme *et al.*, 2005). Concretamente, en los felinos el análisis de orina no es una opción viable ya que los esteroides se secretan casi exclusivamente vía fecal (Schatz and Palme, 2001; Brown, J.L., 2006) y, además, ocasionalmente eliminan orina por “spraying”, limitando la viabilidad de este procedimiento (Graham and Brown, 1996). En el caso de aves y reptiles, debido a que ambas excretas se expulsan conjuntamente a través de la cloaca, la proporción de metabolitos de GC de cada muestra suele ser desconocida (Klasing, K., 2005).

Un aspecto importante a tener en cuenta es que los metabolitos de glucocorticoides fecales (FGM) pueden verse afectados por diferentes factores dependientes del ambiente y de la propia muestra (Sheriff *et al.*, 2011). Washburn y Millspaugh documentaron que se producían alteraciones de las concentraciones de FGM con el incremento de la humedad (Washburn and Millspaugh, 2002). Por otra parte, Hulsman *et al.*, observaron una disminución de los niveles de FGM al analizar muestras 5-6 horas después de la defecación, y a las cuales no se les aplicó ningún tratamiento de preservación (Hulsman *et al.*, 2011). Finalmente, se ha documentado que la actividad enzimática de los microorganismos fecales es capaz de perturbar, ya sea aumentando o disminuyendo, los niveles de metabolitos hormonales (Touma and Palme, 2005; Palme, R., 2005; Khan *et al.*, 2002). Por lo tanto, es recomendable obtener muestras frescas y procesarlas lo más rápidamente posible. De no ser así, el material fecal debe ser congelado, deshidratado o conservado en azida sódica o alcohol (Khan *et al.*, 2002; Terio *et al.*, 2002; Millspaugh and Washburn, 2004; Keay *et al.*, 2006).

- Pelo y plumas:

De todas las matrices biológicas mencionadas, el pelo es la que registra mejor la exposición de un animal a GC, en relación al tiempo. Así, los niveles observados reflejan las concentraciones plasmáticas a lo largo de semanas o meses, lo cual convierte a este tipo de muestras en un medio ideal para examinar los efectos de factores estresantes crónicos (Sheriff *et al.*, 2011; Feng *et al.*, 2016). La escala de tiempo exacta dependerá de la ratio de crecimiento del pelo.

Las plumas también ofrecen esta información a largo plazo, e incluso permiten un registro todavía más concreto de la cantidad de glucocorticoides en el tiempo, gracias a su patrón de crecimiento (Bortolotti *et al.*, 2009).

Ambas muestras son fáciles de obtener y es posible almacenarlas a temperatura ambiente. Se pueden tomar recortando o extrayendo de raíz, aunque esta última técnica no es de elección en mamíferos ya que un estudio previo demostró que el folículo es capaz de sintetizar cortisol en respuesta a la estimulación con hormona liberadora de corticotropina (Ito *et al.*, 2005), y podría

generar resultados sesgados. Para registrar las concentraciones en un tiempo conocido, es necesario recortar el pelo o las plumas de una determinada zona, inmediatamente antes del inicio del periodo de interés, y posteriormente analizar la concentración de GC tomando las muestras que han vuelto a crecer en la misma región corporal (Paul *et al.*, 2007).

- Otras:

Existen otras matrices biológicas a partir de las cuales se puede analizar la concentración de cortisol o corticosterona. Para evaluar la respuesta de estrés en peces, algunos estudios utilizan muestras de escamas (Gesto *et al.*, 2015; Aerts *et al.*, 2015) o incluso de agua, ya que el cortisol es expulsado a través de las branquias (Félix *et al.*, 2013).

En hembras de mamíferos, también es posible registrar los niveles de GC en la leche. Las muestras pueden ser obtenidas por eyeción manual o estimulando la secreción mediante inyecciones de oxitocina (McDonald and Fuller, 2005; Walker *et al.*, 2008).

Una técnica empleada para monitorizar la actividad del eje adrenocorticotropo durante el periodo de puesta en aves, es calcular la concentración de GC en huevos (Love *et al.*, 2008)

Y, finalmente, en reptiles también se ha utilizado la piel para cuantificar los niveles de corticosterona (Berkvens *et al.*, 2013).

Los métodos para la detección de GC más utilizados a día de hoy son los inmunoensayos (Möstl *et al.*, 2005), especialmente aquellos que emplean marcadores enzimáticos (EIA o ELISA); o isótopos radioactivos (radioinmunoensayos (RIA)). Ambos se caracterizan por presentar altos índices de sensibilidad y especificidad. Sin embargo, los RIA cuentan con una serie de inconvenientes relacionados con el uso de material radioactivo: riesgo para el personal investigador, problemas con los desechos radioactivos, requerimiento de infraestructura especializada y equipamiento costoso (Skrzipczyk and Verdier, 2013). Los inmunoensayos con marcadores enzimáticos, en cambio, no suponen un riesgo importante para la salud y no requieren de material ni procedimientos muy sofisticados, por lo que se pueden llevar a cabo sin necesidad de personal altamente cualificado ni a costes económicos tan elevados (Lequin, R., 2005).

Por lo tanto, la cuantificación de los GC (o sus metabolitos) en muestras animales mediante inmunoensayos, puede ser utilizado como indicador fisiológico de la actividad adrenal y de la respuesta de estrés, de tipo crónico (Brown, J.L., 2006; Gow *et al.*, 2010). Cabe destacar, no obstante, que, para una interpretación fiable de los resultados, cualquier método aplicado para medir niveles hormonales debe ser sometido a un sistema de validación, de tal manera que las limitaciones de la técnica puedan ser definidas (Buchanan and Goldsmith, 2004). Ello requiere, por un lado, que la validación tenga lugar para cada especie y matriz biológica y, por el otro, la determinación de la eficiencia de extracción para la hormona diana, en la especie y sustrato de interés (Möstl *et al.*, 2005; Sheriff *et al.*, 2011). De acuerdo con Buchanan y Goldsmith, este hecho es particularmente importante cuando se trabaja con material fecal, dado que en este sustrato biológico las diferentes sustancias presentes se someten a procesos de degradación, lo cual propicia la formación de compuestos que pueden originar reacciones cruzadas, uniéndose inespecíficamente a los anticuerpos (Buchanan and Goldsmith, 2004). Khan *et al.*, demostraron este suceso en un estudio donde aparentemente se detectó que los niveles de GC fecales se duplicaban en muestras analizadas 90 días posteriores a su recogida, en comparación con la concentración observada en heces frescas (Khan *et al.*, 2002).

Estos métodos de validación pueden ser de tres tipos: fisiológicos, biológicos o bioquímicos (Touma and Palme, 2005). Mientras que los dos primeros normalmente requieren de la manipulación de los animales, los métodos de evaluación bioquímicos se basan en el análisis laboratorial de una serie de parámetros (sensibilidad, especificidad, precisión, exactitud, paralelismo y linealidad), con el fin de verificar que la técnica de cuantificación detecta de manera fehaciente los analitos diana, y no otras sustancias (Hernández-Jáuregui *et al.*, 2005; Berkvens *et al.*, 2013).

Un aspecto importante a tener en cuenta es que los niveles basales de estas hormonas no se mantienen constantes, sino que están sujetos a variaciones en respuesta a diversos factores biológicos, ambientales, o sociales. Como consecuencia, estas diferencias en las concentraciones sanguíneas también afectan a las concentraciones en otras matrices biológicas (Touma and Palme, 2005).

Cortisol y corticosterona son secretados en diferente proporción dependiendo de la especie animal. En muchos primates, carnívoros y ungulados, el GC predominante es el cortisol; mientras que, en roedores, lagomorfos, aves y reptiles, es la corticosterona (Touma and Palme, 2005). La ratio aproximada de cortisol:corticosterona en algunos mamíferos es: perros, 2:1 - 5:1; humanos y gatos, 5:1 - 10:1, ratas y conejos 0.05:1 (Pineda and Dooley, 2003).

Ciertas especies animales muestran diferentes concentraciones de FGM, en función del sexo (Keay *et al.*, 2006). Algunos estudios documentan mayores concentraciones en hembras,

(Touma *et al.*, 2004) como ocurre en perros y gatos domésticos (Schatz and Palme, 2001); mientras que otros describen niveles superiores en machos (Cavigelli *et al.*, 2005). No obstante, también se han documentado casos en los cuales no se han encontrado diferencias entre los niveles de FGM en relación al sexo (Sands and Creel, 2004).

En cuanto a la integridad del aparato reproductor, se ha observado disparidad en los resultados de diferentes estudios. Seale *et al.*, documentaron que los niveles sanguíneos de corticosterona en ratas de laboratorio, eran significativamente superiores en machos castrados que en machos enteros; pero se observó el efecto contrario en el caso de las hembras (Seale *et al.*, 2004). En dos estudios que implicaban hembras de gato doméstico se concluyó, en uno de ellos, que los niveles de cortisol en pelo eran significativamente superiores en hembras ovariectomizadas que en hembras intactas (Finkler and Tekler., 2010); y en el otro, no se encontraron diferencias estadísticas en la cortisolemia de ambos tipos de hembras (Chatdarong *et al.*, 2006).

Estas variaciones interindividuales también pueden ser debidas a la edad. Laudenslager *et al.* observaron que los niveles de cortisol en pelo de primates no humanos disminuían con la edad (Laudenslager *et al.*, 2012).

En muchos animales vertebrados se han documentado oscilaciones de las concentraciones plasmáticas de GC en intervalos regulares cada 24 horas (Millspaugh and Washburn, 2004; Dumbell *et al.*, 2016). Generalmente, los picos de secreción hormonal se dan justo antes del inicio de la fase activa, es decir, al final del periodo oscuro en primates y otros animales diurnos; y hacia el final del periodo lumínico en animales nocturnos, como muchas especies de roedores y los gatos (Touma and Palme; 2005; Aurich *et al.*, 2015).

Numerosos estudios indican que los niveles basales de GC en aves, mamíferos, reptiles y anfibios, se modulan estacionalmente. (Huber *et al.*, 2003; Barja *et al.*, 2011; Sheriff *et al.*, 2011). Aunque el significado biológico, así como los mecanismos implicados en este patrón todavía se desconocen, en el ciclo anual de producción de GC tiende a aparecer un pico de secreción durante el período de cría (Romero, L., 2002). En cambio, otras especies animales muestran niveles de secreción más elevados durante las estaciones frías, lo cual podría explicarse como una respuesta adaptativa frente a condiciones ambientales adversas (Huber *et al.*, 2003).

También se han documentado oscilaciones en la eliminación de estas hormonas frente a precipitaciones, nieve y otros fenómenos meteorológicos (Washburn and Millspaugh, 2002; Huber *et al.*, 2003).

Otro factor que puede alterar los niveles basales de GC es el patrón de alimentación y el tipo de dieta (Millspaugh and Washburn, 2004). Schibler *et al.* describen un pico de secreción de

cortisol en el momento de la ingestión (Schibler *et al.*, 2003). Algunos estudios en mamíferos salvajes también documentan una activación del eje corticotropo cuando se produce una restricción de la alimentación, coincidiendo con épocas de escasez de alimento Huber *et al.*, 2003). No obstante, este aspecto parece no influir en animales que viven en cautividad ya que el acceso al alimento es constante (Möstl and Palme, 2002).

En cuanto a la composición de la dieta, se ha observado que un exceso de fibra puede incrementar los niveles de FGM, como resultado de un aumento del tránsito intestinal y, por tanto, una disminución de la reabsorción de GC, así como de la acción metabólica de la microbiota intestinal (Millspaugh and Washburn, 2004). En el caso de animales carnívoros, el consumo directo de GC presentes en sus presas, puede traducirse en un aumento de los niveles fecales de la hormona y/o sus metabolitos. (Keay *et al.*, 2006).

Algunos procesos fisiológicos relacionados con la reproducción o la presencia de enfermedades también pueden alterar los niveles de GC (Barja *et al.*, 2011; Sheriff *et al.*, 2011). Lynch y Bardi documentaron que se producían picos de secreción de estas hormonas en hembras de primates coincidiendo con el celo (Lynch *et al.*, 2002) y la gestación (Bardi *et al.*, 2003). El mismo patrón se observó en hembras de otros mamíferos durante el período de lactación (Kenagy and Place, 2000).

En cuanto a los procesos patológicos, Balaji *et al.* observan un aumento prolongado del cortisol plasmático en cerdos infectados por *Salmonella thyphimurium* (Balaji *et al.*, 2000) y *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Balaji *et al.*, 2002).

Las relaciones entre conoespecíficos también pueden activar el eje adrenocorticotropo, dependiendo del tipo y frecuencia de interacción, tanto en animales gregarios como solitarios (De Vries *et al.*, 2003; Creel *et al.*, 2013).

Algunos estudios llevados a cabo en animales sociales, han demostrado que los niveles de cortisol producidos son directamente proporcionales al tamaño del grupo (Creel *et al.*, 2013; Dettmer *et al.*, 2014). Creel *et al.*, observaron este fenómeno en leones salvajes, y explican que podría ser debido a que las interacciones sociales activan el eje adrenocorticotropo (Creel *et al.*, 2013). Dettmer *et al.*, también obtuvieron resultados similares en macacos salvajes, y lo atribuyen al incremento de la competición por los recursos, incluyendo alimento, apareamiento, refugio; o al establecimiento de jerarquías (Dettmer *et al.*, 2014).

También se ha descrito que el estatus social influye en la actividad del eje HPA (Barja *et al.*, 2008; Molnar *et al.*, 2014; Feng *et al.*, 2016). No obstante, esta asociación todavía no está clara ya que hay autores que documentan niveles elevados de GC en animales dominantes (Gesquire *et al.*, 2011) y otros en animales de rangos menores (Abbott *et al.*, 2003).

Finalmente, como consecuencia de la interacción de los animales con su entorno, se han observado fluctuaciones de los niveles hormonales en respuesta a condiciones adversas de

temperatura, humedad, ruido, tipo de suelo, disponibilidad de alimento, etc. (Carr, J., 2002; Wingfield and Kitaysky, 2002; Johnstone *et al.*, 2012)

Entre las directrices del Consejo asesor sobre enfermedades del gato (Advisory board on cat diseases (ABCD) acerca de la prevención de enfermedades infecciosas en colectivos felinos, se incluye la adopción de medidas de reducción del estrés (Möstl *et al.*, 2013), con el fin de asegurar un buen estado de salud general de los animales, así como minimizar el riesgo de reactivación y exacerbación de los procesos infecciosos. Aunque la respuesta individual a los estímulos estresantes no sólo depende del ambiente donde viven, sino también del temperamento de cada gato, se conoce que estos animales son especialmente sensibles a los efectos del estrés (ya sea social, ambiental, etc.), fundamentalmente, cuando residen en grupos (Ramos *et al.*, 2012; Möstl *et al.*, 2013). Las principales causas que provocan estrés en gatos domésticos, han sido documentadas en varios estudios (Möstl *et al.*, 2013; Amat *et al.*, 2016). Estos autores describen una serie de parámetros, tales como grado de confinamiento (número de animales por metro cuadrado), cambios ambientales (introducción de nuevos individuos en un colectivo, o cambios de rutina), falta de enriquecimiento ambiental, y conflicto entre individuos; que desafían el bienestar de estos animales. Sin embargo, no existen evidencias que relacionan el nivel de bienestar en colectivos felinos, con su eventual rol en la prevalencia de enfermedades parasitarias.

Algunos estudios evalúan el nivel de estrés a partir de pautas de comportamiento observadas, basándose en un sistema de puntuación. Smith *et al.*, se centraban en comparar el etograma de gatos alojados en el mismo tipo de jaulas, para estimar el período de adaptación a un colectivo. Estudiaron gatos alojados en grupo, y observaron que ciertas conductas relacionadas con el estrés, como vocalización o huída, disminuían rápidamente al quinto día, mientras que otros indicadores, como agresividad u ocultación, menguaban gradualmente con el tiempo (Smith *et al.*, 1990). Los autores concluyeron que el contacto social entre los animales de un grupo supone un estímulo estresante durante la primera fase de la estancia, pero ayuda a disminuir los síntomas de estrés, a lo largo de varios meses.

Kessler y Turner, utilizaron este mismo procedimiento para comparar los niveles de estrés en gatos alojados, en solitario, en parejas o en grupos, en un mismo centro durante dos semanas (Kessler and Turner, 1997), pero no encontraron diferencias significativas entre el grado de estrés en los diferentes grupos. Según la metodología descrita en este estudio, todos los gatos procedían de hogares donde vivían como mascotas y, previamente al inicio de la observación de su comportamiento, se sometieron a un periodo de adaptación. Los autores sugirieron que ninguno de los gatos alojados en parejas mostraron niveles significativos de estrés, ya que cada par de individuos estaba familiarizado entre sí, puesto que antes del estudio también residían juntos en el mismo hogar. Los animales hospedados en grupo, tampoco mostraron indicios de

estrés ya que, de acuerdo con los autores, la instalación era muy espaciosa, lo que ayudaba a compensar el estrés generado por la presencia de individuos desconocidos. Finalmente, los bajos indicios de estrés observados en los gatos aislados, se atribuyeron a la experiencia de adaptación previa dado que, durante este periodo, los gatos fueron alojados en las mismas condiciones que durante la fase de observación.

Ottawa y Hawkins, compararon el efecto del estrés en gatos alojados individualmente y en grupos. En este estudio, se notificó que aquéllos que convivían con otros conespecíficos expresaban conductas que denotaban niveles de estrés superiores (Ottaway and Hawkins., 2003). Los autores sugirieron que los individuos alojados en grupo, experimentaban más estrés debido a que tenían que lidiar con la presencia de individuos desconocidos. Sin embargo, ello no suponía una amenaza para su bienestar, dado que los niveles de estrés no eran extremos, ni tampoco prolongados.

Broadley *et al.*, idearon un experimento donde agruparon una serie de gatos, entre los cuales se encontraban individuos que previamente habían convivido con otros conespecíficos, y otros que no habían mantenido contacto con otros gatos. El objetivo era comparar los niveles de estrés, de acuerdo con un sistema de puntuación que se analizaba semanalmente, durante 2 meses. Aunque no se encontraron diferencias significativas entre los patrones de conducta de ambos grupos, al final del estudio, se observó que los individuos sin historial previo de contacto con otros conespecíficos, mostraban niveles de estrés superiores que el grupo de gatos con convivencia previa, durante la primera semana. Con este hallazgo, se concluyó que aquellos individuos que no estaban acostumbrados a la presencia de otros gatos, experimentaban más estrés durante los primeros días de alojamiento común, como respuesta de adaptación a un estímulo ambiental insólito (Broadley *et al.*, 2014).

En otras publicaciones, además de analizar la respuesta de estrés a través del etograma, se incluyeron valores de concentración de cortisol urinario. Carlstead *et al.*; cotejaron ambos parámetros en dos grupos de gatos de un refugio, a uno de los cuales se mantenía con la rutina de cuidado diario habitual, mientras que en el otro se alteraba dicha rutina con medidas como privación de alimento ocasional o cambios de jaula, entre otros (Carlstead *et al.*, 1993). Estos autores observaron que, en el segundo grupo, los niveles hormonales eran superiores y, además, mostraban patrones de comportamiento diferentes del grupo control, tales como disminución de la actividad física y exploratoria. De acuerdo con los resultados observados, se concluyó que los gatos confinados son extremadamente sensibles a la calidad del manejo por parte de los cuidadores.

Por otro lado, Rochlitz *et al.*, relacionaron las pautas de comportamiento y los niveles de cortisol urinario, en gatos recién introducidos en un colectivo, para comprobar el período de adaptación durante la cuarentena (Rochlitz *et al.*, 1995). En este caso, se observó que las

concentraciones hormonales en orina disminuían sucesivamente, coincidiendo con la manifestación de conductas no vinculadas con el estrés, hacia la quinta semana de cuarentena.

Finalmente, Uetake *et al.*; compararon los niveles de estrés que experimentaban 6 gatos, cuando eran alojados en grupo, de cuando eran separados posteriormente para ser ubicados en jaulas individuales; detectando niveles de estrés (comportamentales y fisiológicos) inferiores cuando residían en grupo (Uetake *et al.*, 2013). De acuerdo con estos autores, cuando estos gatos estaban aislados, individualmente, eran menos activos, pese a que contaban con un espacio amplio y enriquecido. Así, sugirieron que la reducción de la locomoción y el recreo, se debía a una falta de socialización con otros conespecíficos.

Entre los diferentes objetivos que se planteaban en estos tres últimos trabajos, se estableció una correlación positiva entre los indicadores de estrés fisiológico y de comportamiento. En cambio, no se detectó este patrón entre ambos parámetros, en un estudio que comparaba los niveles de estrés en gatos alojados en colectivos con diferente enriquecimiento ambiental (McCobb *et al.*, 2005). Tal y como describen McCobb *et al.*, se estudiaron grupos de gatos en 4 centros, dos de los cuales eran refugios animales con instalaciones antiguas y donde también se alojaban perros; mientras que los otros dos eran refugios de obra nueva, y cuya arquitectura estaba especialmente diseñada para reducir el estrés de los gatos, además de permanecer completamente aislados del contacto con otros animales de diferente especie. Aunque el análisis de la conducta no se ajustaba a lo observado en el análisis de los parámetros fisiológicos, se determinó que los niveles de cortisol urinario eran significativamente más bajos en los gatos residentes en los refugios más modernos y aislados de los perros, que en los antiguos donde, además, también residían perros.

A diferencia de los anteriores, otros investigadores abogan por medir la actividad adrenal mediante el análisis de muestras fecales. Los trabajos publicados, no obstante, involucran felinos domésticos que conviven estrechamente con sus propietarios. Ramos *et al.*, compararon así la respuesta de estrés en gatos que cohabitaban con otros conespecíficos frente a otros que vivían en solitario (Ramos *et al.*, 2012; Ramos *et al.*, 2013). En ambos estudios, no se encontraron relaciones estadísticamente significativas entre el alojamiento individual o colectivo, y la concentración de FGM. Los autores sugieren que la calidad del entorno (espacio utilizable, o relación con humanos), o el grado de predictibilidad ambiental, podrían ser factores más importantes para controlar el estrés en gatos en cautiverio.

Son escasas las evidencias que asocian la prevalencia de parasitosis con la actividad del eje HPA. No existen estudios realizados en el gato doméstico, en cambio, se han publicado algunos en primates salvajes, donde los diferentes autores plantean la hipótesis de que aquellos individuos que registran niveles más elevados de FGM, son más susceptibles de sufrir algún tipo de infección provocada por parásitos intestinales, dado que el estrés afecta negativamente a

la actividad inmune (Chapman *et al.*, 2006; Muehlenbein, M., 2006; Gillespie *et al.*, 2013). Muehlenbein *et al.*, confirmaron esta hipótesis cuando observaron una prevalencia de infección parasitaria significativamente más alta en un grupo de chimpancés, en los cuales se detectaron niveles superiores de GC fecales. En cambio, Gillespie *et al.*, y Chapman *et al.*, en sus estudios con gibones y colobos, respectivamente, no documentaron tal asociación. De acuerdo con estos autores, la detección de algunos parásitos varía en función de la época del año. En sus estudios, por ejemplo, detectaron menor prevalencia de infección parasitaria durante el período de lluvias, concluyendo que la prevalencia de parasitosis responde a un patrón estacional, más que a factores fisiológicos.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El presente proyecto de tesis doctoral se enmarca en el contexto de los colectivos felinos, concretamente, centros de acogida, gateras, colonias felinas, y criaderos. Por las características inherentes de cada uno de ellos, así como del estilo de vida de los gatos alojados, se esperan obtener diferentes prevalencias de parásitos que eliminan formas de transmisión, en función del colectivo. El análisis de las características ambientales y las pautas de manejo, ayudará a describir los factores de riesgo que contribuyen a la diseminación y mantenimiento de estas parasitosis, y dificultan su prevención. De esta manera, se estima que las prevalencias observadas sean más altas en aquellos colectivos donde se lleven a cabo prácticas de alojamiento, medidas higiénicas, o protocolos antiparasitarios, más deficientes.

Diferentes estudios epidemiológicos realizados en gatos de colectivos, sitúan algunos parásitos de trascendencia en salud pública, como *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., o *Toxocara* spp., entre los más prevalentes. El nematodo ascárido del gato doméstico es considerado un importante agente zoonótico, mientras que los otros dos protozoos requieren de un diagnóstico molecular que avale su potencial zoonótico, puesto que no todas las especies del género *Cryptosporidium*, ni todos los genotipos de *Giardia* spp., pueden afectar al ser humano. Así, el estudio molecular podría revelar la circulación de genotipos o especies, de relevancia para la salud humana.

A pesar de las diferentes características propias de cada colectivo, el principal objetivo de todos ellos es velar por el bienestar de los animales alojados. Una de las herramientas más utilizadas para evaluar el nivel de bienestar animal es la respuesta al estrés. Éste se puede valorar a partir de la cuantificación de GC (cortisol), o sus metabolitos, en distintas matrices biológicas. En el presente trabajo se espera obtener diferentes valores medios de concentración de cortisol fecal, para cada colectivo, que se podrán relacionar con las medidas de manejo previamente citadas, así como con otros factores documentados como causantes de estrés en gatos domésticos, y que comprometen el bienestar de estos animales. Finalmente, y como consecuencia de los efectos nocivos de los glucocorticoides sobre el sistema inmune, se puede hipotetizar que aquellos colectivos donde se observen mayores concentraciones de GC fecales, serán aquéllos con las prevalencias más altas de parasitosis intestinales, o coinfecciones.

Para confirmar o refutar estas hipótesis, se plantean los siguientes objetivos:

OBJETIVOS

1. Determinar la prevalencia de parásitos que eliminan formas de transmisión parásita en heces, en distintos colectivos felinos, y evaluar qué factores de riesgo, asociados a las instalaciones y al manejo, pueden intervenir en el mantenimiento y transmisión de éstos.
2. Identificación de genotipos de *Giardia* spp. y especies de *Cryptosporidium* spp., en muestras de heces de gatos alojados en diferentes colectivos felinos.
3. Evaluar la respuesta de estrés, mediante la cuantificación de FGM, en gatos alojados en diferentes colectivos felinos, y relacionar el factor de estrés con la prevalencia de parasitosis intestinales.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

1. COLECTIVOS FELINOS

Muestras:

El presente proyecto de tesis doctoral se llevó a cabo en gatos domésticos (*Felis silvestris catus*), alojados en diferentes colectivos de Cataluña: centros de acogida, gateras, colonias felinas y criaderos.

Los criterios de selección se basaron en animales adultos (>1 año de edad) y que no hubieran recibido ningún tratamiento antiparasitario interno en los tres meses precedentes al estudio.

De cada una de las poblaciones muestreadas, se recogieron muestras de heces frescas presentes en el suelo o en la bandeja de deposición, y se procesaron mediante técnicas de diagnóstico parasitológico, y de cuantificación de FGM.

2. CUESTIONARIO

Con el objetivo de identificar los factores de riesgo relacionados con el ambiente y el manejo, implicados en la transmisión y mantenimiento de parasitosis que eliminan formas de transmisión en heces, se elaboró un cuestionario para recopilar información acerca del tipo de colectivo, los animales alojados, las instalaciones y el manejo.

El cuestionario se realizó en el momento del muestreo y fue contestado por el veterinario del centro, en centros de acogida y gateras, mientras que, en colonias felinas y criaderos, lo hizo el director o el encargado del colectivo.

- Colectivo: se incluyeron datos sobre el tipo de colectivo (centro de acogida, gatera, colonia felina o criadero) y, en el caso de los centros de acogida, las especies alojadas
- Animales: se registró el número de individuos alojados, la edad, la raza, y el estatus de infección para el virus de la inmunodeficiencia felina (FIV) y el virus de la leucemia felina (FeLV)
- Instalaciones: se anotó información acerca de las dimensiones de los boxes o jaulas, el tamaño del grupo, el tipo de suelo (cemento, madera, tierra), y el material de la bandeja de deposiciones (serrín, papel de periódico o sepiolita)
- Manejo: se preguntó acerca de la cuarentena (si se aplicaba o no y, en caso afirmativo, su duración), el protocolo antiparasitario (fecha de la última desparasitación, control coprológico pre- y post-tratamiento, tipo de tratamiento (frecuencia y productos utilizados) y forma de

aplicación (comprimido oral, pasta oral, spot-on), y los protocolos de limpieza y desinfección (frecuencia de retirada de las deposiciones y del cambio de material de la bandeja, método de retirada de la materia orgánica del suelo (con manguera o escoba); las medidas de desinfección (frecuencia y productos utilizados (uniprodueto, combinación o alternancia de productos), método de aplicación (simultáneo a la limpieza o no, y tiempo de actuación del desinfectante).

Estudio coprológico

Para la detección de parásitos que eliminan formas de transmisión a través de las heces, se seleccionaron las muestras de heces más frescas que se transportaron al laboratorio de la Unidad de Parasitología de la Facultad de Veterinaria, de la Universidad Autónoma de Barcelona, en neveras portátiles y se mantuvieron a 4°C hasta su posterior procesamiento que, en ningún caso, fue superior a 48h, desde el momento de la recogida.

Antes de procesarlas, se evaluó la consistencia de la muestra a partir de un sistema de puntuación (Nestlé Puina Fecal Scoring System), en el cual se establece una gradación del 1 al 7, donde el valor más bajo se corresponde con una muestra de consistencia sólida y que no deja residuo al ser recogida, mientras que el más alto es una muestra completamente líquida, sin forma ni textura. (Anexo I).

Seguidamente, se realizó un examen macroscópico para detectar la presencia de posibles estadios parasitarios adultos, fragmentos de parásitos o proglótides de cestodos.

Las muestras se procesaron mediante diferentes análisis coprológicos. En primer lugar, se aplicó la técnica de concentración por flotación en sulfato de zinc (ZnSO_4) 33% ($\delta = 1.18$), con centrifugación (Anexo II), de acuerdo con el protocolo empleado en el estudio de Zajac *et al.* (Zajac *et al.*, 2002). Las preparaciones se examinaron a 100X y 400X aumentos, utilizando un microscopio óptico. Las formas de transmisión parásitas detectadas fueron identificadas mediante claves taxonómicas en base al análisis morfométrico (Zajac and Conboy, 2012).

Aquellas muestras donde fueron detectados quistes de *Giardia* spp., mediante la técnica de concentración por flotación y centrifugación, se clasificaron en función de la intensidad de infección, en base al número de quistes presentes en cada campo de observación, tal y como se describe en el trabajo de Strand *et al.* (Strand *et al.*, 2008): (+), <10 quistes por campo de observación; (++) , >10 a <50 quistes por campo de observación; y (+++) , >50 quistes por campo de observación.

Un porcentaje de muestras que fueron puntuadas con un grado de consistencia entre 5 y 7 (58/218), se analizaron mediante un test de inmunofluorescencia directa (Kit MeriFluor[®] Cryptosporidium/Giardia, Meridian Bioscience, Inc., Cincinnati, USA), a partir de un protocolo estandarizado por Geurden *et al.*, (Geurden *et al.*, 2008). Tras homogenizar 1g de muestra en 10 mL agua, se realizaron tres lavados con centrifugación, y el sedimento resultante se homogenizó en 3 mL de agua. Después se resuspendieron 250 μ L de la mezcla en 1.5 mL de agua, y se aplicaron otros tres lavados con centrifugación. Posteriormente, se depositaron 45 μ L de la muestra problema en el portaobjetos, y se dejó secar a temperatura ambiente para favorecer la formación de la capa de antigenado. Finalmente, la muestra antigenada se incubó junto con el anticuerpo monoclonal unido a isotiocianato de fluoresceína (FITC), y se realizó la lectura con un microscopio de fluorescencia (Anexo III). Este método permite la detección de antígenos específicos de la pared celular de los quistes de *Giardia* spp. y los ooquistes de *Cryptosporidium* spp., gracias a la presencia de anticuerpos monoclonales unidos a FITC. Las preparaciones se examinaron a través del microscopio de fluorescencia (Olympus[®] modelo BHT, MicroPlanet, Sant Cugat, España) a 400X y 1000X aumentos.

Finalmente, se seleccionaron un conjunto de muestras frescas y con un grado de consistencia entre 5 y 7, para realizar un cultivo selectivo (InPouch[™] TF-Feline[®], BioMed Diagnostics, White City, USA) (Anexo IV) con el fin de diagnosticar *Tritrichomonas* spp., Una vez recogida la muestra, se retiraron las capas más superficiales, para exponer las partes donde se concentra más la humedad. El hisopo se aplicó en esta parte más profunda, y se inoculó en el medio de cultivo, el cual se incubó verticalmente a 37°C. La lectura de los resultados se llevó a cabo a las 24 horas post-inoculación, mediante la visualización en microscopio óptico de formas móviles, compatibles con trofozoítos de *Tritrichomonas* spp. En caso de negatividad, se repitieron las evaluaciones diariamente, hasta un máximo de 15 días. Por otra parte, si el test fue considerado positivo, se procedió con una tinción Diff-Quik, (Lun and Gajadhar, 1999), para confirmar la presencia del protozoo tricomonádido (Anexo V).

Tras el diagnóstico parasitológico, las muestras se conservaron a -80°C, para posteriores estudios integrados en este proyecto de tesis doctoral.

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La prevalencia de infección, así como la evaluación de factores de riesgo, se analizaron a través del programa Epi-Info 6.0 (CDC, Atlanta, GA, USA). Para comparar las diferentes variables, se utilizó el test de Regresión Logística para el análisis multivariante, y el test Chi cuadrado para

variables dicotómicas. Las correlaciones entre las diferentes variables se consideraron estadísticamente significativas si el valor *P* era igual o inferior a 0.05.

Estudio molecular

1. MUESTRAS

Para el diagnóstico mediante técnicas de biología molecular se seleccionaron muestras, procedentes de los diferentes colectivos felinos objeto de estudio (centros de acogida, gateras, colonias, y criaderos). Un número de muestras fueron escogidas directamente tras ser consideradas positivas a infección por *Cryptosporidium* spp., diagnosticadas a partir del método de inmunofluorescencia directa; mientras que otras, se seleccionaron tras haber resultado positivas a *Giardia* spp. por inmunofluorescencia directa, pero negativas a la flotación. Para el resto, los criterios de inclusión fueron muestras con resultado positivo a infección por *Giardia* spp., mediante el método de flotación, y que fueron clasificadas con, al menos, uno de los tres criterios de Strand *et al.* (Strand *et al.*, 2008), con preferencia por las que presentaban mayor intensidad de parasitación ((+++) > (++) > (+)).

Las muestras seleccionadas se homogenizaron en dicromato potásico 5% y se conservaron a 4°C, hasta su análisis en el laboratorio del Departamento de Enfermedades Infecciosas, del Istituto Superiore di Sanità de Roma. para ello las muestras se enviaron por mensajería 24h en refrigeración y acumulador de hielo.

2. BIOLOGÍA MOLECULAR

El diagnóstico molecular se llevó a cabo en el laboratorio del Departamento de Enfermedades Infecciosas, del Istituto Superiore di Sanità de Roma, mediante la técnica de PCR. Antes de iniciar la reacción enzimática, se llevaron a cabo procesos de lavado, concentración y extracción de DNA.

2.1. Lavado

El objetivo de este paso es eliminar el dicromato potásico 5%, presente en las muestras para su conservación; así como otro tipo de materiales macroscópicos, como sepiolita, estructuras vegetales, o tierra. Las muestras se filtraron mediante un embudo de filtración y, posteriormente, se diluyeron en agua destilada. Este producto se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos, proceso que se realizó por triplicado (Anexo VI A).

2.2. Concentración

La finalidad de este paso es concentrar los quistes de *Giardia* spp. y ooquistes de *Cryptosporidium* spp. Para ello, se mezclaron 3-5 mL del producto obtenido en el paso anterior, con una solución de flotación, de densidad específica conocida (sulfato de magnesio $\delta=1.19$ o sulfato de zinc $\delta=1.20$). Al cabo de 5-10 minutos, se recuperó el sobrenadante y se diluyó con agua destilada. Este producto se centrifugó a 2200 rpm durante 8 minutos, por duplicado, con el fin de eliminar la solución de flotación (Anexo VI B).

2.3. Extracción de DNA

El aislamiento del DNA se realizó mediante el kit comercial (Fast DNA Spin Kit for feces[®], MP-Biomedics, Solon, Ohio). En primer lugar, se introdujo el producto resultante de la técnica de concentración previa, en un tubo de matriz de lisado. Acto seguido, se mezcló con una solución tampón de fosfato salino y una solución de lisado, y se centrifugó a 14.000 rpm durante 5 minutos. El sedimento resultante se introdujo en la máquina FastPrep[®]-24, a 6.0 m/s durante 40 segundos, con el objetivo de desintegrar los quistes y ooquistes, por un método físico. El producto se transfirió a un tubo Falcon 15 mL, y se introdujo 1 mL de matriz de unión. Después se purificaron las muestras con soluciones de lavado específicas y se centrifugaron a 14.000 rpm durante 2 minutos. Finalmente, se transfirió el producto a una unidad de captura (Anexo VI C).

2.4. PCR y nested-PCR

La obtención de copias del fragmento de DNA diana se produjo en dos pasos. El producto de la primera amplificación se utilizó como molde para realizar una segunda ampliación con cebadores que se ubican dentro de la primera secuencia (Ryan *et al.*, 2003).

- *Giardia* spp.: la reacción enzimática para la detección de este protozoo flagelado se hace a partir de los genes que codifican para la beta-giardina y la enzima triosafosatoisomerasa (*tpi*).

Por una parte, se pretende amplificar un fragmento de 723 bp presente en el gen que codifica la beta-giardina, una proteína estructural específica de *Giardia* spp. Se prepara un volumen total de 50 µL, de una mezcla de reacción que contiene: 5 µL de DNA, 25 µL de PCR Master Mix 2X (composición: dATP 400 µM, dCTP 400 µM, dGTP 400 µM, dTTP 400 µM, MgCl₂ 3 mM, Taq DNA polimerasa 50 U/MI), 1 µL de cebador directo externo, 1 µL de cebador reverso externo y 18 µL de agua destilada. La reacción de amplificación se lleva a cabo en un termociclador, donde se programan 35 ciclos bajo las siguientes condiciones: denaturación (3 minutos / 94°C), hibridación (30 segundos / 95°C, 30 segundos / 55°C, y 60 segundos / 72°C) y extensión (7 minutos / 72°C).

Con el objetivo de aumentar la sensibilidad y especificidad de la detección, se amplifica el producto de la PCR, utilizando cebadores internos para un fragmento de 511 bp presente en el producto de la primera reacción. Se prepara un volumen total de 50 µL, de una mezcla de reacción que contiene: 5 µL del producto de amplificación de la primera PCR, 25 µL de PCR Master Mix 2X (composición: dATP 400 µM, dCTP 400 µM, dGTP 400 µM, dTTP 400 µM, MgCl₂ 3 mM, Taq DNA polimerasa 50 U/MI), 1 µL de cebador directo interno, 1 µL de cebador reverso interno y 18 µL de agua destilada. La reacción de amplificación se lleva a cabo en un termociclador, donde se programan 35 ciclos bajo las siguientes condiciones: denaturación (3 minutos / 94°C), hibridación (30 segundos / 94°C, 30 segundos / 53°C, y 60 segundos / 72°C) y extensión (7 minutos / 72°C).

Por otra parte, se pretende amplificar un fragmento de 550 bp presente en el gen que codifica la enzima triosafosato isomerasa (*tpi*). Se prepara un volumen total de 50 µL, de una mezcla de reacción que contiene los mismos componentes citados previamente para la PCR del gen beta-giardina. La reacción de amplificación se lleva a cabo en un termociclador, donde se programan 35 ciclos bajo las siguientes condiciones: denaturación (2 minutos / 94°C), hibridación (30 segundos / 94°C, 30 segundos / 50°C, y 60 segundos / 72°C) y extensión (7 minutos / 72°C).

En la segunda amplificación se emplean cebadores internos para un fragmento de 511 bp presente en el producto de la primera reacción. Se prepara un volumen total de 50 µL, de una mezcla de reacción que contiene los mismos componentes citados previamente para la nested-PCR del gen beta-giardina. La reacción de amplificación se lleva a cabo en un termociclador, donde se programan 35 ciclos bajo las mismas condiciones que la primera PCR para el gen *tpi*.

- *Cryptosporidium* spp.: la reacción enzimática para la detección de este coccidio se hace a partir de los genes que codifican para la subunidad 18S del DNA ribosomal (18S rDNA) y para el gen que codifica la COWP.

Por una parte, se pretende amplificar un fragmento de 763 bp presente en el gen que codifica la subunidad 18S del DNA ribosomal (18S rDNA). Se prepara un volumen total de 50 μ L, de una mezcla de reacción que contiene: 5 μ L de DNA, 25 μ L de PCR Master Mix 2X (composición: dATP 400 μ M, dCTP 400 μ M, dGTP 400 μ M, dTTP 400 μ M, MgCl₂ 3 mM, Taq DNA polimerasa 50 U/MI), 1 μ L de cebador directo externo, 1 μ L de cebador reverso externo y 18 μ L de agua destilada. La reacción de amplificación se lleva a cabo en un termociclador, donde se programan 35 ciclos bajo las siguientes condiciones: denaturación (3 minutos / 94°C), hibridación (30 segundos / 94°C, 30 segundos / 58°C, y 60 segundos / 72°C) y extensión (7 minutos / 72°C).

En la segunda amplificación se emplean cebadores internos para un fragmento de 587 bp presente en el producto de la primera reacción. Se prepara un volumen total de 50 μ L de una mezcla de reacción que contiene: el producto de amplificación de la primera PCR, PCR Master Mix 2X (composición: dATP 400 μ M, dCTP 400 μ M, dGTP 400 μ M, dTTP 400 μ M, MgCl₂ 3 mM, Taq DNA polimerasa 50 U/MI), cebador directo interno, cebador reverso interno y agua destilada. La reacción de amplificación se lleva a cabo en un termociclador, donde se programan 35 ciclos bajo las mismas condiciones que la primera PCR para el gen 18S rDNA.

Por otra parte, se pretende amplificar un fragmento de 769 bp presente en, una proteína estructural de la pared del ooquiste. Se prepara un volumen total de 50 μ L, de una mezcla de reacción que contiene los mismos componentes citados previamente para la primera PCR del gen 18S rDNA. La reacción de amplificación se lleva a cabo en un termociclador, donde se programan 35 ciclos bajo las siguientes condiciones: denaturación (3 minutos / 94°C), hibridación (30 segundos / 94°C, 30 segundos / 65°C, y 60 segundos / 72°C) y extensión (7 minutos / 72°C).

En la segunda amplificación se emplean cebadores internos para un fragmento de 553 bp presente en el producto de la primera reacción. Se prepara un volumen total de 50 μ L, de una mezcla de reacción que contiene los mismos componentes citados previamente para la nested-PCR del gen 18S rDNA. La reacción de amplificación se lleva a cabo en un termociclador, donde se programan 35 ciclos bajo las siguientes condiciones: denaturación (3 minutos / 94°C), hibridación (30 segundos / 94°C, 30 segundos / 55°C, y 60 segundos / 72°C) y extensión (7 minutos / 72°C).

2.5. Productos de la nested-PCR

La lectura del producto resultante de la reacción enzimática se hace mediante electroforesis en gel de agarosa 1.6% y visualizados mediante la tinción con bromuro de etidio (0.5µg/mL). La separación de bandas se observa con un aparato de luz ultravioleta. (Anexo VI D)

2.6. Fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP)

Para averiguar el genotipo de *Giardia* spp., se analizan los fragmentos de restricción de longitud polimórfica mediante la enzima HaeIII (Anexo VI E). Se prepara un volumen total de 20 µL, de una mezcla de reacción que contiene: 10 µL del producto de amplificación de la nested-PCR para la beta-giardina, 2 µL de solución de tampón 10X, 1 µL enzima de restricción (HaeIII) y 7 µL agua destilada. Después se incuban los tubos sin agitación en un Thermomixer, a 37°C durante 4 horas.

La lectura de la RFLP se realiza mediante electroforesis en gel de agarosa 3% (Anexo VI F)

2.7. Purificación del DNA y Secuenciación

Antes de secuenciar las muestras se purifica el DNA utilizando el kit comercial QIA quick PCR purification Kit (Qiagen®, Hilden, Alemania) (Anexo VI G)

Una vez purificado el DNA, las muestras se remiten a la compañía (BMR genomics, Padova, Italia) para su secuenciación (Anexo VI H)

El análisis de las secuencias obtenidas se llevó a cabo con el programa BioEdit v7.0.5. y se compararon con otras secuencias registradas, en base al parámetro “porcentaje de identidad”, en GenBank (GenBank: Nucleotide Blast).

Estudio bienestar: evaluación de parámetros de bienestar y determinación de cortisol y/o sus metabolitos en heces

1. MUESTRAS

Para el análisis hormonal, se seleccionaron aleatoriamente entre un 30-40% de las muestras recogidas en los distintos colectivos. Para ello, se recogieron tanto muestras positivas como negativas al diagnóstico parasitológico, y de diferentes grados de consistencia. Tras el diagnóstico coprológico, se llevó a cabo la extracción de los FGM; y en aquellos casos en los que no fue posible el procesamiento inmediatamente después de la coprología, las muestras fueron conservadas a -80°C hasta el proceso de extracción.

Con el objetivo de poder valorar la respuesta de estrés de tipo crónico, se llevó a cabo un segundo muestreo complementario, de los mismos colectivos.

El periodo de tiempo entre ambos muestreos fue de un año, aproximadamente.

2. EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE BIENESTAR

En cada colectivo muestreado se solicitó a los veterinarios, o al personal encargado de las instalaciones, información acerca de la presencia de perros, la densidad de población felina alojada, entrada de nuevos individuos y adopciones, y el enriquecimiento ambiental. Se recogió información de estos ítems, de acuerdo con los parámetros descritos por Amat *et al.* (2016), con el fin de poder evaluar el grado de bienestar en cada uno de los colectivos:

- Contacto con perros: presencia de perros en las mismas instalaciones y, si se daba el caso, si éste era constante (visual y/o auditivo) o puntual.
- Densidad de animales: número de individuos en relación al área de las instalaciones.
- Cambios en la población: se preguntó acerca del número estimado de adopciones e introducciones de nuevos individuos.
- Enriquecimiento ambiental: se cuantificaron los recursos de enriquecimiento ambiental (escondites, rascadores, juguetes), en relación al número de gatos alojados.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

Para evaluar este parámetro, se estableció una gradación de tres niveles (0, 1, o 2), en base a los estudios de Möstl *et al.* (2013), y Pesavento y Murphy (2014), para el parámetro “presencia de perros”; mientras que el “grado de confinamiento” se fijó en base a la publicación de Rochlitz, I. (1999). El resto de factores se establecieron por criterio propio, ya que no constan evidencias al respecto (Tabla 5)

PARÁMETRO	0	1	2
PRESENCIA DE PERROS	No conviven en el mismo recinto, únicamente existe contacto visual, auditivo u olfativo, puntualmente	Conviven en el mismo recinto, pero tienen contacto auditivo u olfativo	Conviven en el mismo recinto y tienen contacto visual
GRADO DE CONFINAMIENTO (GATOS/m ²)	>3 m ² /gato	1.67 m ² /gato - 3 m ² /gato	<1.67 m ² /gato
CAMBIO EN LA POBLACIÓN	La población se mantiene estable durante todo el año, o hay introducción puntual de algunos individuos		Introducción de nuevos individuos en determinadas épocas del año, llegando a duplicar la población
ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL	Los gatos cuentan con un ambiente enriquecido donde poder expresar su comportamiento normal (escondites, rascadores, juguetes, zonas elevadas). Además, estos recursos son abundantes, de tal manera que se disminuye la competitividad.		Los gatos no cuentan con todos los recursos de enriquecimiento ambiental para poder expresar su comportamiento normal (escasez de juguetes o rascadores). Además, aquellos que están presentes, son limitados.

Tabla 5. Gradación de los diferentes parámetros que causan estrés en el gato doméstico

3. EXTRACCIÓN DE HORMONAS ESTEROIDES

Antes de cuantificar, los FGM deben ser extraídos de la muestra. Los extractos se obtuvieron siguiendo el protocolo del estudio de Talló-Parra *et al.* (Talló-Parra *et al.*, 2015). En primer lugar, las muestras fueron introducidas en una estufa a 37°C durante 48 horas, para eliminar la humedad. Una vez secas, se pulverizaron manualmente y se recogieron 300 mg. Después se mezclaron con de agua destilada y 3 mL de metanol, y se homogenizaron en vórtex durante 30 minutos. Finalmente, la mezcla se centrifugó a 3.000 rpm durante 15 minutos, y se obtuvo 1 mL de sobrenadante. Este producto fue congelado a -80°C, hasta su análisis (Anexo VII).

4. ANÁLISIS HORMONAL Y TEST DE VALIDACIÓN

La concentración de FGM, así como la validación bioquímica, se determinaron a través de un EIA específicamente diseñado para la detección de cortisol (Neogen[®] Corporation Europe, Ayr, UK). (Anexo VIII)

La cuantificación de FGM se inicia con la preparación de cuatro soluciones estándar, de diferentes concentraciones hormonales (1 µg/mL, 20 ng/mL, 2 ng/mL, y 0.2 ng/mL), y con la dilución del conjugado hormona-enzima. A continuación, se añaden 50 µL de los estándares y las soluciones problema, en los pocillos de la placa ELISA. Tras 1 hora de incubación a temperatura ambiente, los pocillos se lavan con una solución de lavado y, acto seguido, se añaden 150 µL de sustrato a cada pocillo. Después de una breve incubación a temperatura ambiente (30 minutos), se añade 150 µL de ácido clorhídrico a cada pocillo, y se procede con la lectura de la placa a 650 nm.

Para la validación del ensayo, se creó un pool de extracto de heces, mezclando aleatoriamente 20 muestras procedentes de diferentes colectivos felinos.

La precisión fue evaluada calculando los coeficientes de variación (CV) intra- e interensayo (Food and Drug Administration, 2015).

La especificidad se analizó mediante el test de dilución. Para ello se utilizaron diluciones 1:1, 1:2, 1:5 y 1:10, del pool de muestras con el EIA buffer.

La exactitud del ensayo se evaluó mediante el test de eficiencia de extracción, calculado añadiendo concentraciones de 50, 100 y 200 µL del pool de muestras, en concentraciones de 200, 100 y 50 µL de cortisol externo, respectivamente.

De acuerdo con el fabricante, la reacción cruzada del anticuerpo del EIA con otros esteroides es la siguiente: prednisolona 47.4%, cortisona 15.7%, 11-deoxycortisol 15%, prednisona 7.83%, corticosterona 4.81%, 6 β -hidroxicortisol 1.37%, 17-hidroxiprogesterona 1.36%, deoxicorticosterona 0.94%. Los esteroides con un porcentaje de reacción cruzada inferior a 0.06% no se incluyen.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos se analizaron mediante los programas R! Software (R-project, Version 3.0.1, R Development Core Team, University of Auckland, Nueva Zelanda) y Matlab (Matlab and Statistics Toolbox Release 2012b, The MathWorks, Inc., Natick, Massachusetts, United States). Las correlaciones entre las diferentes variables se consideraron estadísticamente significativas si el valor P era igual o inferior a 0.05).

La comparación de las variables numéricas con las variables cualitativas se estructuró en cuatro categorías (una para cada colectivo). Para cada una de ellas, se calculó el nivel medio de la variable numérica y la desviación típica, omitiendo los individuos de los cuales no se obtuvieron valores. Las categorías fueron comparadas dos a dos, calculando a partir de los estadísticos un valor X que seguía una distribución normal o *t-Student*, en función del número de individuos en cada categoría. Este valor X permitió entonces calcular un valor P , que determinó si había evidencia estadística de que los valores de la variable numérica eran realmente diferentes en cada una de las categorías (test bilateral), o si eran mayores o menores en una categoría que en la otra (test unilateral).

V. RESULTADOS

Estudio coprológico

1. COLECTIVOS FELINOS

El estudio se llevó a cabo en 27 colectivos, y se recogieron un total de 934 muestras fecales:

- 13 centros de acogida: 410 muestras.
- 9 gateras: 307 muestras.
- 7 colonias felinas, algunas situadas alrededor de los centros de acogida: 169 muestras.
- 4 criaderos: 48 muestras

Antes de ser introducidos en el colectivo, los gatos eran sometidos a un test diagnóstico para FIV/FeLV con un kit ELISA comercial. Un total de 811 presentaron resultados negativos para ambos virus, mientras que 13 de ellos, que residían en gateras (n=11) y centros de acogida (n=2), eran positivos para uno u otro. El estatus vírico de 110 individuos era desconocido, la mayoría de estos animales (n=102) pertenecían a colonias felinas.

2. CONSISTENCIA

La consistencia de las heces se evaluó en 787 de las 934 muestras, y en todos los colectivos se detectaron porcentajes muy similares. Aquellas muestras puntuadas con valores de consistencia de 5-7 (n=218), es decir, que eran líquidas o presentaban una textura sin forma definida y que dejaban residuos al ser recogidas, se detectaron en el 30% (n=93) de los centros de acogida, el 24.5% (n=67) en gateras, el 28% (n=43) en colonias felinas; y el 29% (n=14) en criaderos.

3. CUESTIONARIO

3.1. Instalaciones

3.1.1. Alojamiento

Todos los gatos eran alojados en grupos de 5 a 30 individuos (n=508) o de 35 a 80 (n=426). Los colectivos donde se confinaba un porcentaje más alto de animales en grupos de 35 a 80 individuos, fueron las gateras (71%, n=217) y los centros de acogida (37%, n=150). Un 35% (n=59) de los gatos de colonias, también eran congregados en grupos de estas dimensiones, mientras que en todos los criaderos se mantenían grupos de 6-18 individuos.

3.1.2. Bandeja de deposición

El material de la bandeja de deposiciones más común en todos los colectivos fue la sepiolita (n=661), seguido de tierra (n=72), serrín (n=34) y pellet (n=26). En los centros de acogida muestreados se utilizaba sepiolita (n=333) y serrín (n=34) y tierra (n=32). En gateras se registró el uso de sepiolita (n=235), pellet (n=26), y tierra (n=19). En colonias felinas sepiolita (n=45) y tierra (n=21). En todos los criaderos se empleaba sepiolita (n=48).

3.1.3. Tipo de suelo

Gran parte de las instalaciones eran de cemento (n=501), o de tierra (n=352). Un elevado porcentaje de centros de acogida (77.5%, n=318) tenían sustratos de cemento en sus instalaciones, mientras que el 95% (n=149) de colonias eran espacios de tierra. En gateras se registraron instalaciones de cemento (n=175) y tierra (n=111), y en los criaderos los suelos estaban recubiertos por baldosas (n=48)

3.2. Manejo

3.2.1. Cuarentena

Una buena parte de los colectivos estudiados llevaban a cabo medidas de cuarentena (n=650, 70%). La mayor parte de los individuos de centros de acogida y gateras (75%, n=308; y 74%, n=227; respectivamente), y todos los gatos de criadero, adoptaban este protocolo. Contrariamente, más de la mitad de las colonias muestreadas introducían los individuos sin aislamiento previo (60%, n=102). La duración del período de cuarentena era muy variable, y dependía de los protocolos establecidos en cada centro.

3.2.2. Protocolo antiparasitario

En todos los colectivos, a excepción de las colonias felinas, los animales eran desparasitados en el momento de ser introducidos en el colectivo y después se repetía el tratamiento periódicamente: como mínimo cada tres meses (36%, n=299) o una/dos veces al año, como máximo (43.5%, n=365). Algunos centros (21%, n=175), en cambio, no administraba ningún tratamiento antiparasitario a lo largo del año. No se pudo documentar el protocolo antiparasitario en 6 centros. En los centros de acogida se documentó que un 75% de los animales (n=271), recibían tratamiento cada 6 meses o más; mientras que, en las gateras y los criaderos, desparasitaban como mínimo cada tres meses (65%, n=169; y 81%, n=39;

respectivamente). Ninguna de las colonias estudiadas administraba, de manera pautada, tratamiento antiparasitario. En la Tabla 6 se detallan los porcentajes de frecuencia de desparasitación, en cada colectivo.

FRECUENCIA DE TRATAMIENTO	CENTROS DE ACOGIDA (n=410)	GATERAS (n=307)	COLONIAS FELINAS (n=169)	CRIADEROS (n=48)	TOTAL
Una/dos veces año	271 (75%)	85 (32.7%)	0	9 (19%)	365 (43.5%)
Cada 3 meses	91 (25%)	169 (65%)	0	39 (81%)	299 (35.6%)
Nunca	0	6 (2.3%)	169 (100%)	0	175 (21%)
TOTAL	362 (88%)	260 (85%)	169 (100%)	48 (100%)	839 (90%)

Tabla 6. Frecuencia de desparasitación en cada colectivo

El tipo de antiparasitario variaba en función del centro, los más habituales eran la combinación de milbemicina-praziquantel (n=312), fenbendazol (n=182) y combinación de praziquantel-pyrantel-febantel (n=99). El primero, era el compuesto de elección tanto en centros de acogida (56.5%, n=160), como en gateras (57.5%, n=146). En los criaderos, la mayor parte de gatos eran desparasitados con fenbendazol (87.5%, n=42).

3.2.3. Protocolo de limpieza y desinfección

Las pautas de limpieza y desinfección eran muy similares en todos los colectivos, a excepción de las colonias felinas. Las deposiciones se retiraban diariamente (n=749), pero la limpieza completa y la renovación del material de las bandejas se llevaban a cabo cada dos días o más (n=740), excepto en una gatera, donde se hacía a diario (n=85). En cuatro colonias felinas (n=88) no se llevaba a cabo ningún protocolo de limpieza, mientras que, en las restantes (n=81), se retiraban las deposiciones en los puntos controlables, como mínimo una vez por semana.

En los colectivos donde se seguía un protocolo de desinfección, se observó que la mayoría de centros empleaban un único producto, siendo la lejía (hipoclorito sódico) el más utilizado (n=305; 51.2%), seguido del vapor de agua (n=94; 15.8 %), y el yodo tensioactivo (n=76; 12.8%). En un centro de cogida y en una gatera, en cambio, alternaban la lejía con el amonio cuaternario (n=121; 20.3%).

4. DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO

Todas las muestras (n=934) se procesaron por la técnica coprológica de flotación en sulfato de zinc 33% ($\delta=1.18$). A excepción de un criadero, donde todos los animales resultaron negativos, en todos los demás colectivos estudiados se detectaron formas de transmisión parásita, con prevalencias de infección que oscilaban del 8.3% al 94%. La prevalencia total fue del 53.2% (n=497). En la Tabla 7 se resumen los porcentajes de prevalencias observadas.

El total de muestras procesadas mediante el test de inmunofluorescencia directa fueron 132 (14%). En el caso de *Giardia* spp., se observaron quistes en 75 muestras, y la mayoría de los resultados (97.3%, n=73) coincidieron con los obtenidos en el diagnóstico mediante la flotación en sulfato de zinc 33% ($\delta=1.18$). No obstante, se notificaron 6 casos en los cuales la flotación había resultado negativa, pero la inmunofluorescencia era positiva. Se detectaron ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en 24 muestras. Ambos protozoos se detectaron simultáneamente en 14 muestras.

El cultivo selectivo se llevó a cabo en 107 (11.5%) muestras, y se evidenciaron formas móviles

PARÁSITOS	CENTROS DE ACOGIDA (n=410)	GATERAS (n=307)	COLONIAS FELINAS (n=169)	CRIADEROS (n=48)	TOTAL (n=934)
PROTOZOOS	169 (41%)	95 (31%)	53 (31.4%)	10 (21%)	327 (35%)
<i>Giardia</i> spp.	98 (24%)	84 (27.4%)	17 (10%)	8 (16.7%)	207 (22%)
<i>Cystoisospora</i> spp.	83 (20%)	15 (4.9%)	39 (23%)	0	137 (14.7%)
<i>Cryptosporidium</i> spp.	15 (3.7%)	4 (1.3%)	2 (1.2%)	3 (6.3%)	24 (2.6%)
<i>Trichostrongylus axei</i> spp.	10 (2.5%)	0	2 (1.2%)	0	12 (1.3%)
HELMINTOS	131 (32%)	51 (16.6%)	99 (58.6%)	0	281 (30%)
Taeniidae	41 (10%)	13 (4.2%)	27 (16%)	0	81 (8.7%)
<i>Dypilidium caninum</i>	0	4 (1.3%)	1 (0.6%)	0	5 (0.5%)
Diphyllobothridae	1 (0.2%)	0	0	0	1 (0.1%)
<i>Toxocara cati</i>	71 (17.3%)	16 (5.2%)	29 (17.2%)	0	116 (12.4%)
Ancylostomatidae	35 (8.5%)	9 (3%)	64 (38%)	0	108 (11.6%)
Metastrongylidae	27 (6.6%)	17 (5.5%)	31 (18.3%)	0	75 (8%)
<i>Capillaria</i> sp. / <i>Eucoelus</i> sp.	2 (0.5%)	0	5 (3%)	0	7 (0.7%)
TOTAL	241 (58.8%)	127 (41.4%)	119 (70.4%)	10 (20.8%)	497 (53.2%)

Tabla 7. Prevalencia de parasitosis intestinales y pulmonares, observada en los diferentes colectivos felinos

en 12 muestras. En todas ellas se reveló, posteriormente, la presencia de protozoos tricomonádidos mediante a la tinción de Diff-Quick.

Los protozoos más prevalentes fueron *Giardia* spp. y *Cystoisospora* spp. El primero fue el más común en centros de acogida (24%, n=98), gateras (27.4%, n=84) y criaderos (16.7%, n=8), mientras que el segundo lo fue en colonias felinas (23%, n=39).

En general, la especie de helminto más frecuente fue *Toxocara cati* (12.4%, n=116). Se presentó de forma destacada en centros de acogida (17.3%, n=71), y su prevalencia en gateras (5.2%, n=16) fue muy similar a la de los nematodos metastrongílidos (5.5%, n=17). En colonias felinas, en cambio, los vermes ancilostómidos fueron los más comunes (38%, n=64). No se detectó ningún tipo de helminto en criaderos. Aunque la prevalencia de cestodos fue reducida en todos los colectivos estudiados, en los centros de acogida se identificaron huevos compatibles con la familia Taeniidae (10%, n=41), representando el segundo helminto más frecuente; y el tercero en el cómputo total (8.7%, n=81). Además, esta familia de cestodos también fue la más prevalente en gateras (4.2%, n=13), y colonias felinas (16%, n=27).

Los colectivos con mayor tasa de infección parasitaria fueron las colonias felinas (70.4%, n=119) donde, además, se registró la prevalencia de helmintos más elevada (58.6%, n=99). Tanto la prevalencia total de infección, como la prevalencia de helmintos, fueron significativamente más altas en las colonias felinas, en comparación al resto de colectivos ($P=0.013$ y $P < 0.001$, respectivamente). De manera similar, en los centros de acogida se documentó un porcentaje de infección por protozoos, significativamente mayor que en el resto de ambientes ($P=0.002$). El siguiente gráfico muestra las prevalencias de protozoos y helmintos, en los diferentes colectivos estudiados Figura 2.

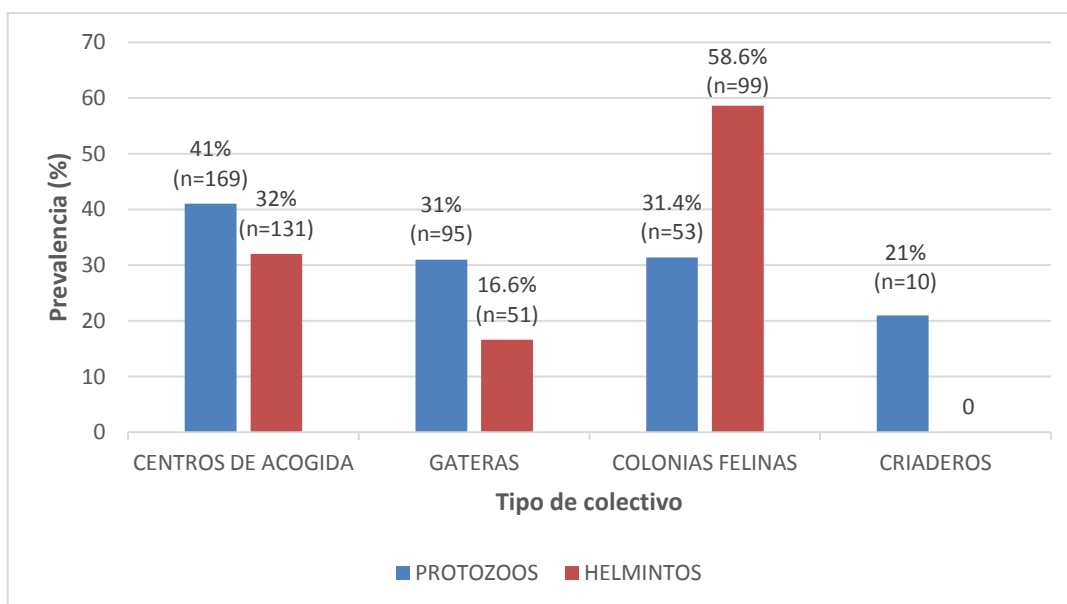


Figura 2. Prevalencia de protozoos y helmintos, observada en los diferentes colectivos felinos

Del total de muestras positivas, un 22% (n=206) presentaba coinfecciones por dos, o más de dos, especies de parásitos. Los colectivos donde las coinfecciones fueron más frecuentes, fueron las colonias felinas (54%, n=64), y el porcentaje de asociación más elevado se observó entre helmintos ancilostómidos y metastrongílidos (n=18). Los centros de acogida (43%, n=104), fueron los segundos colectivos con más índices de infecciones mixtas. En este caso, la asociación entre los protozoos *Giardia* spp. y *Cystoisospora* spp. fue la más comúnmente detectada (n=35), seguida de la infección concurrente con *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. (n=14). Ambos colectivos mostraron diferencias estadísticamente significativas en la prevalencia de coinfección, en comparación a las gateras ($P=0.0036$). El siguiente gráfico muestra los porcentajes de muestras positivas, con coinfección e infección simple, en cada colectivo Figura 3.

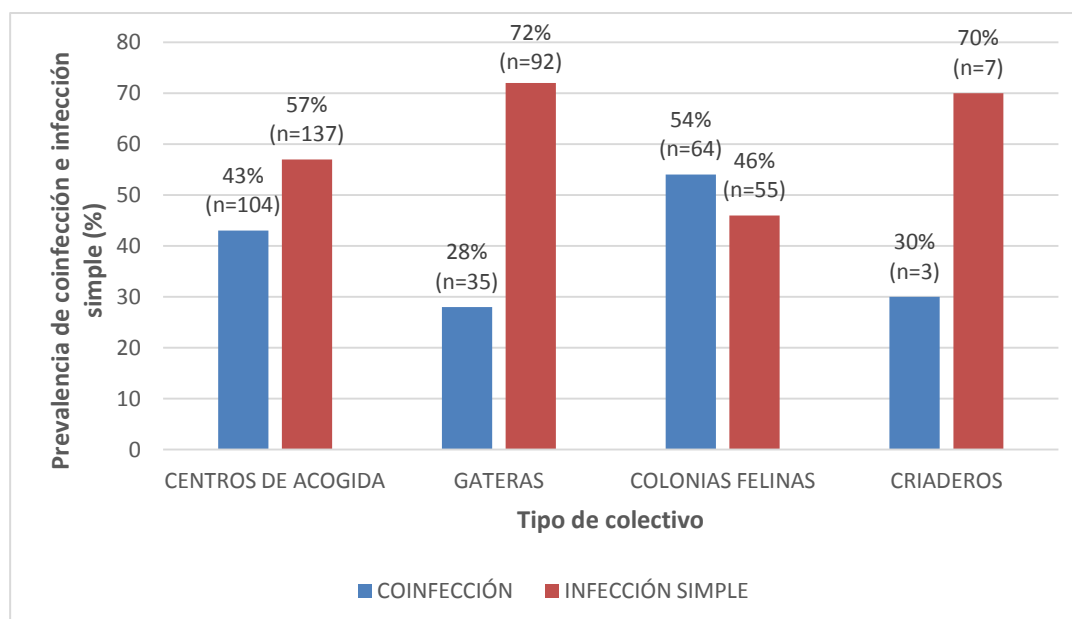


Figura 3. Porcentajes de coinfección e infección simple, observados en los diferentes colectivos felinos.

No se detectó una asociación positiva entre el grado de consistencia fecal y la prevalencia de infección parasitaria ($P > 0.05$). Sin embargo, el 44% de aquellas muestras que resultaron positivas a infección protozoaria, fueron calificadas con consistencias de 5-7. En este aspecto, se detectaron diferencias estadísticamente significativas al comparar la prevalencia de infección por protozoos y la consistencia fecal ($P < 0.001$). De igual modo, también se observó esta relación estadística con la infección por helmintos ($P=0.0018$), aunque el porcentaje de muestras parasitadas por nematodos y/o cestodos, y que presentan consistencias de 5-7, es menor (22.5%).

Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grado de consistencia fecal y la prevalencia de coinfecciones.

5. ANÁLISIS DE LOS FACTORES DE RIESGO

No existían diferencias estadísticamente significativas entre la presencia de infecciones por HIV o FeLV, con la infección parasitaria ($P > 0.05$).

5.1. Instalaciones

No se detectaron diferencias significativas entre la prevalencia de infección y el tamaño del grupo ($P > 0.05$).

5.1.1. Bandeja de deposición

Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la prevalencia de infección y los diferentes materiales de la bandeja de deposición ($P=0.014$). Tanto *Giardia* spp. como *Cystoisospora* spp. fueron los parásitos más prevalentes tanto en muestras recogidas en serrín (35.3%, $n=12$, cada uno), como en sepiolita (23.8%, $n=157$ y 12.4%, $n=82$, respectivamente). En aquellas instalaciones donde las deposiciones eran excretadas en tierra, se detectó mayor prevalencia de los nematodos de la especie *Toxocara cati* y de ancilostómidos (44%, cada uno).

5.1.2. Tipo de suelo

Similarmente, se documentó una relación estadísticamente significativa cuando se compararon el tipo de suelo y la prevalencia de parasitosis ($P < 0.001$). Gran parte de las instalaciones eran de cemento ($n=501$), donde se registraron prevalencias del 48%, con *Giardia* spp. ($n=117$) y *Cystoisospora* spp. ($n=81$) como agentes más frecuentes. En aquellos suelos terrosos ($n=352$), sin embargo, la prevalencia de infección parasitaria era significativamente mayor (66%), y se hallaron nematodos ancilostómidos ($n=83$) y *Giardia* spp. ($n=79$), por encima de cualquier otra especie de parásito.

5.2. Manejo

5.2.1. Cuarentena

La relación entre infección parasitaria y la aplicación de cuarentena no era estadísticamente significativa.

5.2.2. Protocolo antiparasitario

No se encontraron diferencias significativas con respecto a la prevalencia de parasitosis y la frecuencia de tratamiento ($P > 0.05$), pero sí se observó que la prevalencia de parasitosis era

significativamente inferior ($P=0.018$) en individuos que recibían algún tipo de antiparasitario, frente a los que no recibían nunca.

El análisis estadístico no reveló una relación significativa entre la prevalencia de infección y el tipo de principio activo. De la misma manera, no se detectó una asociación positiva entre la frecuencia de parasitación por protozoos o helmintos, y el principio activo.

5.2.3. Protocolo de limpieza y desinfección

No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre la frecuencia de retirada de las heces, así como de cambio del material de la bandeja de deposición, con la prevalencia de parasitosis.

El análisis estadístico reflejó una prevalencia de infección parasitaria significativamente superior, cuando no se llevaban a cabo protocolos de desinfección ($P < 0.001$). Sin embargo, no se detectaron diferencias estadísticas entre la prevalencia de infección y el tipo de parásito, en comparación con los diferentes desinfectantes ($P > 0.05$).

Estudio molecular

El total de muestras seleccionadas para el estudio molecular (n=40), procedían de centros de acogida (n=24) y gateras (n=16).

Todas ellas habían sido analizadas mediante flotación en sulfato de zinc 33% ($\delta=1.18$), siendo todas positivas a infección por *Giardia* spp., a excepción de una.

Por otro lado, de las 27 que fueron analizadas por inmunofluorescencia directa, en el 100% se observaron quistes de *Giardia* spp., mientras que en 8 de ellas se detectaron ooquistes de *Cryptosporidium* spp.

La siguiente tabla (Tabla 8) muestra los resultados de cada extracto analizado por las diferentes técnicas: flotación, inmunofluorescencia directa y PCR (incluyendo cualquier tipo de gen).

V. RESULTADOS

EXTRACTO	ZnSO ₄	IFA		PCR	
	<i>Giardia</i> spp.	<i>Giardia</i> spp.	<i>Cryptosporidium</i> spp.	<i>Giardia</i> spp.	<i>Cryptosporidium</i> spp.
1	+	+	-	+	+
2	+	+	-	+	-
3	+	+	-	+	+
4	+	+	+	+	-
5	+	+	+	+	+
6	+			-	-
7	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+
9	+	+	-	+	+
10	+	+	-	+	-
11	+	+	+	-	-
12	-	+	-	-	-
13	+	+	-	-	-
14	+	+	-	-	-
15	+	+	-	-	-
16	+			-	-
17	+	+	-	-	+
18	+	+	-	-	+
19	+	+	-	-	-
20	+	+	-	-	-
21	+	+	+	+	-
22	+			+	+
23	+	+	-	+	+
24	+			+	-
25	+			+	+
26	+			+	-
27	+			+	-
28	+	+	-	+	+
29	+			+	+
30	+	+	-	+	-
31	+	+	-	+	-
32	+	+	-	+	+
33	+	+	+	+	+
34	+			+	-
35	+	+	-	+	+
36	+			+	-
37	+			-	+
38	+	+	+	+	-
39	+			+	+
40	+			+	+

Tabla 8. Resultado observado en las diferentes técnicas:

“+” (resultado positivo), “-“ resultado negativo), y “Sombreado” (técnica no realizada). □

1. IDENTIFICACIÓN DE *Giardia* spp.

La amplificación del gen de la beta-giardina, resultó positiva en 28 de los extractos (Imágenes 1 y 2).

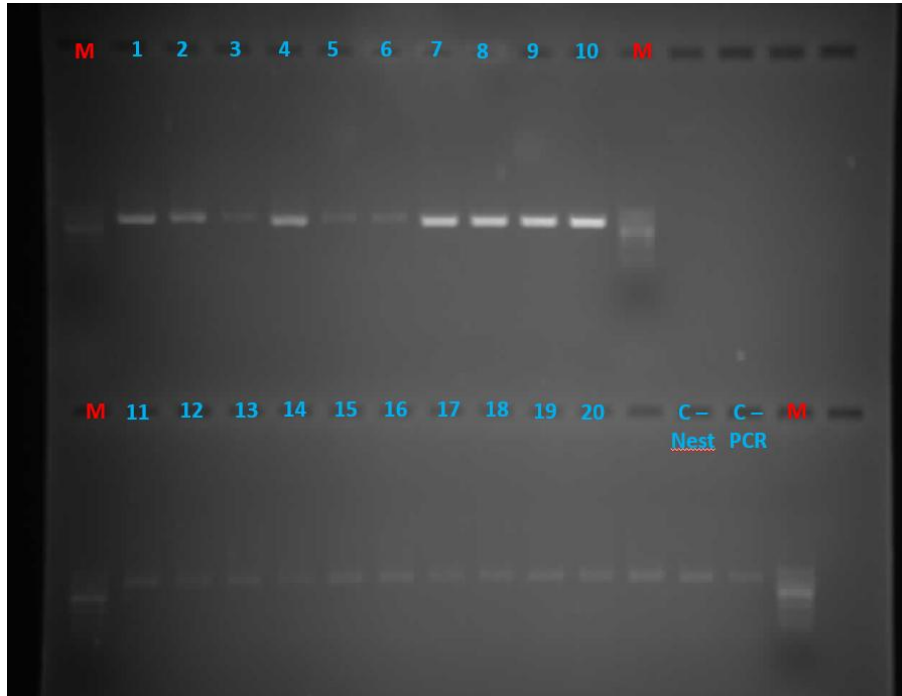


Imagen 1. Nested-PCR *Giardia* spp. (gen beta-giardina), extractos 1-20, Control negativo Nested-PCR, control negativo PCR. M = marcador

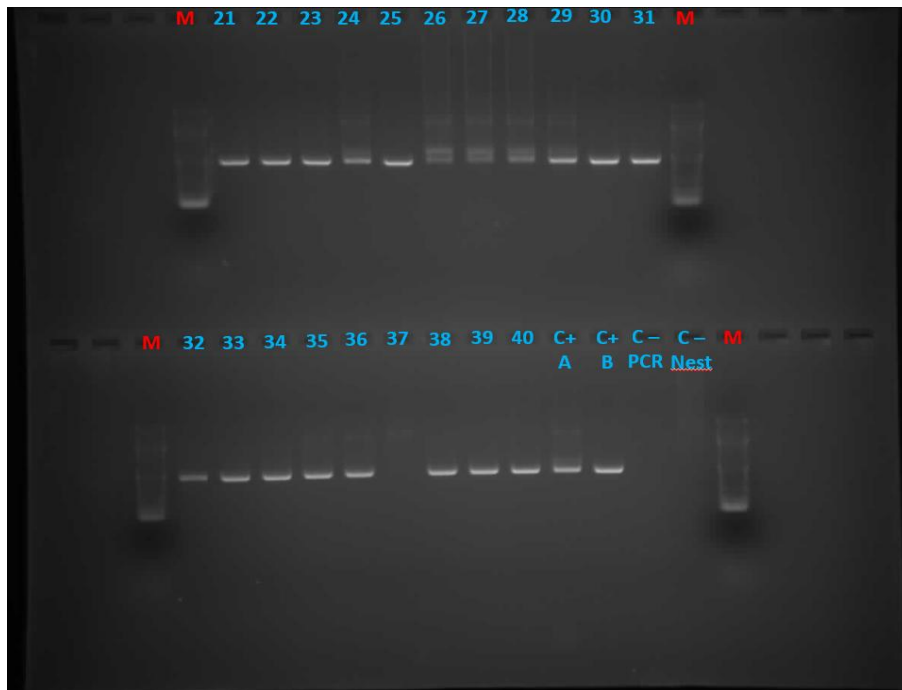


Imagen 2. Nested-PCR *Giardia* spp. (gen beta-giardina), extractos 21-40, controles positivos genotipos A y B, control negativo PCR, control negativo Nested-PCR. M = marcador

El análisis de los fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP), se realizó sobre 9 de las 28 muestras positivas para el gen de la beta-giardina. Todas ellas fueron catalogadas como genotipo F (Imagen 3).

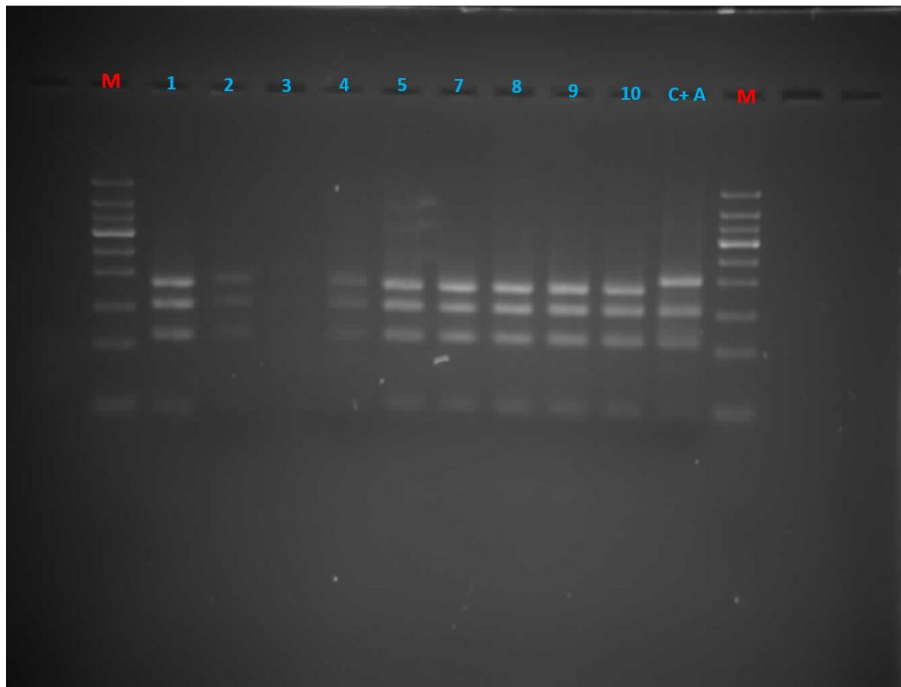


Imagen 3. RFLP: extractos 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, control positivo genotipo A. M = marcador

Para el gen de la *tpi*, *Giardia* spp. se detectó en 22 del total de extractos analizados (Imágenes 4 y 5).

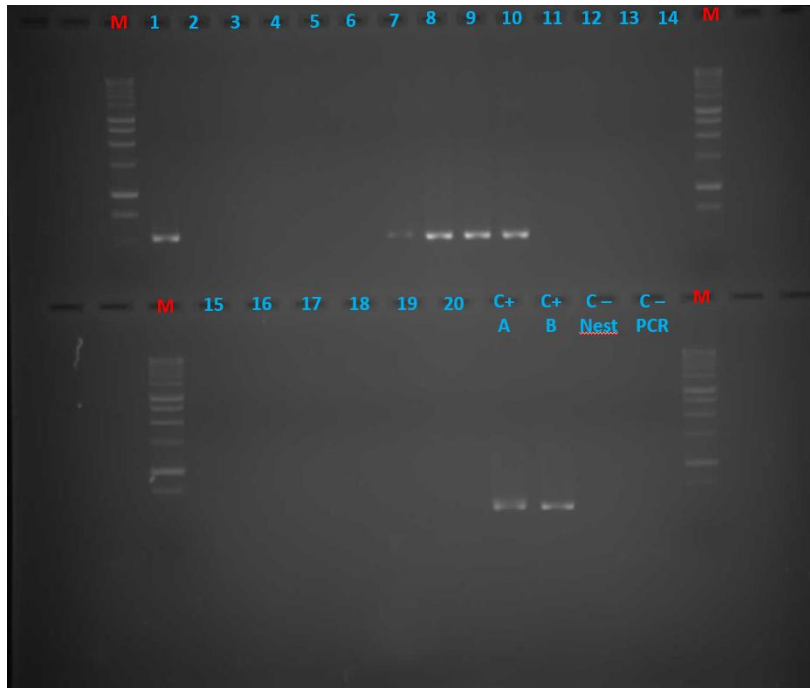


Imagen 4. Nested-PCR *Giardia* spp. (gen *tpi*), extractos 1-20, controles positivos genotipos A y B, control negativo Nested-PCR, control negativo PCR. M = marcador

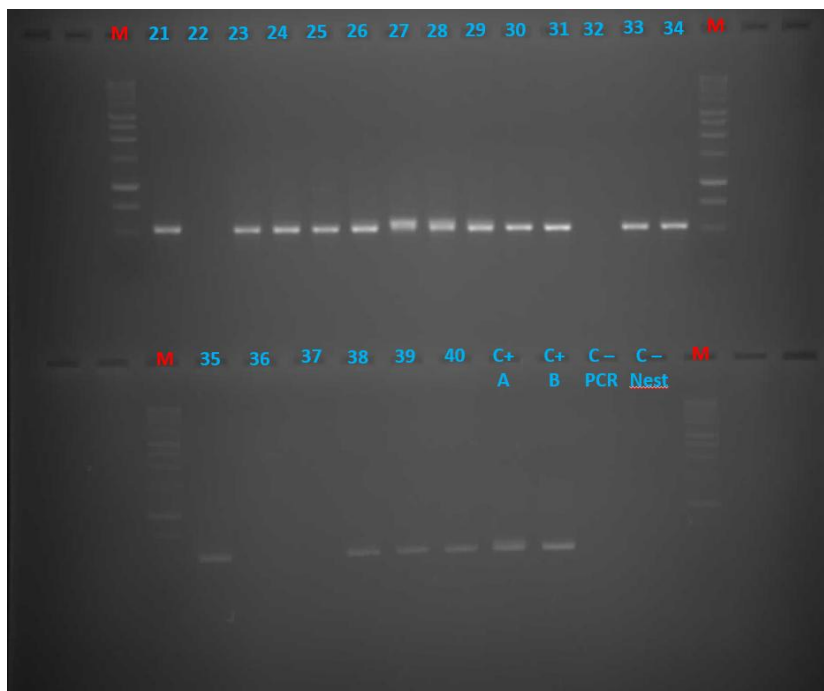


Imagen 5. Nested-PCR *Giardia* spp. (gen *tpi*), extractos 21-40, controles positivos genotipos A y B, , control negativo PCR, control negativo Nested-PCR. M = marcador

Los resultados del diagnóstico de *Giardia* spp., para ambos genes estudiados, se muestra en la siguiente tabla (Tabla 9)

Nº EXTRACTO	COLECTIVO	GEN beta-giardina	GEN <i>tpi</i>
1	Centro acogida	+	+
2	Centro acogida	+	-
3	Centro acogida	+	-
4	Centro acogida	+	-
5	Centro acogida	+	-
6	Centro acogida	-	-
7	Centro acogida	+	+
8	Gatera	+	+
9	Gatera	+	+
10	Gatera	+	+
11	Gatera	-	-
12	Gatera	-	-
13	Centro acogida	-	-
14	Centro acogida	-	-
15	Centro acogida	-	-
16	Centro acogida	-	-
17	Centro acogida	-	-
18	Centro acogida	-	-
19	Centro acogida	-	-
20	Centro acogida	-	-
21	Centro acogida	+	+
22	Centro acogida	+	-
23	Centro acogida	+	+
24	Centro acogida	+	+
25	Centro acogida	+	+
26	Centro acogida	+	+
27	Centro acogida	+	+
28	Centro acogida	+	+
29	Centro acogida	+	+
30	Gatera	+	+
31	Gatera	+	+
32	Gatera	+	+
33	Gatera	+	+
34	Gatera	+	+
35	Gatera	+	+
36	Gatera	+	-
37	Gatera	-	-
38	Gatera	+	+
39	Gatera	+	+
40	Gatera	+	+

Tabla 9. Resultado observado para *Giardia* spp., en los diferentes genes estudiados:

“+” (resultado positivo), “-“ resultado negativo)

2. IDENTIFICACIÓN DE *Cryptosporidium* spp.

Para el gen de la 18S rDNA, se detectaron resultados positivos en 19 extractos (Imágenes 6 y 7).

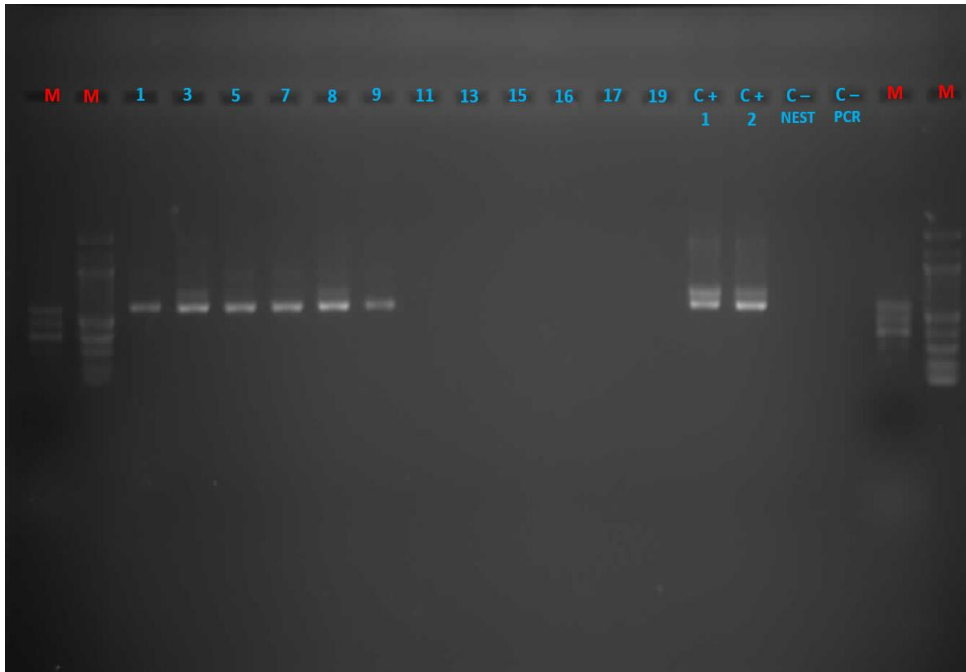


Imagen 6. Nested-PCR *Cryptosporidium* spp. (gen 18S rDNA), extractos 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 16, 17, 19, controles positivos 1 y 2, control negativo Nested-PCR, control negativo PCR. M = marcador

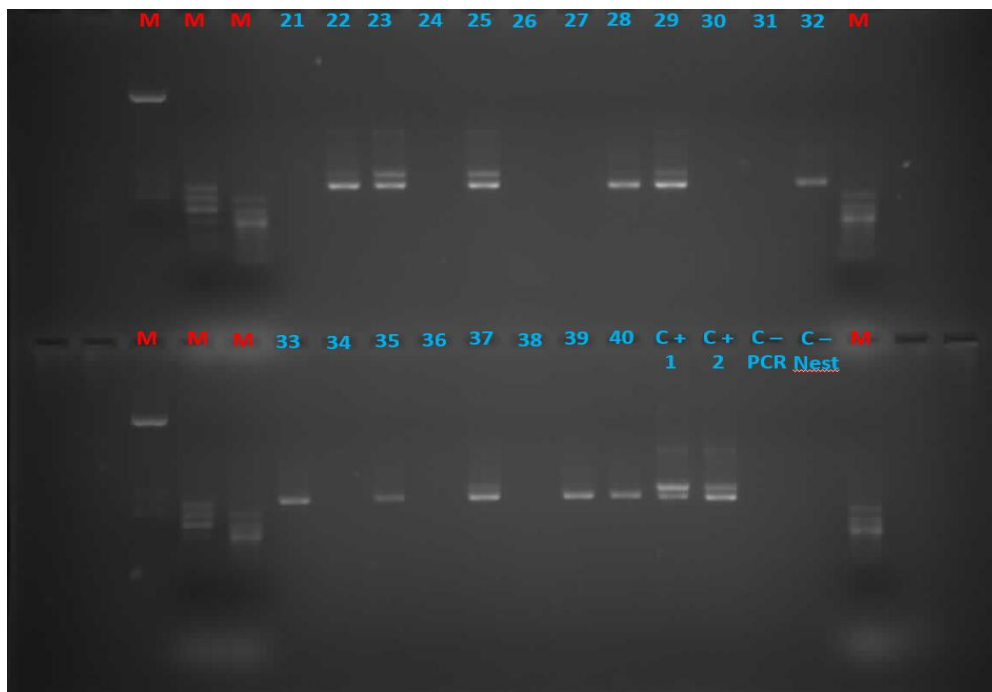


Imagen 7. Nested-PCR *Cryptosporidium* spp. (gen 18S rDNA), extractos 21-40, controles positivos 1 y 2, control negativo PCR, control negativo Nested-PCR. M = marcador

La PCR para el gen COWP, se realizó sobre 20 extractos y en todos ellos se obtuvo un resultado negativo.

Los resultados del diagnóstico de *Cryptosporidium* spp., para ambos genes estudiados, se muestra en la siguiente tabla. (Tabla 10)

Nº EXTRACTO	COLECTIVO	GEN 18S rDNA	GEN COWP
1	Centro acogida	+	-
2	Centro acogida	-	-
3	Centro acogida	+	-
4	Centro acogida	-	-
5	Centro acogida	+	-
6	Centro acogida	-	-
7	Centro acogida	+	-
8	Gatera	+	-
9	Gatera	+	-
10	Gatera	-	-
11	Gatera	-	-
12	Gatera	-	-
13	Centro acogida	-	-
14	Centro acogida	-	-
15	Centro acogida	-	-
16	Centro acogida	-	-
17	Centro acogida	+	-
18	Centro acogida	+	-
19	Centro acogida	-	-
20	Centro acogida	-	-
21	Centro acogida	-	
22	Centro acogida	+	
23	Centro acogida	+	
24	Centro acogida	-	
25	Centro acogida	+	
26	Centro acogida	-	
27	Centro acogida	-	
28	Centro acogida	+	
29	Centro acogida	+	
30	Gatera	-	
31	Gatera	-	
32	Gatera	+	
33	Gatera	+	
34	Gatera	-	
35	Gatera	+	
36	Gatera	-	
37	Gatera	+	
38	Gatera	-	
39	Gatera	+	
40	Gatera	+	

Tabla 10. resultado observado para *Cryptosporidium* spp., en los diferentes genes estudiados: “+” (resultado positivo), “-“ resultado negativo), y “Sombreado” (técnica no realizada).

2. SECUENCIACIÓN

Las muestras de DNA purificadas de *Giardia* spp. (n=27) y *Cryptosporidium* spp. (n=19), se remitieron a la compañía (BMR genomics, Padova, Italia) para su secuenciación. En las muestras de *Giardia* spp., se obtuvieron secuencias nucleotídicas de los genes de la beta-giardina (n=14), de la *tpi* (n=2), o de ambos simultáneamente (n=10); mientras que en las muestras de *Cryptosporidium* spp., se recibieron secuencias del gen de la 18S rDNA (n=17). Una secuencia de *Giardia* spp. (gen beta-giardina) y dos de *Cryptosporidium* spp., resultaron defectuosas.

Del total de secuencias recibidas para el gen beta-giardina, 13 fueron asignadas como genotipo F, y una como genotipo A; mientras que, las dos secuencias para el gen de la *tpi*, fueron asignadas como genotipo A. De las 10 secuencias que se recibieron para ambos genes, 8 fueron asignadas como genotipo F, mientras que dos fueron asignadas como genotipo F (según la secuencia de la beta-giardina) y como A (según la secuencia de la *tpi*).

Los genotipos observados para ambos genes, se resumen en la tabla Tabla 11.

En el caso de *Cryptosporidium* spp., todas las secuencias nucleotídicas recibidas fueron calificadas como la especie *Cryptosporidium felis*.

3. BASE DE DATOS DE SECUENCIAS GENÉTICAS

Las secuencias obtenidas de ambos genes amplificados para *Giardia* spp., fueron introducidas en la base de datos Gen Bank, y se compararon con otras secuencias registradas, en base al parámetro “porcentaje de identidad”.

Para el gen de la beta-giardina, en las 23 secuencias asignadas como genotipo F se identificaron similitudes con las referencias EU769219 (n=11), AF647264 (n=11) y KX960413 (n=1), mientras que la asignada como genotipo A, presentó similitud con la referencia GQ329671 (n=1).

Para el gen *tpi*, todas las secuencias asignadas como genotipo F, presentaron similitud con la secuencia identificada como KU378636 (n=8). Las otras secuencias señaladas como genotipo A, presentaron un alto porcentaje de identidad con la referencia KM190791 (n=4).

Nº EXTRACTO	COLECTIVO	GEN beta-giardina	GEN <i>tpi</i>
1	Centro acogida	Genotipo F (EU769219)	
2	Centro acogida	Genotipo F (AF647264)	
3	Centro acogida	Producto defectuoso	
4	Centro acogida	Genotipo F (AF647264)	
5	Centro acogida	Genotipo F (AF647264)	
7	Centro acogida	Genotipo F (AF647264)	
8	Gatera	Genotipo F (EU769219)	Genotipo F (KU378636)
9	Gatera	Genotipo F (EU769219)	Genotipo F (KU378636)
10	Gatera	Genotipo F (EU769219)	
21	Centro acogida	Genotipo F (AF647264)	Genotipo F (KU378636)
22	Centro acogida	Genotipo F (AF647264)	
23	Centro acogida	Genotipo F (AF647264)	Genotipo F (KU378636)
24	Centro acogida	Genotipo F (AF647264)	Genotipo A (KM190791)
25	Centro acogida	Genotipo F (KX960413)	Genotipo A (KM190791)
26	Centro acogida		Genotipo A (KM190791)
27	Centro acogida		Genotipo A (KM190791)
29	Centro acogida	Genotipo A (GQ329671)	
30	Gatera	Genotipo F (AF647264)	Genotipo F (KU378636)
31	Gatera	Genotipo F (AF647264)	
32	Gatera	Genotipo F (AF647264)	
33	Gatera	Genotipo F (EU769219)	
34	Gatera	Genotipo F (EU769219)	
35	Gatera	Genotipo F (EU769219)	
36	Gatera	Genotipo F (EU769219)	
38	Gatera	Genotipo F (EU769219)	Genotipo F (KU378636)
39	Gatera	Genotipo F (EU769219)	Genotipo F (KU378636)
40	Gatera	Genotipo F (EU769219)	Genotipo F (KU378636)

Tabla 11. Genotipos de *Giardia* spp. observados en los diferentes genes estudiados.

Estudio bienestar: evaluación de parámetros de bienestar y determinación de cortisol y/o sus metabolitos en heces

1. CUANTIFICACIÓN DE FGM

Se seleccionaron un total de 330 muestras de heces de gato correspondientes a centros de acogida (n=107), gateras (n=91), colonias felinas (n=84), y criaderos (n=48). Dado que en algunas no se pudo completar el proceso de extracción (n=10), o no pudieron ser interpretadas mediante el inmunoensayo (n=6); se analizaron 314, de las cuales 98 procedían de centros de acogida, 89 de gateras, 76 muestras de colonias felinas, y 39 de criaderos.

El muestreo complementario se llevó a cabo en 202 muestras, recogidas en los mismos centros que el primer muestreo: 100 muestras procedían de centros de acogida, 46 de gateras, y 56 de colonias felinas. El número total de muestras analizadas fue 180, de las cuales 87 procedían de centros de acogida, 45 de gateras; y 48 muestras de colonias felinas. La cuantificación de los niveles hormonales tampoco se pudo llevar a cabo en el total de muestras, debido a problemas en el proceso de extracción (n=20), o a errores en el inmunoensayo (n=2).

2. EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE BIENESTAR

La frecuencia de detección de los parámetros de bienestar, para el muestreo conjunto, se ilustran en la siguiente tabla. (Tabla 12)

	CONFINAMIENTO			PRESENCIA DE PERROS			CAMBIOS EN LA POBLACIÓN		ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL	
	0	1	2	0	1	2	0	2	0	2
CENTROS DE ACOGIDA (n=207)	161 (33%)	192 (40%)	131 (27%)	0	164 (79%)	43 (21%)	43 (21%)	164 (79%)	164 (79%)	43 (21%)
GATERAS (n=137)	0	76 (37%)	131 (63%)	137 (100%)	0	0	42 (31%)	95 (69%)	82 (60%)	55 (40%)
COLONIAS FELINAS (n=140)	140 (100%)	0	0	61 (44%)	79 (57%)	0	130 (93%)	10 (7%)	140 (100%)	0
CRIADEROS* (n=48)	48 (100%)	0	0	48 (100%)	0	0	48 (100%)	0	48 (100%)	0

Tabla 12. Frecuencia de los parámetros de bienestar, en cada colectivo. Muestréos 1+2.

*Los valores observados en criaderos, corresponden al muestreo 1.

El análisis de los parámetros de bienestar, ya sea en los dos muestreos analizados por separado como la media de ambos, se detectó una relación estadísticamente significativa, tanto entre la presencia de perros ($P=0.05$) como el grado de confinamiento ($P=0.04$), y los niveles de FGM. En cambio, no se detectó esta asociación positiva entre los otros dos parámetros de bienestar analizados (cambios en la población y enriquecimiento ambiental), y la concentración hormonal ($P > 0.05$).

3. COMPARACIÓN DE LAS DIFERENTES VARIABLES

3.1. COMPARACIÓN NIVELES DE FGM – TIPO DE COLECTIVO

- **MUESTREO 1:** Los colectivos donde se encontraron niveles más altos de cortisol, o sus metabolitos, fueron los criaderos. Los valores medios de concentración de FGM, en cada colectivo, fueron: centros de acogida (49.384 ng/g), gateras (39.889 ng/g), colonias felinas (37.293 ng/g), y criaderos (54.433 ng/g). Los valores obtenidos en centros de acogida y criaderos fueron significativamente más elevados que en gateras ($P=0.0021$) y colonias felinas ($P=0.003$). Sin embargo, no se establecía tal asociación entre los centros de acogida y los criaderos ($P > 0.05$). (Figura 4)

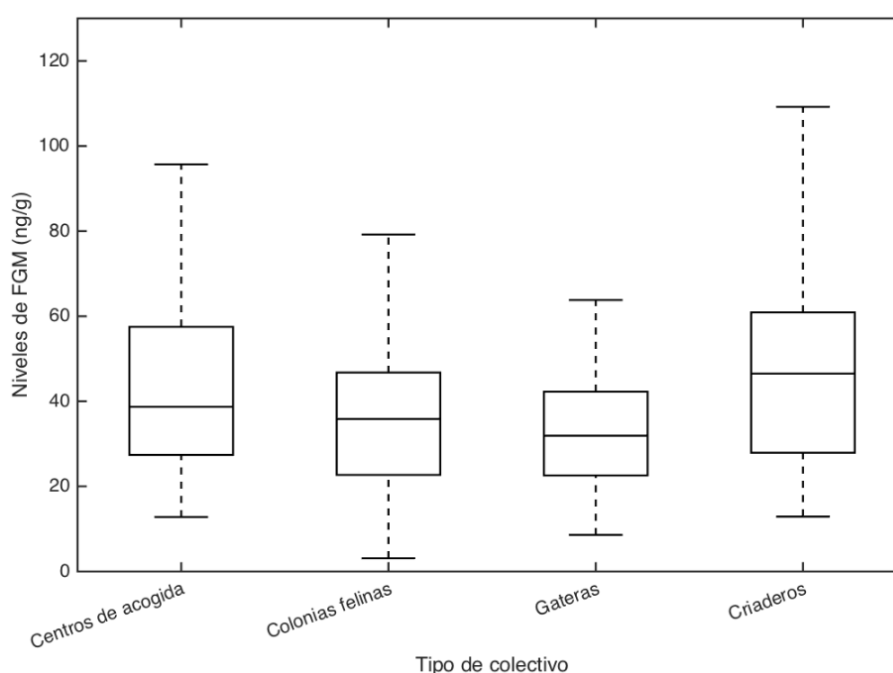


Figura 4. Boxplot que muestra la distribución de los niveles de FGM (ng/g) en los diferentes colectivos.

Muestreo 1

- **MUESTREO 2:** En el segundo muestreo, los valores medios de concentración hormonal fueron: centros de acogida (22.260 ng/g), gateras (20.802 ng/g), y colonias felinas (18.850 ng/g). Los centros de acogida mostraron niveles significativamente más elevados en comparación a las colonias felinas ($P=0.0467$). Sin embargo, no se detectó una asociación estadística entre los centros de acogida, y las gateras ($P > 0.05$) (Figura 5)

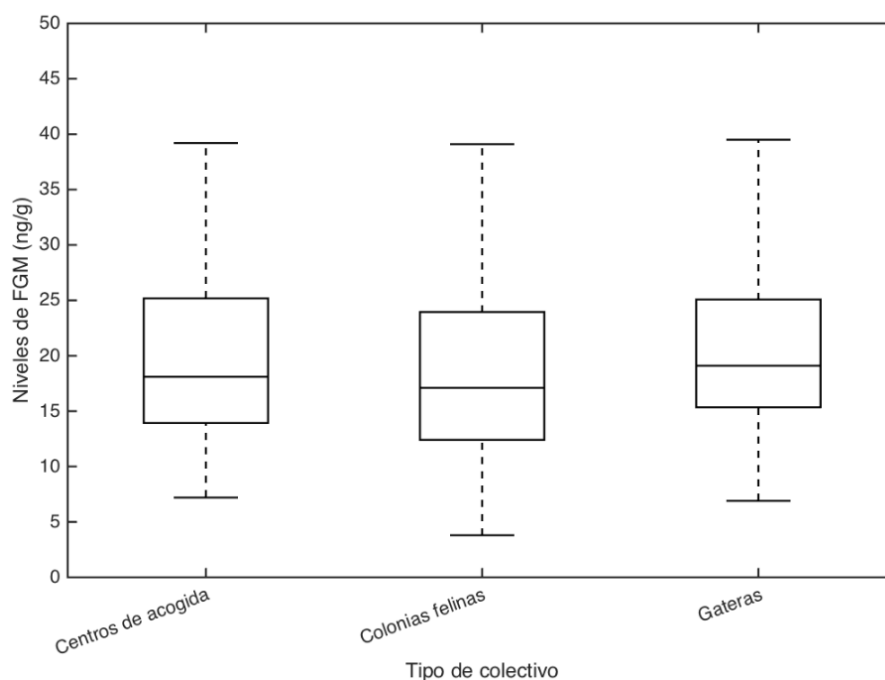


Figura 5. Boxplot que muestra la distribución de los niveles de FGM (ng/g) en los diferentes colectivos.
Muestreo 2

- **MEDIA MUESTREOS 1+2:** Analizando juntos los valores de ambos muestreos, los valores de concentración hormonal son: centros de acogida (36.628 ng/g), gateras (33.479 ng/g) y colonias felinas (30.154 ng/g). Así, se observaron diferencias significativas comparando los niveles hormonales entre los centros de acogida y las colonias felinas ($P < 0.001$) o las gateras ($P < 0.001$) (Figura 6)

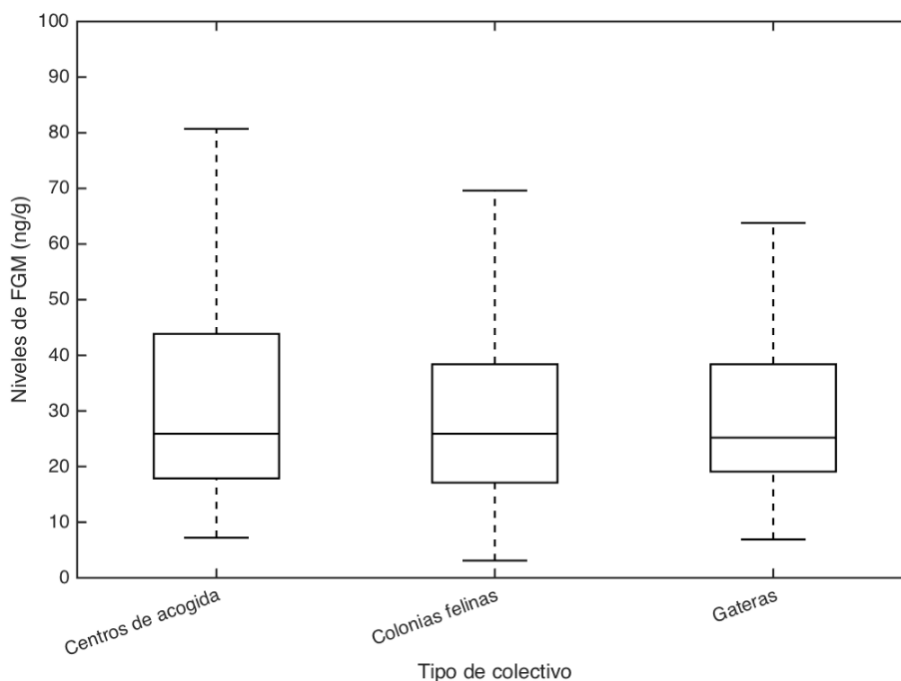


Figura 6. Boxplot que muestra la distribución de los niveles de FGM (ng/g) en los diferentes colectivos.

Media muestreos 1+2

3.2. COMPARACIÓN NIVELES DE FGM – INFECCIÓN PARASITARIA

- MUESTREO 1: Los niveles medios de metabolitos de cortisol fecal, en individuos parasitados y no parasitados fueron 43.440 ng/g y 45.155 ng/g, respectivamente. No se detectó una relación estadísticamente significativa entre la prevalencia de infección parasitaria y la concentración de cortisol, o sus metabolitos ($P > 0.05$). Analizando los colectivos por separado, se obtuvieron los siguientes valores para individuos con infección parasitaria, y no infectados: centros de acogida (48.862 ng/g y 51.300 ng/g, respectivamente), gateras (38.468 ng/g y 40.445 ng/g, respectivamente), colonias felinas (36.584 ng/g y 39.752 ng/g), y criaderos (57.3500 ng/g y 53.680 ng/g). De la misma manera, no se detectó una asociación positiva, comparando estas variables en los diferentes colectivos ($P > 0.05$). (Tabla 13)

	CENTROS DE ACOGIDA	GATERAS	COLONIAS FELINAS	CRIADEROS	TOTAL
Infección	48.862	38.468	36.584	57.3500	43.440
No infección	51.300	40.445	39.752	53.680	45.155
<i>P</i> valor	<i>P</i> > 0.05	<i>P</i> > 0.05	<i>P</i> > 0.05	<i>P</i> > 0.05	<i>P</i> > 0.05

Tabla 13. Concentración media de FGM (ng/g), en muestras infectadas y no infectadas, en los diferentes colectivos (Muestreo 1).

- **MUESTREO 2:** Los niveles medios de metabolitos de cortisol fecal, en individuos parasitados y no parasitados fueron 19.525 ng/g y 22,353 ng/g, respectivamente. No se detectó una relación estadísticamente significativa entre la prevalencia de infección parasitaria y la concentración de cortisol, o sus metabolitos ($P > 0.05$). Los valores para individuos parasitados y no parasitados, en los diferentes colectivos fueron: centros de acogida (19.363 ng/g y 24.030 ng/g, respectivamente), gateras (20.104 ng/g y 21.412 ng/g, respectivamente), y colonias felinas (19.312 ng/g y 17.820 ng/g, respectivamente). En este caso, tampoco se detectó una asociación positiva, comparando estas variables en los diferentes colectivos ($P > 0.05$) Tabla 14.

	CENTROS DE ACOGIDA	GATERAS	COLONIAS FELINAS	TOTAL
Infección	19.363	20.104	19.312	19.525
No infección	24.030	21.412	17.820	22.353
<i>P</i> valor	<i>P</i> > 0.05	<i>P</i> > 0.05	<i>P</i> > 0.05	<i>P</i> > 0.05

Tabla 14. Concentración media de FGM (ng/g), en muestras infectadas y no infectadas, en los diferentes colectivos (Muestreo 2).

- **MEDIA MUESTREOS 1+2:** Los animales parasitados mostraron una concentración media de niveles hormonales de 35.312 ng/g, mientras que los no infectados de 35.772 ng/g; y no se observaron diferencias estadísticas. En los diferentes colectivos se presentaron los siguientes valores medios de infectados y no infectados: centros de acogida (40.012 ng/g y 31.666 ng/g, respectivamente), gateras (30.084 ng/g y 35.254 ng/g, respectivamente), y colonias felinas (30.391 ng/g y 29.471 ng/g, respectivamente). En los centros de acogida se observaron diferencias significativas respecto al resto de colectivos ($P=0.03$). (Tabla 15)

	CENTROS DE ACOGIDA	GATERAS	COLONIAS FELINAS	TOTAL
Infección	40.012	30.084	30.391	35.312
No infección	31.666	35.254	29.471	35.772
<i>P</i> valor	<i>P</i> =0.03	<i>P</i> > 0.05	<i>P</i> > 0.05	<i>P</i> > 0.05

Tabla 15. Concentración media de FGM (ng/g), en muestras infectadas y no infectadas, en los diferentes colectivos (Muestreo 1+2).

3.3. COMPARACIÓN NIVELES DE FGM – TIPO DE PARÁSITO

- **MUESTREO 1:** Los niveles hormonales en individuos infectados y no infectados, por protozoos fueron (50.185 ng/g y 34.480 ng/g, respectivamente), existiendo una relación significativa entre concentración hormonal e infección protozoaria ($P=0.0018$). Para cada colectivo, en individuos infectados y no infectados por protozoos, se recogieron los siguientes resultados: centros de acogida (57.237 ng/g y 39.747 ng/g, respectivamente), gateras (41.735 ng/g y 39.454 ng/g, respectivamente), colonias felinas (38.861 ng/g y 36.478 ng/g, respectivamente); y criaderos (57.350 ng/g y 53.680 ng/g, respectivamente). En todos los colectivos, se detectaron niveles hormonales más altos en animales infectados por protozoos, pero sólo en los centros de acogida la diferencia fue significativa ($P < 0.001$). (Tabla 16)

	CENTROS DE ACOGIDA	GATERAS	COLONIAS FELINAS	CRIADEROS	TOTAL
Infección protozoaria	57.237	41.735	38.861	57.350	50.185
No infección	39.747	39.454	36.478	53.680	34.480
<i>P</i> valor	<i>P</i> < 0.001	<i>P</i> > 0.05	<i>P</i> > 0.05	<i>P</i> > 0.05	<i>P</i> =0.0018

Tabla 16. Concentración media de FGM (ng/g), en muestras infectadas, y no infectadas por protozoos, en los diferentes colectivos (Muestreo 1).

Por otra parte, individuos infectados y no infectados, por helmintos, mostraron valores de 39.073 ng/g y 49.323 ng/g, respectivamente. En este caso, los niveles de metabolitos de cortisol fecal fueron significativamente más bajos en animales infectados por helmintos que en aquellos que no lo estaban. Para cada colectivo, en animales infectados y no infectados,

por helmintos, se detectaron los siguientes valores: centros de acogida (45.202 ng/g y 52.269 ng/g, respectivamente), gateras (28.881 ng/g y 41.442 ng/g, respectivamente), colonias felinas (36.180 ng/g y 39 ng/g, respectivamente). En los criaderos no se detectaron infecciones parasitarias provocadas por helmintos. No se observó una asociación positiva entre estos parámetros en los diferentes colectivos ($P > 0.05$) (Tabla 17)

	CENTROS DE ACOGIDA	GATERAS	COLONIAS FELINAS	TOTAL
Infección por helmintos	45.202	28.881	36.180	39.073
No infección	52.269	41.442	39	49.323
<i>P</i> valor	$P > 0.05$	$P > 0.05$	$P > 0.05$	$P=0.015$

Tabla 17. Concentración media de FGM (ng/g), en muestras infectadas, y no infectadas por helmintos, en los diferentes colectivos (Muestreo 1).

- **MUESTREO 2:** Los niveles hormonales en individuos parasitados y no parasitados, por protozoos, fueron 19.244 ng/g y 19.905 ng/g, respectivamente. En este caso, no se encontraron diferencias estadísticas entre la parasitación por protozoos y los niveles hormonales. Desglosado para cada colectivo, los niveles hormonales de individuos afectados por protozoos, y no afectados fueron: centros de acogida (21.247 ng/g y 16.066 ng/g, respectivamente), gateras (16.390 ng/g y 24.190 ng/g, respectivamente), y colonias felinas (18.650 ng/g y 20.120 ng/g, respectivamente). En este caso, no hubo diferencias significativas entre los diferentes colectivos. (Tabla 18)

	CENTROS DE ACOGIDA	GATERAS	COLONIAS FELINAS	TOTAL
Infección protozoaria	21.247	16.390	18.650	19.244
No infección	16.066	24.190	20.120	19.905
<i>P</i> valor	$P > 0.05$	$P > 0.05$	$P > 0.05$	$P > 0.05$

Tabla 18. Concentración media de FGM (ng/g), en muestras infectadas, y no infectadas por protozoos, en los diferentes colectivos (Muestreo 2).

En el caso de los individuos infectados, y no infectados por helmintos, mostraron valores de concentración hormonal de 18.890 ng/g y 20.937 ng/g. Al igual que en el anterior muestreo, los niveles de individuos infectados por helmintos eran significativamente más bajos

($P=0.026$) que los no infectados. En los diferentes colectivos, se registraron niveles para animales infectados por helmintos, y no infectados de: centros de acogida (16.475 ng/g y 23.807 ng/g, respectivamente), gateras (22.666 ng/g y 16.688 ng/g, respectivamente), y colonias felinas (18.996 ng/g y 21.120 ng/g, respectivamente). No se detectaron diferencias estadísticas entre los diferentes colectivos (Tabla 19).

	CENTROS DE ACOGIDA	GATERAS	COLONIAS FELINAS	TOTAL
Infección por helmintos	16.475	22.666	18.996	18.890
No infección	23.807	16.688	21.120	20.937
<i>P</i> valor	$P > 0.05$	$P > 0.05$	$P > 0.05$	$P=0.026$

Tabla 19. Concentración media de FGM (ng/g), en muestras infectadas, y no infectadas por helmintos, en los diferentes colectivos (Muestreo 2).

- MEDIA MUESTREOS 1+2: Animales parasitados y no parasitados, por protozoos, mostraron niveles medios de concentración hormonal de 39.398 ng/g y 29.244 ng/g, respectivamente; y se detectó una relación significativa ($P < 0.001$). Para los diferentes colectivos: centros de acogida (45.358 ng/g y 29.025 ng/g, respectivamente), gateras (31.778 ng/g y 27.450 ng/g y 27.450 ng/g, respectivamente), colonias felinas (30.762 ng/g y 30.065 ng/g, respectivamente). El único colectivo que mostró diferencias estadísticamente significativas, en comparación al resto, fueron los centros de acogida ($P < 0.001$) (Tabla 20).

	CENTROS DE ACOGIDA	GATERAS	COLONIAS FELINAS	TOTAL
Infección protozoaria	45.358	31.778	30.762	39.398
No infección	29.025	27.450	30.065	29.244
<i>P</i> valor	$P < 0.001$	$P > 0.05$	$P > 0.05$	$P < 0.001$

Tabla 20. Concentración media de FGM (ng/g), en muestras infectadas, y no infectadas por protozoos, en los diferentes colectivos (Media muestreos 1+2).

En las infecciones por helmintos, se observaron niveles medios de cortisol fecal de 31.359 ng/g, en individuos infectados; y de 41.581 ng/g, en individuos no parasitados. Los niveles hormonales eran significativamente inferiores en animales parasitados por helmintos ($P <$

0.01). En los diferentes colectivos, los niveles hormonales para infectados y no infectados, por helmintos fue: centros de acogida (35.626 ng/g y 45.276 ng/g, respectivamente), gateras (25.639 ng/g y 34.530 ng/g, respectivamente), y colonias felinas (29.678 ng/g y 33.322 ng/g, respectivamente). No se detectaron diferencias estadísticas ($P > 0.05$) (Tabla 21).

	CENTROS DE ACOGIDA	GATERAS	COLONIAS FELINAS	TOTAL
Infección por helmintos	35.626	25.639	29.678	31.359
No infección	45.276	34.530	33.322	41.581
<i>P</i> valor	$P > 0.05$	$P > 0.05$	$P > 0.05$	$P < 0.01$

Tabla 21. Concentración media de FGM (ng/g), en muestras infectadas, y no infectadas por helmintos, en los diferentes colectivos (Media muestreos 1+2).

3.4. COMPARACIÓN NIVELES DE FGM – COINFECCIÓN

- **MUESTREO 1:** Los niveles de cortisol fecal, o sus metabolitos, en individuos con infecciones mixtas y simples fue 45.371 ng/g y 42.040 ng/g, respectivamente. No se detectaron diferencias estadísticas entre coparasitaciones y niveles de cortisol fecal. Estos valores de individuos coinfectados o no, desglosados por cada colectivo fueron: centros de acogida (55.109 ng/g y 44.420 ng/g, respectivamente), gateras (26.928 ng/g y 42.955 ng/g, respectivamente), colonias felinas (40.456 ng/g y 32.579 ng/g, respectivamente), y criaderos (27.850 ng/g y 67.183 ng/g, respectivamente). En este caso, en los centros de acogida se observaron diferencias significativas respecto al resto de colectivos ($P=0.01$) (Tabla 22).

	CENTROS DE ACOGIDA	GATERAS	COLONIAS FELINAS	CRIADEROS	TOTAL
Coinfección	55.109	26.928	40.454	27.850	45.371
Infección simple	44.420	42.955	32.579	67.183	42.040
<i>P</i> valor	$P=0.01$	$P > 0.05$	$P > 0.05$	$P > 0.05$	$P > 0.05$

Tabla 22. Concentración media de FGM (ng/g), en muestras coinfectadas y con infección simple, en los diferentes colectivos (Muestreo 1).

- **MUESTREO 2:** Los niveles de cortisol fecal, o sus metabolitos, en individuos con infecciones mixtas y simples fue 19.589 ng/g y 19.450 ng/g, respectivamente. No se

observaron diferencias estadísticas ($P > 0.05$), tanto entre la prevalencia de infecciones mixtas, en relación a los niveles de cortisol, o sus metabolitos. En los diferentes colectivos, los niveles hormonales en coinfecciones e infecciones simples fueron: centros de acogida (19.136 ng/g y 19.671 ng/g, respectivamente), gateras (21.128 ng/g y 19.592 ng/g, respectivamente), y colonias felinas (19.485 ng/g y 19.025 ng/g, respectivamente). En el análisis de estos parámetros en los diferentes colectivos no se observaron relaciones estadísticamente significativas ($P > 0.05$) (Tabla 23).

	CENTROS DE ACOGIDA	GATERAS	COLONIAS FELINAS	TOTAL
Coinfección	19.136	21.128	19.485	19.589
Infección simple	19.671	19.592	19.025	19.450
<i>P</i> valor	($P > 0.05$)	($P > 0.05$)	($P > 0.05$)	($P > 0.05$)

Tabla 23. Concentración media de FGM (ng/g), en muestras coinfectadas y con infección simple, en los diferentes colectivos (Muestreo 2).

- MEDIA MUESTREOS 1+2: Los niveles de cortisol fecal en individuos con infecciones mixtas fue 35.102 ng/g, mientras que en los individuos con infecciones simples fue 35.492 ng/g. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas. En los diferentes colectivos, coinfectados y no coinfectados, mostraron los siguientes valores: centros de acogida (41.707 ng/g y 38.547 ng/g, respectivamente), gateras (24.028 ng/g y 32.724 ng/g, respectivamente), y colonias felinas (31.821 ng/g y 28.612 ng/g, respectivamente). Ningún colectivo mostró diferencias estadísticas en comparación con los demás (Tabla 24).

	CENTROS DE ACOGIDA	GATERAS	COLONIAS FELINAS	TOTAL
Coinfección	41.707	24.028	31.821	35.102
Infección simple	38.547	32.724	28.612	35.492
<i>P</i> valor	($P > 0.05$)	($P > 0.05$)	($P > 0.05$)	($P > 0.05$)

Tabla 24. Concentración media de FGM (ng/g), en muestras coinfectadas y con infección simple, en los diferentes colectivos (Media muestreos 1+2).

3.5. COMPARACIÓN NIVELES DE FGM – CONSISTENCIA FECAL

- **MUESTREO 1:** Los niveles de cortisol fecal, o sus metabolitos, en muestras clasificadas con consistencias fecales 1-4, y 5-7, fueron de 44.779 ng/g y 42.546, respectivamente. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas. En cada colectivo se registraron los siguientes valores: centros de acogida (48.801 ng/g y 50.842 ng/g, respectivamente), gateras (42.323 ng/g y 32.009 ng/g, respectivamente), colonias felinas (33.713 ng/g y 48.827 ng/g, respectivamente), y criaderos (64.311 ng/g y 32.208, respectivamente). Ningún colectivo mostró diferencias estadísticas en comparación con los demás (Tabla 25).

	CENTROS DE ACOGIDA	GATERAS	COLONIAS FELINAS	CRIADEROS	TOTAL
Consistencias 1-4	48.801	42.323	33.713	64.311	44.779
Consistencias 1-5	50.842	32.009	48.827	32.208	42.546
<i>P</i> valor	<i>P</i> > 0.05	<i>P</i> > 0.05	<i>P</i> > 0.05	<i>P</i> > 0.05	<i>P</i> > 0.05

Tabla 25. Concentración media de FGM (ng/g), en muestras de consistencias fecales 1-4, y 5-7, en los diferentes colectivos (Muestreo 1).

- **MUESTREO 2:** Los niveles de cortisol fecal, o sus metabolitos, en muestras clasificadas como de consistencias fecales 1-4, y 5-7, fueron de 20.365 ng/g y 22.473, respectivamente. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas. En cada colectivo se registraron los siguientes valores: centros de acogida (22.044 ng/g y 22.670 ng/g, respectivamente), gateras (20.978 ng/g y 19.987 ng/g, respectivamente), y colonias felinas (16.778 ng/g y 23.406 ng/g, respectivamente). Ningún colectivo mostró diferencias estadísticas en comparación con los demás (Tabla 26).

	CENTROS DE ACOGIDA	GATERAS	COLONIAS FELINAS	TOTAL
Consistencias 1-4	22.044	20.978	16.778	20.365
Consistencias 1-5	22.670	19.987	23.406	22.473
<i>P</i> valor	<i>P</i> > 0.05	<i>P</i> > 0.05	<i>P</i> > 0.05	<i>P</i> > 0.05

Tabla 26. Concentración media de FGM (ng/g), en muestras de consistencias fecales 1-4, y 5-7, en los diferentes colectivos (Muestreo 2).

- **MEDIA MUESTREOS 1+2:** Los niveles de cortisol fecal, o sus metabolitos, en muestras clasificadas como de consistencias fecales 1-4, y 5-7, fueron de 35.921 ng/g y 34.487, respectivamente. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas. En cada colectivo se registraron los siguientes valores: centros de acogida (36.792 ng/g y 36.270 ng/g, respectivamente), gateras (34.801 ng/g y 28.6937 ng/g, respectivamente), y colonias felinas (27.572 ng/g y 37.272 ng/g, respectivamente). Ningún colectivo mostró diferencias estadísticas en comparación con los demás (Tabla 27).

	CENTROS DE ACOGIDA	GATERAS	COLONIAS FELINAS	TOTAL
Consistencias 1-4	36.792	34.801	27.572	35.921
Consistencias 1-5	36.270	28.693	37.272	34.487
<i>P</i> valor	<i>P</i> > 0.05	<i>P</i> > 0.05	<i>P</i> > 0.05	<i>P</i> > 0.05

Tabla 27. Concentración media de FGM (ng/g), en muestras de consistencias fecales 1-4, y 5-7, en los diferentes colectivos (Media muestreos 1+2).

3. VALIDACIÓN BIOQUÍMICA

Precisión

El CV intraensayo obtenido en las pruebas de validación ha sido 6,00%.

El CV interensayo ha sido 10.6%.

Exactitud

La línea de dilución entre los valores teóricos y los reales muestran una R^2 de 99.07% (Figura 7).

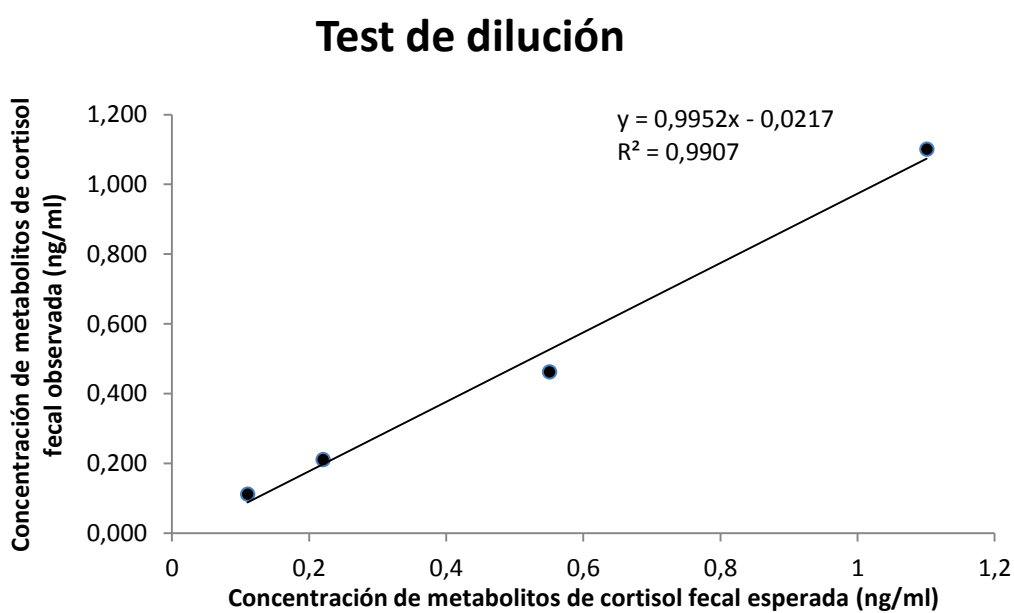


Figura 7. Línea de dilución de los metabolitos de cortisol en extractos fecales

Eficiencia de extracción

El porcentaje de recuperación medio (media \pm desviación estándar) ha sido de $78.31 \pm 9.33\%$.

VI. DISCUSIÓN

Los colectivos animales presentan unas condiciones idóneas para el desarrollo y mantenimiento de infecciones parasitarias (Pesavento and Murphy, 2014), especialmente aquellas que se transmiten por contacto directo, o que se diseminan vía feco-oral (Ortuño and Castellà, 2011). La prevalencia total de infección parasitaria en este estudio fue del 53.2% (497/934). Trabajos previos realizados en diferentes colectivos a nivel mundial, muestran valores que oscilan entre el 7.2% en Canadá, al 100% en Portugal (Serra *et al.*, 2003; Bisset *et al.*, 2009; Coelho *et al.*, 2009; Gracenea *et al.*, 2009; Duarte *et al.*, 2010; Joffe *et al.*, 2011; Khalafalla, R., 2011; Lucio-Forster and Bowman, 2011; Becker *et al.*, 2012; Spada *et al.*, 2013; Khademvatan *et al.*, 2014; Polak *et al.*, 2014; Waap *et al.*, 2014; Hinney *et al.*, 2015; Villeneuve *et al.*, 2015; Ito *et al.*, 2016; Korkmaz *et al.*, 2016; Blasco *et al.*, 2017; Kostopoulou *et al.*, 2017; Szwabe and Blaszkowska, 2017), mientras que en gatos domésticos que viven con sus propietarios, varían del 10% al 39% (Barutzki and Schaper, 2003; Mircean *et al.*, 2011; Itoh *et al.*, 2012; Capári *et al.*, 2013; Beugnet *et al.*, 2014). De acuerdo con Khalafalla, la gran variabilidad de los resultados presentados a nivel mundial puede ser debida a muy diversos factores, entre otros la ubicación geográfica (temperatura y humedad), la estación del año, o los hábitos de las poblaciones felinas locales (Khalafalla, R., 2011). Uno de los objetivos del presente proyecto de tesis doctoral era comparar la prevalencia de parasitosis intestinales y pulmonares en diferentes colectivos felinos. Los resultados obtenidos han mostrado que las colonias felinas presentan una prevalencia de infección más elevada (70.4%, 119/169), los centros de acogida 58.8% (241/410), las gateras 41.4% (127/307), y son los criaderos los que muestran las prevalencias más bajas 20.8% (10/48). Estos valores son similares a los documentados en diversas publicaciones (Serra *et al.*, 2003; Botji *et al.*, 2011; Khalafalla, R., 2011; Lucio-Forster and Bowman, 2011; Becker *et al.*, 2012; Khademvatan *et al.*, 2014; Waap *et al.*, 2014; Villeneuve *et al.*, 2015; Ito *et al.*, 2016; Kostopoulou *et al.*, 2017; Szwabe and Blaszkowska, 2017), donde se obtienen prevalencias entre el 21% y el 91%. Al igual que en nuestro estudio, donde se detectaron índices de prevalencia similares de protozoos y helmintos (30% y 20%, respectivamente), los protozoos más prevalentes son *Giardia* spp. y *Cystoisospora* spp., y, en el caso de los helmintos, se observa sobre todo *Toxocara* spp., y ancilostómidos. Si bien los colectivos tienen en común una serie de características que pueden favorecer la transmisión y mantenimiento de determinadas parasitosis, las diferentes prevalencias obtenidas ponen de manifiesto que son otros muchos los factores que intervienen de una forma directa o indirecta en su presentación, y que habrá que tenerlos en cuenta a la hora de establecer estrategias de control eficientes. Existen diversos estudios en los que se han evaluado los factores de riesgo vinculados a la edad, la raza, el sexo etc. (Tzannes *et al.*, 2008; Zanzani *et al.*, 2014). Sin embargo, con el objetivo de mejorar los programas de control de parasitosis y establecer medidas de control efectivas, en este estudio nos hemos centrado en el análisis de aquellos factores de riesgo que pueden ser eventualmente modificados o alterados para incrementar el éxito en las medidas de control. En concreto, nos hemos centrado en aquellos factores asociados al ambiente y al manejo, puesto que los distintos

tipos de colectivo presentan protocolos también distintos en base al servicio que ofrecen y que van a influir de una forma directa sobre las parasitosis. Ambos factores también influyen sobre el nivel de bienestar del animal. Y, teniendo en cuenta que el estrés juega un rol significativo en la respuesta inmune (Pineda and Dooley, 2003) y, eventualmente, en la prevalencia de infección (Muehlenbein, M., 2006)., se procedió a la determinación de los niveles de estrés fisiológico de los animales, y su relación con las prevalencias de infección observadas.

El diseño experimental se basaba en dos muestreos en diferentes periodos temporales. Cabe recordar que la concentración de FGM registra la producción de esta hormona tras un intervalo que puede oscilar de 6 a 24 horas, en función de la especie animal (Sheriff *et al.*, 2011). Así, una determinada medición por este método, puede reflejar un estímulo estresante que haya tenido lugar recientemente y, por lo tanto, ser un indicador poco fiable de la respuesta de estrés de tipo crónico. De acuerdo con Palme, para estudios que evalúan los niveles de estrés es necesario obtener varias muestras de un mismo individuo (Palme, R., 2005). No obstante, la monitorización de la producción de GC en un periodo de tiempo prolongado no precisa de un riguroso protocolo de muestreo, en cuanto a la frecuencia de recogida de muestras (Möstl and Palme, 2002), a diferencia de la detección de picos hormonales agudos, que requiere la obtención reiterada de muestras. De esta manera, y con el objetivo de soslayar la posible detección de picos de secreción agudos, se llevaron a cabo dos muestreos en dos años distintos.

Las concentraciones de FGM obtenidas en este estudio muestran una gran variabilidad interindividual, en comparación a las reportadas en otras publicaciones (Graham and Brown, 1996; Schatz and Palme, 2001). Incluso, dentro de un mismo colectivo, los niveles pueden ser muy variables. En este aspecto, algunos autores sugieren que existe una gran variabilidad entre individuos, en el funcionamiento básico de los mecanismos de adaptación, así como de respuesta, a los desafíos ambientales (Ramos *et al.*, 2013). De acuerdo con Mormède *et al.*, esta gran variabilidad tiene un origen múltiple, ya sea por factores genéticos, de desarrollo o de experiencias previas (Mormède *et al.*, 2007).

A día de hoy, no se ha consensuado un rango de valores de referencia para las concentraciones de FGM en el gato doméstico y, además, la activación del eje HPA está sujeta a muchos factores fisiológicos o ambientales. En el caso de los colectivos animales, estudios realizados sobre mamíferos sociales, demuestran que el hecho de convivir con otros conespecíficos y mantener relaciones sociales, representa un factor que estimula la activación del eje HPA (Ottawa and Hawkins 2003; Creel *et al.*, 2013; Dettmer *et al.*, 2014). Ottawa y Hawkins, observaron este hecho en el comportamiento de gatos domésticos que residían en colectivos, frente a otros alojados individualmente (Ottawa and Hawkins; 2003). La misma observación la apuntan Creel *et al.*, en leones salvajes (Creel *et al.*, 2003). Así, independientemente de la introducción de individuos nuevos o de los cambios en las rutinas, el hecho de residir en un

colectivo y establecer relaciones sociales, puede activar el eje adrenocorticotropo; aunque esta clase de interacciones no suponen una amenaza para su bienestar, dado que los niveles de estrés no son extremos, ni prolongados (Ottawa and Hawkins, 2003). De esta manera, es imposible determinar si un animal está estresado o no, basándose en este parámetro (Ramos *et al.*, 2013). Como alternativa, algunos autores han propuesto, o bien comparar los valores obtenidos con otros documentados en estudios previos (Graham and Brown, 1996), aunque otros autores apuntan que estas comparaciones dentro de la misma especie sólo son posibles siempre y cuando se haya llevado a cabo exactamente el mismo método de cuantificación (incluyendo el proceso de extracción) (Millsbaugh and Washburn, 2003; Palme *et al.*, 2012), o bien, relacionar las concentraciones observadas con otros factores inherentes del entorno, y documentados como potenciales causantes de estrés en el gato doméstico (Amat *et al.*, 2016).

Centros de acogida y gateras

Los centros de acogida y las gateras son aquellos colectivos encargados de gestionar actividades de recogida-adopción de animales de compañía. La diferencia esencial entre ambos es que, en los primeros, residen perros y gatos, mientras que en los segundos sólo se aceptan gatos. Algunos de estos centros muestreados corren a cargo de instituciones privadas, sin ánimo de lucro, cuya financiación principal proviene de subvenciones, donativos, etc., y cuyo funcionamiento depende en gran parte de la labor que desempeñan los voluntarios. En muchos casos, estas organizaciones están sujetas a limitaciones económicas que resultan en la falta de medios para el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades infecto-contagiosas. Asimismo, a menudo eran administradas por personal poco avezado en protocolos higiénicos y/o manejo de estas enfermedades.

Antes de ser incorporados en el recinto, los gatos pasaban por un período de cuarentena, y solo se introducían aquéllos con estatus FIV/FeLV, negativo. Las instalaciones eran principalmente de cemento, aunque algunas combinaban con una sección de tierra. El personal, normalmente voluntarios, retiraba las deposiciones cada día, y renovaba la sepiolita cada cinco días, aproximadamente. La desinfección se llevaba a cabo a días alternos. En la mayoría de centros de acogida muestreados, todos los animales eran desparasitados una o dos veces al año, mientras que, en gateras, la mayoría desparasitaba cada tres meses. En ambos colectivos se administraba tratamiento antiparasitario puntual, si algún individuo mostraba signos de diarrea.

El grupo de parásitos más prevalente en ambos colectivos fueron los protozoos (41%, 69/410, en centros de acogida; y 31%, 95/307, en gateras). Los protocolos antiparasitarios llevados a cabo se basaban en la administración a dosis única de antihelmínticos de amplio espectro. Esta

estrategia terapéutica resulta efectiva contra los helmintos, pero es insuficiente para eliminar los protozoos, que requieren de otros principios activos y/o tratamientos más prolongados (Gruffydd-Jones *et al.*, 2013a). Este aspecto podría explicar la elevada prevalencia de protozoos observada, en comparación a la infección por helmintos.

En estos colectivos, el principal material utilizado en las bandejas de deposición era la sepiolita (n=568), en la cual se detectó un 50% (285/568) de prevalencia, por detrás del serrín (70%, 24/34), y la tierra (76%, 39/51). Este material se caracteriza por sus propiedades higroscópicas, que favorecen la desecación del material fecal, con el consecuente deterioro de las formas de transmisión parásita. No obstante, las bandejas de deposición son concurridas por diferentes individuos quienes, además, se introducen en el interior y remueven el contenido, entrando en contacto con estas formas de transmisión y, posiblemente, contribuyendo a su diseminación por el recinto. Adicionalmente, en estos areneros se mantiene un cierto grado de humedad procedente de la orina (Dubey *et al.*, 2011).

La especie más comúnmente detectada fue *Giardia* spp. (24%, 98/410, en centros de acogida; y 27%, 84/307, en gateras). En otros estudios realizados en el mismo tipo de colectividades felinas, se obtuvieron valores de prevalencia similares (39%, 12.4% y 11.5%) (Bisset *et al.*, 2009; Hinney *et al.*, 2015; Kostopoulou *et al.*, 2017). La presencia de *Giardia* spp. no siempre se asocia con sintomatología clínica en los carnívoros domésticos (Thompson, R., 2004), sin embargo, casos de giardiasis clínica en gatos se notifican habitualmente en colectividades felinas, donde los efectos de la sobrepoblación y el confinamiento, entre otros, puede generar estrés y exacerbar la sintomatología (Mircean *et al.*, 2011). En el presente estudio se observó que, del total de gatos infectados por *Giardia* spp. y que presentaban consistencias fecales de 5-7, aproximadamente un 50% (35/68) pertenecía a centros de acogida, y un 40% (38/68) a gateras. De acuerdo con los protocolos de actuación en estos centros, en ocasiones, son desparasitados aquellos animales que presentan signos gastrointestinales. Sin embargo, un elevado porcentaje de los gatos infectados presentaba consistencias de 1-4 (44%, 48/110, en centros de acogida; y 38%, 42/110, en gateras). Este aspecto, pone de manifiesto la existencia de individuos que actúan como portadores asintomáticos, que pasan clínicamente desapercibidos y, a menudo, no son sometidos a ningún tratamiento y, en consecuencia, contribuyen de manera significativa a la diseminación del parásito.

Por otra parte, los quistes de *Giardia* spp. son infectivos una vez son eliminados vía fecal. En este aspecto, son especialmente importantes los protocolos de limpieza y desinfección. La retirada inmediata de las heces es un buen método para reducir el riesgo de transmisión feco-oral, sin embargo, el tiempo que transcurre entre la deposición y la recogida, es tiempo suficiente para provocar una nueva infección. Además, los quistes son capaces de mantenerse infectivos largos periodos de tiempo, dada su elevada resistencia a las condiciones ambientales.

Aunque el riesgo de transmisión zoonótica sigue siendo objeto de debate entre la comunidad científica (Cacciò and Ryan., 2008; Ballweber *et al.*, 2010; Bowman and Lucio-Forster, 2010; Inpankaew *et al.*, 2014), se conoce que tanto perros como gatos pueden albergar los genotipos zoonóticos (A y B) y, por lo tanto, pueden actuar como fuente de infección para los humanos. De acuerdo con los resultados obtenidos en nuestro estudio molecular, en 5 muestras procedentes de centros de acogida, se detectó el genotipo A. Otras publicaciones anteriores ya detectaron ambos genotipos zoonóticos en colectivos felinos (Papini *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2016), a nivel mundial. En España, al igual que se ha documentado en este proyecto, Dato *et al.*, y Gil *et al.*, también detectaron el genotipo A en refugios de gatos (Dato *et al.*, 2012; Gil *et al.*, 2017). Es importante destacar que, a pesar de los resultados observados, no se puede confirmar al 100% la presencia del genotipo zoonótico, debido a algunas inconsistencias obtenidas en la secuenciación de ciertos extractos (Tabla 11). Es el caso de dos extractos asignados como genotipo A, únicamente por el gen *tpi*; y de otros dos que fueron asignados como genotipo F, según el gen beta-giardina, y como genotipo A, de acuerdo con la secuenciación del gen *tpi*. Estas variaciones de los resultados en los diferentes genes, ya habían sido observadas en otros estudios de genotipado de *Giardia* spp. Read *et al.*, por ejemplo, notificaron un 25% de diferencias entre la secuenciación del gen *gdh*, en comparación al 18S rDNA (Read *et al.*, 2004; Cacciò and Ryan, 2008; Sommer *et al.*, 2018). Los autores sugieren que este fenómeno puede ser debido a la presencia de una coinfección entre dos genotipos diferentes, de los cuales uno es amplificado preferentemente, para un determinado gen. Gelanew *et al.*, tras los resultados observados en un estudio en 59 personas, y donde detectaron tres individuos infectados con el genotipo F, proponen otra explicación, basándose en el elevado porcentaje de homología (98%) que comparten los genotipos A y F, para el gen de la beta-giardina (Gelanew *et al.*, 2007).

De este modo, el hecho de detectar un genotipo zoonótico en un gen y, al mismo tiempo, un genotipo específico de especie en otro, no es infrecuente (Cacciò and Ryan., 2008). De acuerdo con Sprong *et al.*, sería necesario detectar un genotipo zoonótico en tres genes distintos (beta-giardina, *gdh*, o *tpi*, por ejemplo), para confirmar su potencial zoonótico (Sprong *et al.*, 2009). Así, con los resultados obtenidos en este trabajo, no se puede afirmar con seguridad que los gatos estudiados estén infectados con genotipos de *Giardia* spp. potencialmente zoonóticos, aunque tampoco hay que descartar las posibles infecciones mixtas, entre genotipos zoonóticos y especie-específicos. Cabe mencionar en este sentido que, dado que el genotipo A se detectó exclusivamente en muestras procedentes de centros de acogida, se puede conjeturar que se haya producido una contaminación cruzada entre parásitos de las instalaciones de perros y gatos, puesto que los cánidos también pueden hospedar este genotipo zoonótico. Por otra parte, en ninguno de los extractos analizados se observaron los genotipos específicos del perro (C y D).

En los centros de acogida, también se detectó la mayor prevalencia de *Cryptosporidium* spp. (3.7%, 15/410). Sin embargo, se puede considerar que la prevalencia de infección por este coccidio, en el presente estudio, está subestimada. El reducido tamaño de los ooquistes dificulta su identificación mediante métodos de flotación convencionales, por lo que se requieren otro tipo de técnicas, como IFA o PCR (Scorza and Tangtrongsup, 2010). Dado que estas técnicas no se pudieron realizar en el total de muestras (n=934), es posible que la prevalencia observada sea menor que la real. En cuanto a las especies de *Cryptosporidium* detectadas, en las 17 muestras secuenciadas se reveló la infección por *C. felis*. De todas ellas, 11 mostraban consistencias fecales de 5-7. En humanos, se considera que el riesgo de contraer la enfermedad provocada por esta especie es relativamente bajo (Gil *et al.*, 2017), sin embargo, puede suponer un riesgo en sujetos con el sistema inmunitario comprometido, sobre todo, aquéllos positivos al HIV, o individuos jóvenes. En estos colectivos de riesgo, se ha documentado que la parasitación por *C. felis* puede desarrollar un cuadro clínico (Lucio-Forster *et al.*, 2010).

El coccidio de ciclo directo, *Cystoisospora* spp., fue detectado en prevalencias del 20% (83/410) en centros de acogida, mientras que en gateras sólo se observó un 5% (15/307). Estos coccidios son especialmente prevalentes en individuos jóvenes, y la frecuencia de infección disminuye con la edad (Gow *et al.*, 2009), afectando sobre todo a animales inmunodeprimidos (Tzannes *et al.*, 2008; Petry *et al.*, 2011). En este sentido cabe mencionar que, en nuestro estudio, todos los gatos muestreados eran individuos adultos. La principal vía transmisión de estos protozoos se produce por la ruta feco-oral, pero también se puede adquirir por la ingestión de hospedadores paraténicos. Es importante tener en cuenta que la fuente de alimentación de estos gatos es el pienso comercial. Sin embargo, no se puede descartar que la infección se haya producido a partir de la depredación de hospedadores paraténicos, especialmente roedores, puesto que su presencia en este tipo de instalaciones es posible. De todas maneras, en estos colectivos, tampoco se puede descartar que dicha prevalencia de infección se relacione con un componente inmunitario. La coccidiosis clínica se relaciona con situaciones de inmunodepresión (Bowman *et al.*, 2002; Pallant *et al.*, 2015). Por un lado, en las muestras analizadas se observaron, de manera general, mayor número de ooquistes por campo microscópico, sugiriendo una carga parasitaria más elevada. Por el otro, en los centros de acogida se determinó que un 30% (17/57) de las muestras parasitadas por *Cystoisospora* spp., presentaban una consistencia fecal de 5-7, mientras que, en las gateras, todas las muestras donde se detectaron estos coccidios se clasificaron con una consistencia fecal de 1-4. En la epidemiología de las infecciones parasitarias, la severidad del cuadro clínico y, por tanto, la presencia de sintomatología, es directamente proporcional a la carga parasitaria (Cordero del Campillo, 1999).

En los centros de acogida también se notificaron elevados índices de coinfección, siendo significativamente más altos que en gateras. De acuerdo con Petney *et al.*, el sistema

inmunitario juega un papel relevante en la prevalencia de infecciones concomitantes (Petney *et al.*, 1998), de tal manera que aquellos individuos inmunocomprometidos serán más susceptibles de albergar, simultáneamente, diversas especies de parásitos. En el estudio de Pallant *et al.*, donde estudiaban la prevalencia de parásitos intestinales en poblaciones caninas y felinas, se notificó la asociación entre *Giardia* spp. y *Cystoisospora* spp. como la más prevalente en ambas poblaciones (Pallant *et al.*, 2015), afectando especialmente a individuos menores de 1 año de edad, siendo esta relación estadísticamente significativa para los perros. En los gatos, no se pudo llevar a cabo el análisis estadístico, por el reducido tamaño muestral.

En los centros de acogida y gateras, se observó mayor prevalencia de coinfecciones entre diferentes protozoos, *Giardia* spp. y *Cystoisospora* spp. (n=23), y, *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. (n=7), las más frecuentes. Estas asociaciones se documentaron como las más comunes en otros estudios realizados en felinos domésticos (Vasilopoulos *et al.*, 2006; Ito *et al.*, 2016). Concretamente, Vasilopoulos *et al.*, detectaron que un 83% de los gatos eliminaban simultáneamente quistes de *Giardia* spp. y ooquistes de *Cryptosporidium* spp. Estos autores sugirieron que podía existir una interacción positiva entre uno y otro protozoo, proponiendo la hipótesis de que los trofozoítos de *Giardia* spp. dañaban la superficie del epitelio intestinal, facilitando la invasión del coccidio (Vasilopoulos *et al.*, 2006). Este hecho podría hacerse extensivo a la colonización por parte de *Cystoisospora* spp., ya que estos agentes también son de localización intracelular (Dubey *et al.*, 2014). También se observó la infección mixta entre *Giardia* spp. y *Trichostrongylus axei* spp. (n=5), pero en este caso, la asociación puede responder a un patrón ecológico ya que, aunque ambos protozoos son de localización extracelular, *Giardia* spp. tiene predilección por el intestino delgado, mientras que *Trichostrongylus axei* spp. se localiza preferentemente en intestino grueso (Bowman, D., 2013).

Aunque todavía se desconocen con detalle los mecanismos de interacción entre estos protozoos, se han descrito sinergismos entre diferentes especies de parásitos que pueden agravar el cuadro clínico (Cox, F., 2001). En este estudio, sin embargo, se observó la misma proporción de muestras con consistencias de 1-4 y de 5-7, en las coinfecciones entre *Giardia* spp. y *Cystoisospora* spp. o *Cryptosporidium* spp.

Toxocara spp. fue detectado más frecuentemente en los centros de acogida (17%, 71/410). Numerosos estudios que involucran centros de acogida y gateras, han reportado este nematodo con valores de prevalencia por encima de cualquier otro parásito (Gracenea *et al.*, 2009; Lucio-Forster and Bowman, 2011; Becker *et al.*, 2012; Villeneuve *et al.*, 2015; Szwabe and Blaszkowska, 2017). No obstante, cabe apuntar que la identificación de las diferentes especies de *Toxocara* spp. basándose en la morfometría de las formas de transmisión con microscopía convencional, presenta ciertas limitaciones (MacPherson, C., 2013). Fahrion *et al.*, documentaron en un estudio el caso de gatos que eliminaban repetidamente huevos de *T. canis*

en sus deposiciones, tras haber sido trasladados a instalaciones previamente ocupadas por perros (Fahrion *et al.*, 2011). En cualquier caso, tanto *T. canis* como *T. cati* se consideran importantes agentes zoonóticos (Fisher *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2010), ya que ambos son responsables del síndrome conocido como *larva migrans visceralis*. En el ciclo biológico de *Toxocara* spp., las larvas que infectan a un animal adulto o inmunocompetente, tienen la capacidad de realizar una migración somática hasta establecerse en un tejido, en el cual pueden persistir en estado latente durante largos periodos de tiempo (Overgaauw and Knapen, 2013). Así, la infección puede presentarse en gatos adultos, pero es poco probable que se asocie a signos clínicos (Despommier, D., 2003). Además, los tratamientos antihelmínticos a las dosis recomendadas, no son efectivos contra estas larvas somáticas (Epe, C., 2006). En estos animales, la reactivación de las larvas se puede desencadenar como consecuencia de una inmunosupresión, ya sea debida a cambios endocrinos, desajustes inmunitarios, o estrés (Nijse *et al.*, 2016).

Los protocolos de desinfección son especialmente relevantes en el caso de *Toxocara* spp., ya que la estructura de los huevos de estos nematodos, les confiere una elevada resistencia a las condiciones ambientales. De hecho, Morrondo *et al.*, y Verocai *et al.*, demostraron que un porcentaje considerable de huevos de *Toxocara* spp., seguían su desarrollo embrionario tras estar expuestos a compuestos desinfectantes de uso común, como el formaldehído o el cloruro de benzalconio, durante al menos 1 mes (Morrondo *et al.*, 2006; Verocai *et al.*, 2010). Adicionalmente, el segundo autor notificó que la desinfección con lejía (hipoclorito sódico), deformaba los huevos, pero no inhibía el desarrollo larvario, hasta las dos semanas de tratamiento (Verocai *et al.*, 2010).

En 4 muestras procedentes de gateras (1.3%), pudieron ser identificadas cápsulas ovígeras, características de *Dypilidium caninum*. Los valores obtenidos fueron similares a los documentados en otros estudios (0.2% - 5%) (Lucio-Forster and Bowman, 2010; Mircean *et al.*, 2010; Khalafalla, R., 2011; Spada *et al.*, 2013; Khademvatan *et al.*, 2014; Zanzani *et al.*, 2014). Este plathelminto se transmite principalmente por la ingestión de pulgas del género *Ctenocephalides* que alojan el estadio larvario en su interior. De hecho, en estos centros muestreados se notificaron problemas de infestación por estos ectoparásitos. Para los seres humanos, la parasitación por *D. caninum*, puede cursar con sintomatología clínica (Beugnet *et al.*, 2014).

Por último, en uno de los centros de acogida muestreados se detectaron huevos compatibles con cestodos de la familia Diphyllbothridae (0.1%, 1/934). Estos seudofilideos no se distribuyen de manera común en la región mediterránea (Bowman *et al.*, 2002), sin embargo, en dos estudios realizados en colectivos felinos de Italia también se observaron, aunque con bajos valores de prevalencia (1.2% y 1.4%) (Spada *et al.*, 2014; Zanzani *et al.*, 2014). Los dos géneros de importancia veterinaria, integrados en esta familia, son *Diphyllbothrium* y *Spirometra* (Taylor *et al.*, 2016). El primero está ligado a ciclos acuáticos, ya que se transmite por ingestión de peces

infectados con el estadio larvario; mientras que en el segundo participan anfibios, reptiles o roedores, como hospedadores intermediarios (Bowman *et al.*, 2002). En este estudio no se pudo concretar la especie, pero se notificó que en el centro de acogida se incluía pescado crudo en la dieta de los gatos. No obstante, con este hallazgo no se puede confirmar la sospecha, puesto que la especie *Spirometra erinaceieuropae* se distribuye a nivel mundial, y es capaz de parasitar a la especie felina.

Entre los agentes zoonóticos observados en nuestro estudio parasitológico, no se pudo documentar la presencia de *Toxoplasma* spp. La técnica de flotación utilizada permite la concentración de ooquistes de esta especie de coccidio, no obstante, debido al reducido tamaño de éstos (11 - 13 μm), y a su baja tasa de eliminación, son muy difíciles de detectar por microscopía óptica (Esch and Petersen, 2013). Además, en caso de observar estructuras compatibles, sería imposible discernir el tipo de coccidio, ya que otras especies que afectan al gato doméstico, como *Hammondia* spp., o *Sarcocystis* spp., también eliminan ooquistes de estas dimensiones (Vasilopulos *et al.*, 2006). A este aspecto, se le suma el hecho de que la mayor eliminación de ooquistes se produce, generalmente, durante períodos muy cortos (7-21 días) post-infección (Lilly and Worthman, 2013). En general, los estudios epidemiológicos de toxoplasmosis en colectivos felinos se basan en técnicas serológicas para la determinación de anticuerpos frente a *T. gondii*. Para ello, es necesaria la obtención de muestras sanguíneas. Este método precisa de la manipulación de los animales. En nuestro estudio, basado en técnicas de diagnóstico no invasivas, gran parte de los gatos muestreados son de difícil manejo y captura, sobre todo, si son ferales, como la mayoría de los gatos de colonias felinas, por lo que se descartó este tipo de análisis.

La evidencia de la circulación de parásitos con potencial zoonótico, debe considerarse en los centros de acogida y gateras. En primer lugar, por el personal que trabaja en el centro y mantiene un estrecho contacto con los animales y sus deyecciones. Y, en segundo lugar, dado que la adopción o recuperación de estos animales por parte de sus propietarios constituye la principal oportunidad para salir del colectivo, por lo que la presencia de dichas zoonosis podría representar un riesgo de salud pública si no se toman precauciones en el momento de la adopción/cesión o recuperación.

En condiciones de confinamiento, se apuntan respuestas sociales que suponen un desafío para el bienestar animal (Möstl *et al.*, 2013; Broadley *et al.*, 2014). De acuerdo con Finka *et al.*, en gatos domésticos confinados en colectividades, el comportamiento social es variable, y depende principalmente de la densidad de animales y la disponibilidad de alimento (Finka *et al.*, 2014). Cuando se establecen en grupos, forman jerarquías como mecanismo compensatorio para lidiar con la imposibilidad de satisfacer sus necesidades territoriales (Ramos *et al.*, 2012), y pueden

derivar en un incremento de los niveles de agresividad y estrés, que generan enfrentamiento entre individuos. Esta clase de conflictos, también se han descrito como factores que provocan estrés en gatos (Amat *et al.*, 2016).

En el análisis de los parámetros de bienestar del presente estudio, se observaron diferencias significativas entre el grado de confinamiento y los niveles de estrés. En este sentido, se registró que la mayoría de gatos (68/107) en centros de acogida y gateras, residían en una superficie inferior a 1.67 m²/gato (Rochlitz *et al.*, 1999). Rochlitz *et al.*, recogen en un estudio las recomendaciones para un alojamiento aceptable de los gatos de refugios. De acuerdo con estas pautas, los autores apuntan la necesidad de un espacio suficiente para separar adecuadamente las áreas de comida, descanso y deposición y, además, que permita a los trabajadores realizar fácilmente las tareas de limpieza y desinfección. Así, es muy importante conceder un espacio suficiente para que los individuos mantengan una separación entre ellos que les permita reducir la probabilidad de agresión. Pero si el emplazamiento es demasiado pequeño, se puede incrementar el riesgo de contactos agonísticos, por lo que los gatos intentarán evitarse mutuamente disminuyendo su actividad (Rochlitz *et al.*, 1999). Los factores estresantes exclusivos de los ambientes cautivos pueden originarse en la incapacidad de realizar un comportamiento activo, junto con su resultado funcional, es decir, encontrar escondites, escapar de las amenazas, realizar el comportamiento de “grooming”, buscar comida, etc. (Carlstead *et al.*, 1993). Teniendo en cuenta aquellos colectivos en los que el animal se halla confinado, es decir, centros de acogida y gateras, la evaluación de los niveles de FGM mostró que la media de concentración hormonal era más elevada en los centros de acogida que en las gateras, lo que nos sugiere que los niveles de estrés son significativamente más altos en los gatos que viven en centros de acogida. Uno de los aspectos más importantes a tener en cuenta en relación a los centros de acogida, y que lo diferencia del resto de colectivos, en especial de las gateras, es la presencia de perros (Stella and Croney, 2016). Los gatos de este tipo de colectivos mantienen un contacto continuo, ya sea auditivo, visual u olfativo, con perros alojados en el mismo centro constituyendo una de las fuentes más importantes de estrés. Un hallazgo similar ya se documentó en el estudio de McCobb *et al.*, quienes compararon los niveles de cortisol urinario en gatos alojados en dos tipos de centros: unos donde también se alojaban perros, y otros completamente aislados de otras especies. Los autores notificaron niveles hormonales significativamente superiores, en los primeros centros; y lo atribuyeron al estrés generado por el constante sonido de los ladridos (McCobb *et al.*, 2005).

Del mismo modo, en los gatos de centros de acogida se observa una asociación estadísticamente significativa entre los niveles de FGM y la parasitación, de manera que los individuos parasitados presentan niveles de FGM más elevados que los que no lo están. A nivel fisiológico, uno de los efectos conocidos del cortisol, es la reducción de la actividad inmune (McDonald's,

2003), que resulta en una mayor susceptibilidad de contraer enfermedades infecto-contagiosas. De acuerdo con Petney *et al.*, tal hecho podría hacerse extensivo a la probabilidad de contraer coinfecciones, pues una inmunosupresión, también aumenta la probabilidad de contraer infecciones simultáneas por diferentes agentes (Petney *et al.*, 1998). Este principio explicaría por qué en los centros de acogida, los individuos con niveles más elevados de FGM, presentan mayor prevalencia de infección parasitaria. Un estudio anterior sobre chimpancés salvajes, documentó esta relación directamente proporcional, entre infección parasitaria y concentración de FGM (Muehlenbein, M., 2006).

Asimismo, se podría hacer referencia a que la exposición a estímulos estresantes, activa una compleja conexión entre el sistema nervioso central y el sistema nervioso entérico, que puede resultar en una modulación de la cantidad y composición de la microbiota intestinal (Carabotti *et al.*, 2015). Como consecuencia de estas perturbaciones, se puede comprometer el papel inmunomodulador de la microbiota, que acabaría reduciendo la actividad inmune (O'Hara and Shanahan, 2006; Chow *et al.*, 2010).

Los niveles de FGM fueron estadísticamente superiores en aquellos individuos con infección protozoaria, y el colectivo que mostró diferencias significativas respecto al resto, fueron los centros de acogida. Curiosamente, el protozoo más prevalente en los gatos de este tipo de colectivos fue *Giardia* spp. Este protozoo no se considera un patógeno primario (Tysnes *et al.*, 2014) y su patogenia ha sido vinculada a la microbiota intestinal (Bartelt and Sartor, 2015). El mecanismo patógeno no se conoce con detalle, pero se ha sugerido que este protozoo es capaz de provocar cambios cualitativos y cuantitativos en su composición, cambios en su funcionamiento o actividades metabólicas, o bien, cambios en su distribución (Barash *et al.*, 2017). Por otra parte, los estímulos estresantes también pueden inducir cambios cualitativos y cuantitativos en la microbiota comensal, favoreciendo la replicación de *Giardia* spp. en la mucosa intestinal.

Una de las implicaciones clínicas del estrés es la diarrea (Konturek *et al.*, 2011), debido a la comunicación entre los sistemas nerviosos central y entérico, comentada previamente. De esta manera, cabría esperar mayor frecuencia de aparición de heces de consistencias 5-7, en los centros donde se observaron concentraciones hormonales más altas. Sin embargo, en nuestro trabajo no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre el grado de consistencia fecal y los niveles de FGM, de la misma manera que se documentó en el estudio de Andersen *et al.*, (2018), en centros de acogida. De acuerdo con estos autores, la mera presencia de estos patógenos no siempre causa diarrea, y otros factores como estrés, infecciones concurrentes, el estatus inmunológico, la virulencia del patógeno y la carga parasitaria, pueden contribuir con el desarrollo del cuadro clínico (Andersen *et al.*, 2018). En el estudio de McCobb *et al.*, citado anteriormente, y donde comparaban los niveles de cortisol urinario de gatos

alojados en dos tipos de centros, notificaron una asociación estadísticamente significativa entre aquellos animales con concentraciones hormonales más altas, y la presencia de signos clínicos gastrointestinales, como vómitos o diarrea (McCobb *et al.*, 2005).

Colonias felinas

Las colonias felinas son agrupaciones controladas de gatos, localizadas en zonas urbanas o periurbanas, aunque en ocasiones, también se podían encontrar adjuntas a los centros de acogida, como estrategia para el control de poblaciones de roedores. La mayoría de colonias muestreadas eran espacios naturales, sin pavimentos artificiales o áreas delimitadas. De esta manera, el tipo de suelo predominante estaba compuesto de tierra y vegetación. La mayoría de animales en estos colectivos, eran gatos asilvestrados, agrupados de manera controlada tras entrar en el proceso CER, u otros gatos ferales, de origen desconocido que se asentaban en estas colonias. En general, no se llevaban a cabo medidas de higiene o desinfección, salvo en aquellas colonias localizadas alrededor de los centros de acogida que disponían de puntos de defecación controlados -generalmente bandejas- y que eran desinfectadas una vez por semana. Los animales no recibían tratamiento antiparasitario alguno; sólo se habían desparasitado previamente a la liberación tras la castración en el marco del programa CER. En estos casos la desparasitación consistía en la aplicación de un antiparasitario de amplio espectro en dosis única mediante “spot on”.

En estos colectivos fue donde se detectó la prevalencia de parasitosis más elevada (70%, 119/169) y, además, se documentó que más de la mitad de las infecciones estaban producidas por helmintos (58.6%, 99/169). El análisis de los factores de riesgo indicó que la prevalencia de infección era significativamente más alta en superficies de tierra. De acuerdo con Ortuño y Castellà, el tipo de material donde se depositan las heces, puede tener un rol importante en el mantenimiento de algunos agentes parasitarios (Ortuño and Castellà., 2011). En el contexto del presente estudio, este hallazgo se podría explicar por un patrón de comportamiento de los gatos, quienes frecuentemente entierran sus deposiciones y, con ello, crean un clima propicio para la viabilidad de las formas de transmisión y/o el desarrollo de las fases parasitarias inmaduras hacia el estadio infeccioso. Esto permite que se conservan con un cierto grado de humedad, imprescindible para evitar el proceso de desecación, el cual constituye uno de los principales mecanismos dañinos para la supervivencia parasitaria (Stromberg, B., 1997).

Las colonias felinas muestreadas, además, se caracterizan por la carencia de control ambiental. Únicamente en aquéllas anexadas a refugios animales, se retiraban las heces de las bandejas, si las había, y se desinfectaba el material de manera regular. En cambio, en las colonias urbanas y periurbanas, las deposiciones permanecían en el ambiente hasta su descomposición, propiciando así la propagación y mantenimiento de las formas de transmisión parásita. A este déficit de

medidas de control ambiental, hay que sumar el hecho de que los gatos comparten el ecosistema con otras especies animales, potencialmente implicadas en los ciclos de vida de los parásitos observados, ya sea como hospedadores paraténicos o como intermediarios. Todos ellos forman parte de una red trófica, de la cual estos gatos ferales actúan como depredadores mayores.

A pesar de la mayor prevalencia de helmintos, el parásito más comúnmente detectado fue el protozoo *Cystoisospora* spp., 23% (39/169). A diferencia de lo que ocurría en centros de acogida y gateras, en las muestras analizadas se apreciaba, generalmente, un número bajo de ooquistes por campo microscópico. Teniendo en cuenta que una de las vías de infección de este agente es la ingestión de hospedadores paraténicos (Saitoh and Itagaki, 1990; Lappin, M., 2010), incluyendo pequeños roedores o algunos artrópodos, entre otros; se puede sugerir que los porcentajes de prevalencia observados están ligados con los hábitos depredadores de este tipo de gatos (Szwabe and Blaszkowska, 2017), y no a desajustes inmunitarios que hayan desencadenado la multiplicación del coccidio.

De la misma manera, se detectó un porcentaje de prevalencia de *Toxocara* spp. (17%, 29/169) similar al observado en centros de acogida. En este caso, cobran protagonismo los hospedadores paraténicos, entre los que se incluyen roedores, lagomorfos, o aves (Despommier, D., 2003; MacPherson, C., 2013), ya que pueden transmitir las larvas de *Toxocara* spp. cuando son depredados por un gato (Traversa, D., 2012); y la naturaleza de los huevos, los cuales son altamente resistentes a las condiciones medioambientales, y pueden mantenerse infectivos durante meses, o incluso años (Overgaauw and Knapen, 2013; Spada *et al.*, 2013).

Huevos de parásitos ancilostómidos (*Ancylostoma* spp. o *Uncinaria* spp.) fueron detectados en un 11.6% de las muestras (108/934), siendo el nematodo más prevalente, mientras que publicaciones previas en gatos de colectivos lo documentaron en menor frecuencia (1.1% a 4.9%) (Bisset *et al.*, 2009; Lucio-Forster and Bowman, 2010; Becker *et al.*, 2012). Contrariamente, otra publicación sobre colectivos felinos en Brasil mostró que casi el total de los animales (96.1%) presentaban infección por esta familia de helmintos (Coelho *et al.*, 2009). La transmisión de estos parásitos se puede producir por vía oral, con la ingestión de las larvas filariformes, por vía percutánea, cuando éstas atraviesan activamente la piel de sus hospedadores (Capári *et al.*, 2013), o por paratenesis, con la ingestión de hospedadores paraténicos que alberguen la larva infectante (Bowman *et al.*, 2010). En las colonias felinas, donde el sustrato predominante era la tierra, las larvas pueden eludir la desecación descendiendo a estratos más profundos, siguiendo su instinto higrófilo, y mantenerse viables más tiempo (Stromberg, B., 1997). Además, en estos colectivos los gatos tienen acceso a diversas presas que pueden actuar como hospedadores paraténicos. Ambos factores podrían explicar las diferencias observadas entre los valores de prevalencia de las colonias felinas (38%), y los centros de

acogida y gateras (8.5% y 3%, respectivamente). A nivel de salud pública, algunas especies de esta familia de nematodos pueden provocar el síndrome conocido como *larva migrans cutánea* (Traversa, D., 2012). Sin embargo, a partir del análisis morfométrico de los huevos mediante microscopía óptica, es imposible discernir entre las diferentes especies. Por lo tanto, para confirmar si entraña un peligro para los seres humanos, se deberían aplicar métodos de biología molecular, o identificación de larvas mediante claves taxonómicas.

En un 16% (27/169) de las muestras fecales fueron detectadas formas de transmisión de cestodos, en el interior de los cuales se identificaba el embrión hexacante, característico de este grupo de helmintos. Sin embargo, a pesar de las diferencias morfológicas entre los huevos, el análisis mediante microscopía óptica no permite la determinación a nivel de especie (Becker *et al.*, 2012; Molnar *et al.*, 2015;), por lo que se englobaron en la familia Taeniidae, tal y como se documenta en otras publicaciones (Becker *et al.*, 2012; Molnar *et al.*, 2015; Nijssse *et al.*, 2016; Szwabe and Blaszkowska, 2017). El ciclo biológico de estos platihelminths es de tipo heteroxeno, e intervienen roedores que actúan como hospedadores intermediarios. Un estudio epidemiológico en gatos domésticos en Alemania y otros países europeos, documentó una prevalencia de infección por *Taenia taeniaeformis* del 0.34% (37/10.650), y por *Echinococcus multilocularis* del 0.23% (25/10.650) (Dyachenko *et al.*, 2008). Para los seres humanos, la parasitación por algunas especies como *Echinococcus* spp. (Familia Taeniidae) puede cursar con sintomatología clínica (Beugnet *et al.*, 2014), derivada del desarrollo de la fase larvaria (quiste hidatídico) en diferentes tejidos (Taylor *et al.*, 2016).

La prevalencia de nematodos pulmonares fue del 21% (36/169), de los cuales, la mayoría (18%) pertenecían al grupo de los metastrongílidos (Superfamilia Metastrongiloidea: *Aelurostrongylus* spp. o *Troglostrongylus* spp.) y un 3% se clasificaron como nematodos triquiuroideos (*Eucoleus* spp.; antiguamente nombrado *Capillaria* spp.). De acuerdo con Hansen *et al.*, la distribución de este nematodo está íntimamente ligada a los hábitos de vida de los gatos asilvestrados, dado que están más expuestos a hospedadores de transporte, incluyendo roedores, anfibios, reptiles o aves; los cuales pueden alojar la tercera fase larvaria, tras ingerir un gasterópodo infectado (Hansen *et al.*, 2017). En este trabajo se llevó a cabo el análisis coprológico mediante la técnica de flotación-centrifugación ya que permite identificar las larvas infectantes. Sin embargo, la técnica de Baerman ofrece mayor sensibilidad para la detección de este parásito (Lucio-Forster and Bowman, 2011; Becker *et al.*, 2012) y, por lo tanto, los resultados obtenidos podrían no reflejar los valores de prevalencia reales. La frecuencia de infección por *Eucoleus* spp. (syn. *Capillaria* spp.) observada, es similar a la reportada en una colonia felina de Italia (1.4%) (Spada *et al.*, 2013).

Las coinfecciones más frecuentes en muestras de colonias felinas, tuvieron lugar entre los nematodos ancilostómidos y metastrongílidos (n=18), y entre ancilostómidos y *Toxocara* spp. (n=16). Estas asociaciones ya se habían documentado anteriormente en una publicación anterior (Coelho *et al.*, 2009). De acuerdo con Behnke *et al.*, las infecciones concurrentes provocadas por algunas especies de nematodos, tienen lugar en diferentes regiones del intestino e, incluso, en diferentes órganos, sugiriendo que su distribución puede estar determinada por las características inherentes de los nichos ocupados (Behnke *et al.*, 2004). Así, estas distintas localizaciones, evitan la competición por los recursos y promueven la coexistencia de varias especies. Tal y como se ha comentado anteriormente, en las infecciones concurrentes pueden darse sinergismos entre las diferentes especies implicadas, que pueden agravar el cuadro clínico. Sin embargo, la mayor parte de estas muestras coparasitadas (11/18, para la primera asociación; y 11/16, para la segunda), presentaban consistencias fecales de 1-4.

Al igual que sucedía en los anteriores colectivos, en las colonias felinas también se debe valorar la circulación de agentes parasitarios potencialmente zoonóticos. En este caso, no suponen un problema por el contacto íntimo de personas con los animales, ya que se trata de gatos ferales, en general no aptos para la adopción; sin embargo, pueden suponer un riesgo importante de contaminación ambiental, ya que los gatos tienen acceso a parques públicos, playas, jardines, u otras áreas de recreo (Becker *et al.*, 2012; Overgaaw and Knapen, 2013). Martínez-Moreno *et al.*, realizaron un estudio sobre prevalencia de infección parasitaria en muestras de tierra recogidas de 22 jardines y parques públicos de la ciudad de Córdoba, y detectaron huevos de *Toxocara* spp. en un 3.8% (13/342) de las muestras, y en 8 de las 22 áreas estudiadas. Los autores concluyeron que, aunque el nivel de contaminación no era alto, existía un riesgo de infección evidente, puesto que las muestras fueron recogidas en áreas frecuentadas por niños (Martínez-Moreno *et al.*, 2007).

Las colonias felinas fueron los colectivos donde se detectaron valores más bajos de FGM. A pesar de que comparten algunas similitudes, en cada colectivo felino se presentan diferentes condiciones, en cuanto al estilo de vida de los animales, y que podrían explicar los patrones observados en la concentración de FGM. Por ejemplo, los centros de acogida o las gateras, además de interacciones con personas o animales desconocidos, implican condiciones de vida mucho más restrictivas que en las colonias felinas, relacionadas con un estilo de vida libre (McCobb *et al.*, 2005). Evidencias de ello se han documentado en un estudio de Fanson *et al.*, comparando niveles de FGM de lince salvajes y en cautividad (Fanson *et al.*, 2012). Los autores sugirieron que los animales cautivos presentaban niveles de FGM significativamente más elevados, como consecuencia del limitado espacio.

Cabe remarcar que los valores de concentración de FGM detectados en los diferentes colectivos, especialmente en las colonias felinas, deben ser interpretados con cautela. En algunas de ellas, el acceso a las muestras era complicado ya que los animales no defecaban en bandejas de deposición, sino que lo hacían entre la vegetación, o las enterraban en el suelo. En el momento de la recogida, se observaron en algunas de ellas la presencia de larvas de mosca, lo que denota un cierto grado de descomposición. Incluso, en el análisis parasitológico fueron detectados huevos de nematodos ascáridos y/o ancilostómidos, en cuyo interior se apreciaba una larva totalmente desarrollada. Este hallazgo también señalaba que las muestras no eran frescas. Tal y como documentan algunos autores, la edad de la muestra puede alterar los niveles de FGM, si ésta no ha sido conservada debidamente tras su recogida en fresco (Sheriff *et al.*, 2011). La principal causa de este suceso es la actividad microbiana y/o enzimática, que degradan las sustancias fecales, y que podría conducir a una detección de niveles más bajos (Palme *et al.*, 2013). Este aspecto pone de manifiesto una limitación de la técnica de cuantificación hormonal.

Para la infección por helmintos, se detectó una relación estadísticamente significativa con los niveles de FGM. En este caso, aunque el análisis estadístico avale esta asociación positiva, la relación entre los niveles bajos de estrés y la parasitación por helmintos, debe considerarse con precaución, ya que se ajusta más a un efecto ambiental. Ambos parámetros se dan principalmente en colonias felinas donde, por un lado, los gatos no se encuentran confinados y poseen un estilo de vida libre y, por el otro, se trata de ambientes menos controlados, en lo que a medidas de manejo se refiere, y con acceso a hospedadores paraténicos o intermediarios.

Criaderos

Los criaderos son los colectivos felinos que destinan los animales a la reproducción y la posterior venta o cesión de la descendencia. Los centros visitados, eran domicilios privados donde se mantenía a los animales en grupos de 9-20 individuos. Se retiraban las deposiciones a diario, y se renovaba la sepiolita una vez por semana. En la gran mayoría de centros muestreados, la desinfección se llevaba a cabo semanalmente, y los animales eran desparasitados cada 3 meses, aunque de la misma manera que sucedía en centros de acogida y gateras, también se administraban tratamientos puntuales en caso de presentarse signos clínicos compatibles con infección por parásitos intestinales.

Estos colectivos fueron los que mostraron menor prevalencia de parasitosis intestinales (20.8%, 10/48). Adicionalmente, fueron los únicos donde no se detectaron muestras infectadas por helmintos, en concordancia con los resultados observados en una publicación previa, llevada a

cabo en estos colectivos felinos (Ito *et al.*, 2016). Los autores sugirieron que las pautas de desparasitación empleadas, tenían espectro de acción contra helmintos, pero no contra protozoos. Este hallazgo también fue documentado en nuestro estudio, de tal manera que los protozoos no se ven afectados por la acción de estos principios activos y, en consecuencia, es posible que colonicen los nichos desocupados por helmintos (Arabi and Hooshyar, 2009). Además, en los criaderos estudiados los gatos tenían escaso, o nulo, contacto con el exterior, limitando así su acceso a otros animales que pueden actuar como hospedadores de ciertas especies de helmintos (Ito *et al.*, 2016), así como protozoos del género *Cystoisospora*, los cuales tampoco fueron detectados en ningún criadero.

Una característica de los criaderos, que no comparte con el resto de colectivos, es que en los mismos centros conviven individuos jóvenes y adultos. Además, estos animales adultos se encuentran en diferentes estados reproductivos, como gestación o lactación. En este contexto, cobran importancia los animales que actúan como portadores asintomáticos. De igual modo que ocurría en centros de acogida y gateras, estos individuos parasitados no muestran signos clínicos, de tal manera que no son aislados, al no suponer un riesgo aparente para el resto de animales. De esta manera, actúan como diseminadores durante todo el curso de la infección, y entrañan un peligro para aquellos gatos que, por cuestiones fisiológicas relacionadas con la reproducción, o por la temprana edad, no son inmunocompetentes.

Por otra parte, aunque en estos centros los gatos también estaban confinados, la densidad de animales era más baja, en comparación a los centros de acogida y las gateras. Este aspecto es importante, no sólo porque se disminuye la probabilidad de contacto efectivo entre individuos, sino también porque es más fácil detectar y aislar aquellos animales que pueden suponer un riesgo de infección para el resto. Adicionalmente, en todos ellos los animales desempeñaban un rol como mascota, por lo que eran sometidos a protocolos de limpieza y desparasitación, semejantes a los que reciben los gatos que viven con sus propietarios. Los ambientes eran tranquilos, en ausencia de otras especies animales, las poblaciones se mantenían estables, sin introducciones de nuevos individuos, la atención de los gatos era total e individualizada y, además, en todos ellos los animales mantenían una estrecha relación con sus propietarios, hecho que se ha documentado como un factor potencial que reduce el estrés en gatos (Amat *et al.*, 2016). Tomando esto en consideración, cabría esperar que estos individuos mostrasen concentraciones hormonales más reducidas, sin embargo, fueron los colectivos donde se registraron los niveles más elevados. Hay que tener en cuenta el factor fisiológico de la reproducción ya que, en estos colectivos, ningún animal estaba castrado, y podían encontrarse en períodos de celo, gestación o lactancia (Sheriff *et al.*, 2011). Lynch y Bardi documentaron que se producían picos de secreción de GC en hembras de primates coincidiendo con el celo (Lynch *et al.*, 2002) y la gestación (Bardi *et al.*, 2003). El mismo patrón se observó en hembras

de otros mamíferos durante el período de lactación (Kenagy and Place, 2000). Por esta razón, y con el fin de evitar una interpretación errónea de los resultados, se decidió prescindir de este colectivo en el segundo muestreo.

Técnicas diagnósticas

Las muestras fecales se procesaron mediante diferentes métodos diagnósticos. Se llevaron a cabo técnicas coprológicas de concentración por flotación, test de inmunofluorescencia directa, cultivo selectivo, y PCR, para el estudio parasitológico y molecular. Para la cuantificación de FGM y las pruebas de validación bioquímicas, se utilizó una técnica de ELISA.

Técnicas coprológicas

El análisis coprológico es el método que se utiliza de manera rutinaria en el diagnóstico de parasitosis intestinales. Se trata de un conjunto de técnicas fáciles de llevar a cabo, de bajo coste económico, y que permiten la identificación de un amplio rango de formas de transmisión parásita como quistes, ooquistes, huevos o larvas (Dryden *et al.*, 2005).

Concretamente, la flotación en sulfato de zinc 33% ($\delta = 1.18$), con centrifugación, fue el método de elección en otros estudios de prevalencia de parasitosis intestinales y pulmonares (Gates and Nolan, 2009; Gow *et al.*, 2009; Khalafalla, R., 2011; Lucio-Forster and Bowman, 2011; Beugnet *et al.*, 2014; Polak and Smith-Blackmore, 2014; Saleh *et al.*, 2016). De acuerdo con Zajac *et al.*, esta solución es la más efectiva para la identificación de *Giardia* spp. porque produce un menor deterioro de los quistes, en comparación con otras soluciones de flotación de mayor densidad específica (Barr *et al.*, 1992; Zajac *et al.*, 2002; Blagburn and Butler, 2006). En nuestro estudio parasitológico, se esperaba encontrar un elevado porcentaje de prevalencia de este protozoo, tal y como se observó en un estudio previo en la misma región (Blasco *et al.*, 2017). Algunos autores afirman que su prevalencia de infección está subestimada (Thompson *et al.*, 2008; Payne and Artzer, 2009), debido a la baja sensibilidad de los métodos diagnósticos rutinarios, porque puede presentarse de forma subclínica y/o por el patrón de eliminación intermitente de los quistes. La verificación de la presencia de quistes, sin embargo, puede resultar dificultosa para personal poco experimentado, sobre todo en aquellos casos en que la carga parasitaria es reducida y, por ende, la cantidad de quistes fecales (Epe *et al.*, 2010). En un estudio cuyo objetivo era comparar la eficacia diagnóstica de diferentes técnicas, se procesaron muestras de heces positivas a *Giardia* spp., mediante métodos coprológicos de flotación, y un

kit comercial de detección antigénica. La interpretación de los resultados fue llevada a cabo por un grupo de veterinarios clínicos y, únicamente 6 de los 27 participantes, lograron identificar quistes en las muestras procesadas por flotación (Dryden *et al.*, 2006). La dificultad para detectar estas formas de transmisión no sólo radica en su reducido tamaño, sino que, también, porque pueden ser confundidos con pseudoparásitos, como por ejemplo levaduras, estructuras vegetales, cristales, u otros componentes, que también son concentrados a las densidades aplicadas. Además, el contacto prolongado de los quistes en los diferentes solutos, puede deteriorarlas y, por lo tanto, representar una complicación añadida a la hora de interpretar las observaciones microscópicas (Dryden *et al.*, 2005). De acuerdo con Dryden *et al.*, son necesarias tres flotaciones en sulfato de zinc ($\delta = 1.18$) consecutivas, para alcanzar un 94% de sensibilidad en el diagnóstico (Dryden *et al.*, 2006). Otros autores, en cambio, también abogan por llevar a cabo el análisis por triplicado, pero en días alternos (Payne and Artzer, 2009).

En segundo lugar, se realizaron tests de inmunofluorescencia directa para la detección específica de *Giardia* spp. y *Cryptosporidium* spp. Con el mismo kit comercial empleado en el presente estudio, Alles *et al.* documentaron en heces humanas, que este método tiene mayor sensibilidad y especificidad que otras técnicas convencionales (99.2% y 100%, respectivamente, para *Giardia* spp.; y 93% y 100%, respectivamente, para *Cryptosporidium* spp.) (Alles *et al.*, 1995). Aunque el uso de microscopía óptica permite la detección de quistes de *Giardia* spp., ya sea a partir de un frotis directo, o bien tras un método de concentración, algunos autores proponen la técnica de inmunofluorescencia directa como la mejor alternativa diagnóstica en los carnívoros domésticos, dado su mayor porcentaje de sensibilidad que las técnicas anteriores (Cirak and Bauer, 2004; Tangtrongsup and Scorza, 2010; Capári *et al.*, 2013). Para *Cryptosporidium* spp., en cambio, el uso de métodos de concentración por flotación es extremadamente limitado, debido a la dificultad de detección de los ooquistes por su reducido tamaño (Scorza and Tangtrongsup, 2010). Así, el diagnóstico mediante microscopía óptica puede hacerse tras la aplicación de técnicas de tinción (Chalmers and Katzer, 2013), aunque esta opción también presenta índices de sensibilidad y especificidad bajos (Thompson *et al.*, 2016). En este trabajo, el diagnóstico de *Cryptosporidium* se llevó a cabo mediante un kit de IFA destinado para su uso en heces humanas. En este sentido, Mekarú *et al.*, exponen una limitación del ensayo, pues los anticuerpos monoclonales de estos kits están especialmente diseñados para la detección de ooquistes de *C. parvum* (Mekarú *et al.*, 2007). De acuerdo con estos autores, se desconoce si estos inmunoensayos son capaces de detectar, de manera precisa, las especies de *Cryptosporidium* genéticamente divergentes, incluyendo *C. felis*. Marks *et al.*, sin embargo, en un estudio donde comparaban la eficacia de detección de ooquistes de *Cryptosporidium* spp., en excrementos de gato, mediante una tinción Ziehl-Neelsen modificada, kits comerciales de EIA y un test inmunofluorescencia directa, proporcionaron valores de sensibilidad del 85% de ésta

última, sugiriendo su uso como técnica diagnóstica para *Cryptosporidium* spp., en gatos (Marks *et al.*, 2004). Además, en nuestro estudio se detectaron ooquistes mediante la IFA que, posteriormente, fueron identificados como *C. felis*, en la secuenciación genética. No obstante, es posible que *Cryptosporidium* esté infradiagnosticado en nuestro estudio. Por un lado, por la dificultad de concentrar un gran número de ooquistes ya que, además de la baja tasa de eliminación que muestran los carnívoros domésticos, en comparación con otras especies (Scorza and Tangtrongsup, 2010), se suma el protocolo de preparación de la muestra, en el cual se requieren una serie de diluciones, con el fin de asegurar una óptima calidad de capa de antígeno, y una interpretación nítida en el microscopio. Con este proceso de dilución, se puede perder un gran número de ooquistes, tal y como se documenta en un estudio previo (Marks *et al.*, 2004).

También se llevó a cabo un cultivo selectivo para la identificación de *Tritrichomonas* spp. Durante la fase de replicación en la mucosa del intestino grueso, este protozoo se multiplica por fisión binaria simple, y los trofozoítos resultantes se excretan a través de las heces (Gruffydd-Jones *et al.*, 2013b). Al no contar con una forma de resistencia, estos organismos son muy lábiles en el medio ambiente, lo cual implica que el examen coprológico debe hacerse con muestras muy frescas (Gookin *et al.*, 2003). Un estudio realizado con gatos infectados experimentalmente, observó que la detección del parásito mediante microscopía convencional, a partir de un frotis directo con muestras obtenidas del recto, era significativamente más alta que con muestras recogidas del exterior (Gookin *et al.*, 2001). Los autores sugirieron que la supervivencia del trofozoíto era menor, una vez expuesto a las condiciones ambientales, que en el tramo intestinal. Los métodos laboratoriales para el diagnóstico de la tricomoniasis felina incluyen técnicas tradicionales, como el examen directo de heces y el cultivo selectivo, y modernos basados en biología molecular (Spitz *et al.*, 2015). Los primeros, se consideran de baja sensibilidad y especificidad, ya que precisan de muestras con una elevada carga parasitaria para su detección, y porque no permiten diferenciar entre otras especies de tricomonádidos (Lun and Ghadanger, 1999). En cuanto a la carga parasitaria, Gookin *et al.*, afirman que el número de organismos excretados por gatos que presentan infección clínica, es suficientemente grande para ser detectado rutinariamente mediante técnicas de cultivo (Gookin *et al.*, 2003). Adicionalmente, la observación de formas móviles en el cultivo selectivo no confirma la presencia de este patógeno, puesto que existe otra especie de tricomonádido, *Pentatrichomonas hominis*, que es capaz de desarrollarse en este tipo de cultivo, y muestra el mismo patrón de movimiento (Caplecha *et al.*, 2013). Este otro agente se encuentra en el tracto digestivo de diversas especies animales, y se considera un organismo comensal (Gookin *et al.*, 2003). En un estudio de Grellet *et al.*, realizado en perreras, y cuyo objetivo era determinar la prevalencia y especie de tricomonádidos en la población canina, se observó el crecimiento de este tipo de

protozoos en el mismo medio de cultivo empleado en el presente proyecto y, tras la aplicación de técnicas de biología molecular, se determinó que la especie presente era *P. hominis* (Grellet *et al.*, 2013). De esta manera, para establecer un diagnóstico fiable, es necesario combinar el cultivo con técnicas de tinción, como por ejemplo Diff-Quik, y métodos de biología molecular, como la PCR (Gruffydd-Jones *et al.*, 2013b).

Finalmente, la PCR fue la técnica utilizada para la identificación de los genotipos de *Giardia* spp. y las especies de *Cryptosporidium*. Esta reacción se puede realizar tomando como diana diferentes genes. En el caso de *Giardia* spp., los más comúnmente empleados son los que codifican para la subunidad pequeña del RNA ribosomal (SSU-rRNA), la proteína beta-giardina, las enzimas *tpi* y *gdh*; o el factor de elongación alfa-1, entre otros (Cacciò and Ryan, 2008; Feng and Xiao, 2011; Heyworth, M., 2016; Thompson and Ash, 2016). En el presente estudio se utilizaron el gen de la beta-giardina, y el de la *tpi*, los cuales ya habían sido empleados en otros estudios en gatos domésticos (Read *et al.*, 2004; Sprong *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2016; Uchoa *et al.*, 2018). El primero codifica una proteína estructural, específica del quiste de *Giardia* spp., mientras que el segundo codifica la enzima triosafosfatoisomerasa. Para el diagnóstico de *Cryptosporidium* spp., los principales genes de elección son el que codifica para la subunidad 18S del RNA ribosomal (18S RNA), para una proteína de la pared del ooquiste (COWP) o las regiones intergénicas 1 y 2 (ITS-1 e ITS-2) (Navarro i Martínez *et al.*, 2010). En este caso, se utilizaron los genes para la subunidad 18S del RNA ribosomal, y para la COWP, del mismo modo que se han documentado en otras publicaciones que trabajaron con felinos domésticos (Spano *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2015; Beser *et al.*, 2017). El uso de múltiples genes es ventajoso para el diagnóstico molecular de estos protozoos, ya que incrementa la sensibilidad de detección (Cacciò *et al.*, 2008; Ryan and Cacciò, 2013; Bouzid *et al.*, 2015; Thompson *et al.*, 2016).

La obtención de resultados óptimos mediante la PCR, no solo depende de la calidad inherente de la reacción enzimática o del análisis de varios genes, sino que, también, es muy importante el procesamiento anterior de la muestra, desde su recogida y conservación (incluyendo el tipo de método y su duración), hasta la extracción del DNA. En primer lugar, es fundamental trabajar con formas de resistencia viables (Bouzid *et al.*, 2008), que no hayan sufrido un proceso de degradación, de tal manera que su material genético se mantenga intacto. Es por ello que las muestras deben ser lo más frescas posibles (Kuk *et al.*, 2012), sin que hayan estado expuestas mucho tiempo a las condiciones externas. Por otra parte, se debe asegurar que el material fecal procede de animales que no hayan recibido un tratamiento antiparasitario previo, pues se conoce que algunos fármacos antiprotozoarios interaccionan con el DNA, produciendo una pérdida de su estructura helicoidal, e incluso, la rotura de la cadena (Edwards, D., 1993). Wilke y Robertson, compararon los resultados de la PCR en muestras infectadas con quistes de *Giardia*

spp., y conservadas por diferentes métodos (dicromato potásico 5%, formaldehído 4% y etanol), a lo largo de 12 semanas en refrigeración (4°C). Aunque en todos los grupos se lograron resultados positivos para la PCR, en todos ellos se observó una disminución gradual del número de núcleos viables (Wilke and Robertson, 2009). Kuk *et al.*, realizaron un estudio donde evaluaron semanalmente (hasta un máximo de 4 semanas) la cantidad de DNA (ng/μL) que se preservaba, en muestras expuestas a diferentes condiciones de conservación: temperatura ambiente, refrigeración (4°C), congelación (-20°C), alcohol 70%, formaldehído 10%, o dicromato potásico 2,5%. Además, llevaron a cabo el análisis de dos tipos de muestras, unas que contenían mayor número de quistes, en relación a los trofozoítos, y viceversa. En este caso, los resultados mostraron que no había diferencias significativas entre la concentración de DNA obtenida en las diferentes semanas, para cada método de preservación. Sin embargo, únicamente las muestras que fueron conservadas en dicromato potásico, lograron resultados positivos en aquellas con mayor presencia de trofozoítos que de quistes. De acuerdo con los autores, estas formas vegetativas son muy sensibles a las condiciones ambientales, y pueden ser rápidamente dañadas, tanto a temperatura ambiente, como de congelación (-20°C) o refrigeración (4°C). Así, los autores sugirieron que el éxito del dicromato potásico reside en su pH ácido, que mantiene el DNA viable durante más tiempo (Kuk *et al.*, 2012).

La congelación ha sido un método ampliamente utilizado puesto que limita el crecimiento bacteriano y la actividad enzimática, durante largos periodos de tiempo. No obstante, se conoce que también deteriora las formas de transmisión parásita, permitiendo la exposición del DNA, el cual será más susceptible a la degradación bacteriana cuando alcance temperaturas más elevadas (Wilke and Robertson, 2009). Algunos autores, sin embargo, documentaron buenos resultados en la PCR de muestras conservadas a -20°. Es el caso de Abdelsalam *et al.*, quienes también compararon diferentes métodos de conservación para muestras fecales positivas a *Cryptosporidium* spp., durante un mes. Entre las diferentes técnicas que se llevaron a cabo, congelación a -20°C, alcohol 10%, dicromato potásico 2.5%, y formalina; se detectaron valores de sensibilidad de 80%, 73.3%, 33.3% y 0%, respectivamente, determinando que la congelación durante un mes, era el mejor método para preservar los ooquistes (Abdelsalam *et al.*, 2017).

Los autores de estos estudios concluyen que, aunque mantener la integridad del material genético es importante, el éxito de la amplificación radica en la cantidad de formas de transmisión presentes en una muestra (Wilke and Robertson, 2009; Kuk *et al.*, 2012; Abdelsalam *et al.*, 2017). En este trabajo, se seleccionaron aquellas muestras con mayor carga parasitaria, de acuerdo con el análisis mediante microscopía óptica, y se conservaron las muestras en dicromato potásico 5% (comunicación personal Dr. Simone Cacciò).

De la misma manera, la elección de un buen método de extracción del material genético también es fundamental para aumentar la sensibilidad (Sepahvand *et al.*, 2017). El principal objetivo de

este proceso no sólo es aislar el DNA presente en una muestra, sino que también cumple la misión fundamental de neutralizar la acción de una serie de sustancias conocidas como inhibidores. Estos compuestos tienen la capacidad de interactuar con el DNA a través de diferentes mecanismos y, en definitiva, hacer que sean indetectables mediante los métodos moleculares. Algunos ejemplos de elementos inhibidores son compuestos orgánicos como las sales biliares, la urea, el fenol, el etanol, los polisacáridos, el ácido húmico; o también proteínas como el colágeno, la mioglobina, la hemoglobina, la lactoferrina, y algunas inmunoglobulinas, o enzimas (Kuk *et al.*, 2012; Schrader *et al.*, 2012). La mayoría de kits comerciales para la extracción de DNA, ya cuentan entre sus protocolos, con métodos para eliminar estas sustancias. Por lo tanto, es importante seguir los pasos de manera rigurosa.

Muchos investigadores sostienen que las técnicas de biología molecular son las que utilizan herramientas que ofrecen mejores índices de sensibilidad y especificidad, en comparación al resto de técnicas (Bertrand *et al.*, 2005; Mekaru *et al.*, 2007; Chalmers *et al.*, 2011). Gotfred-Rasmussen *et al.*, por ejemplo, en un estudio donde comparaban los índices de sensibilidad de cuatro técnicas diferentes para la detección de *Giardia* spp., obtuvieron un porcentaje del 91% para la PCR. Este valor estaba por encima del calculado en la inmunofluorescencia directa (50%), y en dos métodos de concentración: sedimentación bifásica (31%) y flotación en sacarosa ($\delta = 1.20$) (67%) (Gotfred-Rasmussen *et al.*, 2016). Además, en este mismo estudio también documentaron que la PCR, junto con la inmunofluorescencia, eran las únicas técnicas que lograron obtener resultados positivos en una serie de diluciones que se llevaron a cabo (1:1, 1:20, 1:100, 1:1.000, 1:5.000, y 1:10.000), y en cada una de las cuales el número de quistes disminuía gradualmente. Los métodos de concentración, en cambio, no detectaron quistes a partir de la dilución 1:1.000. En el presente estudio, sin embargo, todas las muestras analizadas por PCR, a excepción de una, fueron positivas en el test de flotación, pero únicamente en 28 muestras se obtuvo un producto amplificado (Tabla 8). Estos resultados son similares a los obtenidos por Uchoa *et al.*, quienes en un estudio donde analizaron 96 muestras fecales de humanos, perros y gatos, infectadas por *Giardia* spp., detectaron resultados positivos en 38 muestras mediante la PCR, con los genes de la beta-giardina y de la *tpi*, frente a los 86 observados en la flotación en sulfato de zinc ($\delta = 1.2$) (Uchoa *et al.*, 2018). Los autores atribuyeron el bajo rendimiento de la PCR a la baja carga parasitaria y a la presencia de inhibidores, sobre todo en las muestras de perros y gatos, concluyendo la necesidad de combinar técnicas para incrementar la sensibilidad del diagnóstico.

En cuanto al diagnóstico de *Cryptosporidium* spp. realizado en este trabajo, 27 muestra fueron analizadas conjuntamente mediante inmunofluorescencia directa y PCR, para cualquiera de los dos marcadores genéticos empleados. Se detectaron 8 resultados positivos con la primera técnica, pero de ellos, sólo 5 resultaron positivos para la PCR. Por otra parte, de las 19 muestras

que fueron diagnosticadas como negativas por inmunofluorescencia, 9 de ellas resultaron positivas tras ser analizadas por PCR (Tabla 8). Las sensibilidades de ambas técnicas fueron comparadas por Vejdani *et al.* en muestras fecales humanas, y se obtuvieron valores de 90.9% para PCR, y 81.8% para inmunofluorescencia directa (Vejdani *et al.*, 2014).

En el caso del diagnóstico de *Giardia* spp., donde se detectaron quistes en 39 de las 40 muestras, mediante flotación, sorprende el alto número de resultados negativos por PCR (n=12). Son muchas las causas que pueden haber conducido a este bajo rendimiento de la técnica. Por un lado, y de acuerdo a lo expuesto en muchas otras publicaciones, es importante tener en cuenta la carga parasitaria. Muchos autores coinciden en que un inconveniente de la PCR, es que precisa de una concentración elevada de material genético para que el producto de amplificación sea visible (Fletcher *et al.*, 2014; Koehler *et al.*, 2014; Uchoa *et al.*, 2018), y se señala como principal causa de los bajos porcentajes de sensibilidad obtenidos en algunos estudios (Wilke and Robertson, 2009; Uchoa *et al.*, 2018). Este aspecto es especialmente relevante en los carnívoros domésticos, ya que se ha documentado una baja tasa de eliminación de quistes de *Giardia* spp. y ooquistes de *Cryptosporidium* spp., en comparación a otras especies (Scorza and Tangtrongsup, 2010). Paz e Silva, *et al.*, en un estudio sobre prevalencia de *Giardia* spp., en 300 muestras de perros, revelaron una prevalencia del 17.3% (n=52), combinando examen microscópico (n=48) después de flotación en sulfato de zinc, y PCR (n=36) para los genes *gdh* y SSU-rDNA. Según estos autores, la mayor parte de resultados negativos para la PCR, se dieron en muestras donde, mediante microscopía, solo se identificaban entre 1 y 3 quistes, por preparación (Paz e Silva, 2012). Con estos resultados observados, postularon que el examen microscópico, seguido de técnicas de flotación en sulfato de zinc, tenía un rendimiento similar a la detección molecular.

Además de la cantidad de formas de transmisión, también es importante su distribución en la muestra. Uehlinger *et al.*, apuntan que la distribución no homogénea de quistes y ooquistes en una muestra puede conducir a resultados erróneos, dado que, para llevar a cabo el análisis, no se trabaja con todo el espécimen fecal, sino con una proporción del mismo (Uehlinger *et al.*, 2017). Para sortear esta primera limitación, en este estudio se llevaron a cabo diferentes estrategias. En el caso de *Giardia* spp., concretamente, en los criterios de inclusión para la mayoría de muestras, se tuvieron en cuenta aquéllas que cumplían alguna de las pautas de Strand *et al.*, en referencia al número de quistes observados en un campo microscópico, con preferencia por las más abundantes (Strand *et al.*, 2008). Adicionalmente, para ambos protozoos, antes de iniciar el proceso de extracción se concentraron las muestras con soluciones de flotación de densidades específicas conocidas (sulfato de magnesio $\delta=1.19$ o sulfato de zinc $\delta=1.20$). Con ello se consiguen agrupar las formas de transmisión, tal y como proponen algunos autores (Lalle *et al.*, 2005). El problema de esta etapa es que el material obtenido debe ser lavado inmediatamente

con agua para eliminar el exceso de solución de flotación o, de lo contrario, se corre el riesgo de deteriorar las formas de transmisión y, en consecuencia, provocar la alteración del DNA (Dryden *et al.*, 2005). El proceso de lavado *per se*, puede conducir a la pérdida de quistes u ooquistes, de la misma manera que ocurre con la fase inicial de todo el proceso, en la cual se debe retirar el exceso de conservante (Marks *et al.*, 2004).

Otro factor que podría ser responsable del alto número de falsos negativos, se relaciona con la presencia de compuestos inhibidores. Cabe tener en cuenta que las heces son matrices biológicas especialmente ricas en estos compuestos (Abdelsalam *et al.*, 2017), y que suelen estar contaminadas con materia orgánica, especialmente cuando se han recogido del suelo. En el caso del gato, además, la presencia de sepiolita en la muestra puede interferir en esta técnica diagnóstica, puesto que dicho material tiene una capacidad de absorción y retiene la urea que contamina la muestra de heces y, a su vez, es sustancia capaz de degradar la polimerasa (Uchoa *et al.*, 2018). Se han descrito muchos mecanismos que pueden alterar algún punto de la reacción enzimática. Algunos inhibidores, por ejemplo, compiten con los cebadores por el punto de unión al DNA diana, e impiden llevar a cabo el proceso de hibridación. Diferentes enzimas se han descrito como potenciales inhibidores de la PCR, como por ejemplo las nucleasas o ciertas proteasas, que pueden degradar el DNA o la polimerasa, respectivamente; o también disacaridasas, que pueden alterar el proceso enzimático mimetizando la estructura de los ácidos nucleicos (Schrader *et al.*, 2012). Otros elementos, como el calcio, el colágeno, o el ácido tánico, inhiben su actividad (Nantavisai *et al.*, 2007).

Para el diagnóstico de *Cryptosporidium* spp., en cambio, la PCR brindó la posibilidad de detectar ooquistes en 9 muestras, que habían sido consideradas negativas mediante inmunofluorescencia directa. Esta combinación de técnicas también generó discordancia en un estudio de Scorza *et al.* donde, entre 353 muestras fecales de gato, detectaron 101 positivas por PCR, y 52 por inmunofluorescencia directa: 27 muestras fueron positivas para ambas técnicas; 74 fueron PCR positivas e IFA negativas, 25 PCR negativas e IFA positivas, y 227 negativas para ambos métodos. En total, calcularon un 72% de porcentaje de discordancia (Scorza *et al.*, 2003). De acuerdo con muchos investigadores, el bajo número de ooquistes presentes en una muestra, junto al proceso de dilución que se debe aplicar para conseguir una capa de antigenado adiente (Marks *et al.*, 2004), representa el factor limitante más notable para la inmunofluorescencia directa (Scorza and Tangtrongsup, 2010). Por otro lado, también cabe añadir, que se requiere cierta experiencia para la identificación mediante microscopía de fluorescencia, por el reducido tamaño de los ooquistes, y porque los antígenos marcados con fluoresceína pueden unirse inespecíficamente a otras estructuras presentes en la muestra, dando lugar a una interpretación errónea de los resultados.

En el diagnóstico por PCR de ambos protozoos, se observaron discordancias entre los diferentes marcadores genéticos empleados. Para *Giardia* spp., se detectaron 28 resultados positivos con el gen beta-giardina, mientras que, para el gen *tpi*, se detectaron 22 (Tabla 9). Estos hallazgos se han documentado en otras publicaciones (Ballweber *et al.*, 2010; Uchoa *et al.*, 2018). En el estudio de Uchoa *et al.*, por ejemplo, el análisis molecular de 17 muestras fecales de perro, solo logró amplificar 6 muestras con el gen de la beta-giardina, mientras que los otros genes estudiados (*gdh* y *tpi*) no generaron producto amplificado. En el mismo trabajo, también se analizaron 24 muestras humanas, y se obtuvieron 8 resultados positivos para la beta-giardina, 6 para la *gdh* y 5 para la *tpi* (Uchoa *et al.*, 2018). Este aspecto pone de manifiesto la necesidad de analizar múltiples genes, para un mismo agente, con el fin de aumentar la sensibilidad de la reacción enzimática, tal y como proponen diversos autores (Cacciò *et al.*, 2008; Ryan and Cacciò, 2013; Bouzid *et al.*, 2015; Thompson *et al.*, 2016). En el estudio de Nantavisai *et al.*, se estimaron las sensibilidades de detección de cuatro cebadores para sus genes diana, en función del límite de detección, en varias muestras con concentraciones de quistes conocidas: 3,368 quistes/mL, 674 quistes/ mL, 337 quistes/mL, y 168 quistes/mL. Los resultados mostraron mejores índices de detección en el gen de la SSU-rRNA, que lograba amplificaciones en todas las muestras; seguido del gen *gdh*, en el cual se detectó amplificación hasta 337 quistes/mL. Los peores resultados se registraron para los genes *tpi* y beta-giardina, puesto que el primero solo amplificó en la muestra con la concentración de quistes más elevada, mientras que el segundo, no logró amplificación alguna (Nantavisai *et al.*, 2007). De acuerdo con los autores, los buenos índices de sensibilidad documentados para el gen SSU-rRNA, se deben, en primer lugar, a que la secuencia nucleotídica de este gen se conserva mejor que en otras regiones; y, en segundo lugar, debido a la existencia de numerosas copias de este gen en el mismo organismo, estimada en 60-130 copias por núcleo.

En el presente estudio, esta clase de inconsistencias todavía fueron más llamativas en el diagnóstico del coccidio *Cryptosporidium* spp., donde en 20 de las 40 muestras analizadas, se detectaron 8 amplificaciones con el gen 18S rDNA, mientras que el gen COWP no mostró ningún resultado positivo (Tabla 10). Este hallazgo no concuerda con el documentado por Yu *et al.*, quienes realizaron un estudio comparativo de las sensibilidades entre estas dos dianas genéticas. Se establecieron seis límites de detección, entre 10^0 y 10^5 ooquistes. Los resultados obtenidos fueron similares para ambos genes, sin embargo, se concluyó que el gen COWP era más sensible puesto que era capaz de generar amplificaciones en muestras con concentración más baja de ooquistes. El gen 18S rDNA, en cambio, estableció su límite de detección en la segunda concentración más baja (10^1 ooquistes) (Yu *et al.*, 2009). Resultados similares, aunque menos precisos, fueron obtenidos por Pedraza-Díaz *et al.*, quienes estimaron que el límite de

detección de este gen en muestras fecales era <500 ooquistes por gramo (Pedraza-Díaz *et al.*, 2001).

Técnicas inmunológicas

La monitorización de la actividad del eje HPA, a partir de material fecal, es un procedimiento ampliamente utilizado y estandarizado en el gato doméstico, para el estudio de la respuesta de estrés (Schatz and Palme, 2001; Young *et al.*, 2004; Brown, J.L., 2006), sin embargo, a día de hoy no se han registrado valores de referencia para estas concentraciones hormonales en el gato doméstico. Es importante tener en cuenta que este análisis no se lleva a cabo directamente con la cuantificación de cortisol inalterado, sino que se detectan sus metabolitos, dado que, durante el proceso de degradación, esta hormona se somete a varias reducciones, oxidaciones e hidroxilaciones, antes de ser conjugada en el hígado (Möstl and Palme; 2002). Este tipo de muestras ofrecen la ventaja de que pueden ser obtenidas de manera sencilla y con un grado de invasión mínimo, ya que no se requiere la manipulación de los animales. Graham y Brown, además, demostraron que la principal ruta de excreción de metabolitos de cortisol marcados radioactivamente, en hembras de gato doméstico, era vía fecal (alrededor del 86%) (Graham and Brown, 1996). Los resultados también proporcionan un valor promedio más preciso de la actividad adrenocortical a lo largo del tiempo porque los metabolitos se excretan durante un período de horas (Brown, J.L., 2006; Keay *et al.*, 2006), lo cual permite soslayar la secreción pulsátil de GC en sangre. No obstante, este tipo de procedimiento también presenta una serie de inconvenientes relacionados con la conservación de las muestras. El intervalo de tiempo entre la deposición y la congelación o el secado de las heces es crucial para evitar la actividad microbiana (Buchanan and Goldsmith, 2004; Mormède *et al.*, 2007). Incluso después del tratamiento térmico a -20°C algunas enzimas permanecen activas, mientras que con el calentamiento a 95°C se inactivan por completo (Palme *et al.*, 2000). De acuerdo con Touma y Palme, las enzimas microbianas provocan una alteración, ya sea por incremento o disminución, de los niveles de FGM (Touma and Palme, 2005). Finalmente, se debe tener presente que los esteroides excretados pueden no estar distribuidos uniformemente en la muestra (Millsbaugh and Washburn, 2003) y, dado que únicamente es necesario una porción del material fecal, antes de comenzar el análisis laboratorial, es conveniente homogenizar la muestra.

La extracción de los esteroides de la muestra fecal representa el punto inicial previo al proceso de cuantificación (Keay *et al.*, 2006). Los metabolitos de estas hormonas integrados en una muestra fecal, presentan diferentes polaridades y composiciones, por lo que la elección de un

protocolo de extracción adecuado es esencial (Palme *et al.*, 2005; Palme, R., 2005). A día de hoy se han documentado varias técnicas de extracción (Sheriff *et al.*, 2011). En este trabajo, los extractos se obtuvieron a partir de metanol (99.8%), siguiendo el protocolo DetectX™ Steroid Solid Extraction Protocol (Arbor Assays®, MI, USA) con modificaciones basadas en el estudio de Talló-Parra *et al.* (Talló-Parra *et al.*, 2015), De acuerdo con Palme *et al.*, se recomienda la extracción de los esteroides fecales suspendiendo las muestras en un alcohol primario con un elevado porcentaje de concentración (Palme *et al.*, 2013). Para los metabolitos de GC, metanol al 80% resultó ser el más adecuado para prácticamente todas las especies de mamíferos testadas hasta la fecha.

De acuerdo con los valores de referencia de la FDA, y de otras publicaciones (Buchanan and Goldsmith, 2004; Food and Drug Administration, 2015), se pudo concluir que los porcentajes de precisión obtenidos (CV intraensayo, 6%; y CV interensayo 10.6%) indican un buen nivel de repetibilidad, tanto dentro de un mismo ensayo, como entre diferentes ensayos. Por otro lado, el coeficiente de determinación ($R^2 = 99.07\%$) calculado en la prueba de la línea de dilución, entre los valores teóricos y los reales (Figura 7), revela una correcta interacción dosis-dependiente entre los metabolitos de cortisol fecal y los anticuerpos presentes en el EIA; avalando la asunción de que las características de unión del anticuerpo en los estándares y los extractos problema, son similares. Finalmente, el porcentaje de recuperación medio ($78.31\% \pm 9.33\%$) demuestra que ningún otro componente de la matriz fecal, interfiere significativamente con la estimación de los metabolitos de cortisol fecal, independientemente de las concentraciones de estos potenciales factores de confusión.

Por lo tanto, las pruebas de validación bioquímica llevadas a cabo en el presente estudio, muestran valores de precisión, especificidad y exactitud, que permiten concluir que el EIA empleado es apto para la determinación de cortisol y/o sus metabolitos, en muestras fecales de gatos domésticos. La validez de este método ya había sido documentada previamente por otros grupos de investigadores, sobre el mismo tipo de muestra y especie animal (Schatz and Palme, 2001; Ramos *et al.*, 2013). Diversos autores sugieren que, para una fiable monitorización de la actividad adrenal, a partir de la cuantificación de GC y/o sus metabolitos, los métodos utilizados deben incluir adicionalmente, pruebas de validación fisiológicas y biológicas (Palme, R., 2005; Touma and Palme; 2005). La primera de ellas consiste en alterar farmacológicamente los niveles hormonales de un individuo, mientras que la segunda se basa en la exposición de un animal a un evento estresante como una captura, inmovilización, transporte o privación de alimento (Touma and Palme, 2005; Keay *et al.*, 2006). El objetivo de ambas pruebas es determinar posteriormente si el test elegido es capaz de detectar cambios en los niveles hormonales. No obstante, con el fin de mantener el carácter no invasivo de nuestro estudio, la validación del EIA sólo se hizo a nivel bioquímico. Aunque existen muchas publicaciones

acerca de las pruebas de validación, todavía no se ha consensuado un protocolo que establezca un procedimiento definitivo (Andreasson *et al.*, 2015).


VII. CONCLUSIONES

1. La prevalencia de parasitosis intestinales en gatos que viven en colectividad fue del 53.2%.
2. La mayor prevalencia de infección parasitaria se detectó en las colonias felinas (70.4%), seguido de los centros de acogida (58.8%), y las gateras (41.4%). Los colectivos con menor índice de parasitosis fueron los criaderos (20.8%).
3. Los parásitos más frecuentes en colonias felinas fueron los ancilostómidos, mientras que *Giardia* spp. fue el más frecuente, tanto en centros de acogida como en criaderos.
4. Factores relacionados con las instalaciones, como el material de la bandeja de deposición o el tipo de suelo del recinto, influyen en la prevalencia de determinadas formas de transmisión parasita, así como las medidas de manejo relacionadas con la desparasitación y la desinfección.
5. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre infección y consistencia fecal. Ello sugiere que la presencia de portadores asintomáticos contribuye a la diseminación y mantenimiento de las parasitosis en el colectivo.
6. La mayoría de genotipos de *Giardia* spp. y especies de *Cryptosporidium* spp. observadas, corresponden a los específicos de la especie felina (genotipo F y *C. felis*, respectivamente). Asimismo, no se pudieron confirmar genéticamente algunos genotipos zoonóticos de *Giardia* spp.
7. Las pruebas de validación bioquímica llevadas a cabo en el presente estudio, muestran valores de precisión, especificidad y exactitud, que permiten concluir que el EIA empleado es apto para la determinación de cortisol y/o sus metabolitos, en muestras fecales de gatos domésticos.
8. Los valores medios de concentración de FGM son más elevados en los centros de acogida, seguido de las gateras y las colonias felinas; sugiriendo que aquellos individuos confinados en colectivos, muestran niveles de estrés fisiológico superiores a los gatos asilvestrados. Los gatos de criadero fueron los que mostraron la concentración media de FGM más alta, pero estos valores se pueden atribuir al estado fisiológico de la reproducción (gestación, lactación o celo).
9. La exposición continua a perros, ya sea auditiva, visual u olfativa, así como una disponibilidad de espacio habitable reducida, mostraron mayores índices de estrés fisiológico.
10. En gatos de centros de acogida se ha observado una relación estadísticamente significativa entre niveles de FGM elevados e infección protozoaria.


VIII. ANEXOS

ANEXO I. Escala de consistencia fecal


Fecal Scoring System




Score 1 – Very hard and dry; requires much effort to expel from body; no residue left on ground when picked up. Often expelled as individual pellets.




Score 2 – Firm, but not hard; should be pliable; segmented appearance; little or no residue left on ground when picked up.




Score 3 – Log-like; little or no segmentation visible; moist surface; leaves residue, but holds form when picked up.




Score 4 – Very moist (soggy); distinct log shape visible; leaves residue and loses form when picked up.



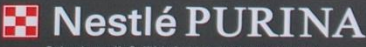
Score 5 – Very moist but has distinct shape; present in piles rather than as distinct logs; leaves residue and loses form when picked up.



Score 6 – Has texture, but no defined shape; occurs as piles or as spots; leaves residue when picked up.



Score 7 – Watery, no texture, flat; occurs as puddles.



Trademarks owned by Société des Produits Nestlé S.A., Vevey, Switzerland

VET 14668-1007
Printed in U.S.A.

ANEXO II. Protocolo de la técnica coprológica de concentración por flotación en sulfato de zinc ($\delta=1.18$)

1. Homogenizar entre 2 g y 3 g de muestra fecal en agua
2. Filtrar el contenido en un colador con una gasa quirúrgica y verterlo en un tubo de 10 mL.
3. Centrifugar a 1,800 rpm durante 2 minutos.
4. Eliminar el sobrenadante y homogenizar el sedimento con sulfato de zinc ($\delta=1.18$).
5. Centrifugar a 1,800 rpm durante 2 minutos.
6. Acabar de llenar el tubo de 10 mL con sulfato de zinc ($\delta=1.18$) hasta formar un menisco.
7. Colocar un cubreobjetos sobre el tubo
8. Esperar 5 minutos antes de la lectura.

ANEXO III. Protocolo de la técnica de inmunofluorescencia directa

1. Homogenizar 1 g de muestra fecal en agua.
2. Filtrar el contenido con un colador y una gasa quirúrgica y verterlo en un tubo de 10 mL.
3. Centrifugar a 1,800 rpm durante 5 minutos, tres veces.
4. Homogenizar el sedimento en 3 mL de agua. Si se pretende conservar el sedimento, se mezcla el contenido con formol 10%.
5. Extraer 250 μ L de la mezcla y homogenizar en 1.5 mL de agua.
6. Centrifugar a 1,800 rpm durante 5 minutos, tres veces.
7. Extraer 45 μ L y depositarlo en el portaobjetos tratado del Kit.
8. Dejar secar a T^a ambiente para favorecer la formación de la capa de antigenado.
9. Añadir una gota de reactivo de detección y otra de tinción de contraste.
10. Mantener 30 minutos a T^a ambiente.
11. Eliminar el exceso de reactivo de detección y la tinción de contraste con tampón de lavado 1X.
12. Observar en microscopio de fluorescencia.

ANEXO IV. Protocolo de la técnica de cultivo selectivo para *Tritrichomonas* spp.

1. Tomar muestra con hisopo en heces frescas.
2. Abrir el cultivo selectivo e introducir el hisopo en contacto con el líquido de cultivo.
3. Retirar el hisopo y homogenizar el contenido manualmente.
4. Incubar a 37° durante 24 horas.
5. Observación directa en microscopio óptico.
6. En caso de resultado negativo, repetir las evaluaciones diariamente, hasta un máximo de 15 días.

ANEXO V. Protocolo de la técnica de tinción Diff-Quick

1. Traspasar 0.5 mL del medio de cultivo a un portaobjetos.
2. Dejar secar la muestra a temperatura ambiente o con la ayuda de un secador.
3. Sumergir el portaobjetos 15 veces durante un segundo, en un recipiente con solución de fijación (colorante triarilmetano y metanol).
4. Eliminar el exceso de fijador en un papel de filtro.
5. Sumergir el portaobjetos 15 veces durante un segundo, en un recipiente con solución eosinofílica (colorante de xanteno, tampón de pH y azida sódica)
6. Eliminar el exceso de solución en un papel de filtro.
7. Sumergir el portaobjetos 15 veces durante un segundo, en un recipiente con solución basófila (colorante de tiazina y tampón de pH)
8. Lavar cuidadosamente el portaobjetos en agua destilada y dejar secar el exceso de líquido.
9. Observar al microscopio óptico a 100x aumentos.

ANEXO VI. Protocolo para la identificación del genotipo de *Giardia* spp. por nested-PCR /RFLP; y de la especie de *Cryptosporidium* por nested-PCR.

A) Lavado:

1. Filtrar la muestra con un embudo de filtración.
2. Transferir 5–10 mL de muestra filtrada a un tubo Falcon 50 mL
3. Añadir agua destilada, hasta 40 mL.
4. Si la muestra filtrada contiene una notable cantidad de grasa, se añaden 21 mL de agua destilada y 9 mL de éter.
5. Centrifugar 3,500 rpm durante 10 minutos (x3). Eliminar sobrenadante.

B) Concentración

1. Transferir 3-5 mL de muestra en un tubo de ensayo.
2. Añadir solución de flotación hasta 10 mL.
3. Centrifugar 1,200 rpm durante 5 minutos
4. Esperar 5-10 minutos y transferir sobrenadante a un tubo Falcon 15 mL
5. Centrifugar 2,200 rpm durante 8 minutos
6. Eliminar sobrenadante, homogenizar el sedimento con agua destilada hasta 15 mL y centrifugar a 2,200 rpm durante 8 minutos (x2)
8. Resuspender el sedimento en 350-500 µL de agua destilada.

C) Extracción DNA

1. Transferir toda la muestra obtenida en el proceso de concentración (máximo 500 μ L) en un tubo de matriz de lisado E de 2 mL.
2. Añadir 825 μ L de tampón de fosfato salino (PBS) y 275 μ L de solución PLS. Mezclar en vórtex 10-15 segundos.
3. Centrifugar 14,000 rpm durante 5 minutos. Eliminar sobrenadante.
4. Añadir 978 μ L de PBS y 122 μ L de tampón de MT. Mezclar en vórtex.
5. Introducir los tubos en la máquina FastPrep[®]-24 a 6.0 m/s durante 40 segundos.
6. Centrifugar a 14,000 rpm durante 10 minutos.
7. Transferir el sobrenadante a un tubo de 2 mL y añadir 250 μ L de solución PPS. Incubar a 4°C durante 10 minutos.
8. Centrifugar a 14,000 rpm durante 2 minutos.
9. Transferir el sobrenadante a un tubo Falcon 15 mL y añadir 1 mL de matriz de unión. Mantener en agitación suave durante 3-5 minutos.
10. Centrifugar 14,000 rpm durante 2 minutos. Eliminar sobrenadante.
11. Homogenizar el sedimento en 1 mL de tampón de lavado 1
12. Transferir 600 μ L a un tubo de centrifugado y centrifugar a 14,000 rpm durante 1 minuto. Descartar sobrenadante (x2).
13. Añadir 500 μ L de tampón de lavado 2 y homogenizar con una pipeta.
14. Centrifugar 14,000 rpm durante 2 minutos. Eliminar sobrenadante (x2)
15. Transferir la unidad de filtro a un tubo de captura y añadir en 100 μ L de DES.
16. Centrifugar a 14,000 rpm durante 2 minutos. Eliminar la unidad de filtro.

D) Electroforesis en gel de agarosa 1.6%

1. Mezclar 1.6 g de agarosa (CSL-AG500) en 100 mL de Buffer TAE 1X
2. Hervir la mezcla hasta obtener un líquido totalmente transparente.
3. Rellenar con agua la cantidad de volumen perdido en la ebullición y dejar enfriar la mezcla.
4. Antes de que solidifique, añadir 1 µL de bromuro de etidio y verter la mezcla en una bandeja con peines, previamente preparada para un determinado número de muestras.
5. Dejar solidificar el gel a temperatura ambiente.
6. Retirar suavemente los peines y colocar el gel en una cubeta horizontal conectada a electrodos. Añadir Buffer TAE 1X hasta cubrir el gel.
7. Añadir 15 µL de marcador (Gel pilot 100 bp ladder) en el primer y último pocillo de cada fila y 10 µL de producto de la nested-PCR en cada pocillo comprendido entre estos marcadores.
8. Conectar los electrodos al aparato de electroforesis a una intensidad de 60-75 V durante aproximadamente 1-1.5 horas.
9. Observar la separación de las bandas colocando el gel bajo un aparato de luz ultravioleta.

E) RFLP

Para averiguar el genotipo de *Giardia* spp. se analizan los fragmentos de restricción de longitud polimórfica mediante la enzima HaeIII.

1. En un tubo Eppendorf 1.5 mL se añaden los siguientes componentes y volúmenes:
2. Incubar los tubos sin agitación en un Thermomixer a 37°C durante 4 horas.

F) Electroforesis en gel de agarosa 3%

1. Mezclar 3 g de agarosa de alta resolución (MethaporTM Agarose) en 100 mL de Buffer TAE 1X
2. Refrigerar la mezcla a 4°C durante 30 minutos.
3. Hervir la mezcla hasta obtener un líquido totalmente transparente.

4. Rellenar con agua la cantidad de volumen perdido en la ebullición y dejar enfriar la mezcla.
5. Antes de que solidifique, añadir 4 μL de colorante y verter la mezcla en una bandeja con peines, previamente preparada para un determinado número de muestras.
6. Dejar solidificar el gel a temperatura ambiente.
7. Retirar suavemente los peines y colocar el gel en una cubeta horizontal conectada a electrodos. Añadir Buffer TAE 1X hasta cubrir el gel.
8. Añadir 15 μL de marcador (Gel pilot 50 bp ladder) en el primer y último pocillo de cada fila y 25 μL de producto de digestión enzimática en cada pocillo comprendido entre estos marcadores.
8. Conectar los electrodos al aparato de electroforesis a una intensidad de 60-50 V durante aproximadamente 2.5 horas.
9. Observar la separación de las bandas colocando el gel bajo un aparato de luz ultravioleta.

G) Purificación DNA

Antes de secuenciar las muestras se purifica el DNA utilizando el kit comercial QIA quick PCR purification Kit (Qiagen[®], Hilden, Alemania).

1. Transferir a un tubo QIAquick de centrifugado 200 μL de tampón de unión PB y el producto de la nested-PCR.
2. Centrifugar a 13,000 rpm durante 1 minuto. Eliminar sobrenadante.
3. Añadir 750 μL de tampón de lavado PE.
4. Centrifugar a 13,000 rpm durante 1 minuto. Eliminar sobrenadante (x2)
5. Transferir la unidad de filtro a un tubo Eppendorf y añadir 15-35 μL de agua destilada.
6. Incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
7. Centrifugar a 13,000 rpm durante 1 minuto. Eliminar la unidad de filtro.

H) Secuenciación

1. Se prepara un volumen total de 10 μL , de una mezcla que contiene: 3-5 μL de DNA purificado, 2 μL de colorante y 3 μL de agua destilada.
2. Incubar la mezcla a 60°C hasta que se evapore todo el líquido.

ANEXO VII. Protocolo de extracción de esteroides en muestras fecales

1. Secado de las muestras en estufa (modelo Conterm; J.P. Selecta[®], Barcelona, España) a 36°C durante 48h para eliminar la humedad.
2. Triturado manual de las muestras.
3. Pesado de las muestras: se pesaron 0.3 g de heces secas.
4. A cada muestra se le añadió 2,5 mL de agua destilada y 3 mL de metanol.
5. Se agitaron en un vórtex durante 30' para conseguir una buena homogenización.
6. Centrifugado de las muestras en centrífuga (modelo EBA 12; Hettich[®], Tuttlingen, Alemania) a 3000 rpm durante 15'.
7. Se tomó 2 mL de sobrenadante y se transfirieron a tubos Eppendorf.
8. Los tubos se mantuvieron en el congelador a -80°C hasta su cuantificación mediante la técnica de ELISA.

ANEXO VIII. Protocolo de cuantificación de cortisol fecal

1. Preparación de los estándares:

Estándar A: solución stock 1 μ L (1 μ g/mL).

Estándar B: mezclar 20 μ L del estándar A y 980 μ L de EIA buffer (20 ng/mL)

Estándar C: mezclar 150 μ L del estándar B y 1,350 μ L de EIA buffer (2 ng/mL).

Estándar D: mezclar 150 μ L del estándar C y 1,350 μ L de EIA buffer (0.2 ng/mL)

2. Diluir el conjugado hormona-enzima: mezclar 5,500 μ L de EIA buffer y 110 μ L de Conjugado hormona-enzima

3. Placa ELISA: 50 μ L de estándar y muestras problema.

4. Placa ELISA: añadir 50 μ L de Conjugado hormona-enzima

5. Agitar suavemente la placa.

6. Incubar a T^a ambiente durante 1h.

7. Preparar solución de lavado: mezclar 180 mL de agua destilada y 20 mL de solución de lavado.

8. Verter el contenido de la placa ELISA.

9. Lavar cada pocillo con 300 μ L de solución de lavado (x3).

10. Añadir 150 μ L de sustrato a cada pocillo.

11. Incubar durante 30 minutos a T^a ambiente.

12. Añadir 150 μ L de HCl a cada pocillo

13. Lectura a 650 nm

IX. BIBLIOGRAFÍA

Abbott, D.H., Keverne, D.B., Bercovitch, F.B., Shively, C.A., Mendoza, S.P., Saltzman, W., Snowdown, C.T., Ziegler, T.E., Banjevic, M., Garland, T., and Sapolsky, R.M., 2003. Are subordinates always stressed, a comparative analysis of rank. *Horm. Behav.* 43:67–82.

Abdelsalam, I.M., Sarhan, R., and Hanafy, A., 2017. The impact of different copro-preservation conditions on molecular detection of *Cryptosporidium* species. *Iran. J. Parasitol.* 12(2):274-283.

Aerts, J., Metz, J.R., Ampe, B., Decosteres, A., Filk, G., De Saeger, S., 2015. Scales tell a story on the stress history of fish. *PLOS One.* 10(4):e0123411.

Accorsi, P., Carloni, E., Valsecchi, P., Viggiani, R., Gamberoni, M., Tamanini, C., and Seren, E., 2008. Cortisol determination in hair and faeces from domestic cats and dogs. *Gen. Comp. Endocrinol.* 155:398–402.

Addie, D.D., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., Gruffydd-Jones, T., Hartmann, K., Horzinek, M.C., Hosie, M.J., Lloret, A., Lutz, H., Marsilio, F., Pennisi, G.P., Radford, A.D., Thiry, E., Truyen, U., Möstl, K., 2015. Disinfectant choices in veterinary practices, shelters and households. ABCD guidelines on safe and effective disinfection for feline environments. *J. Fel. Med Surg.* 17:594-605.

Alles, A.J., Waldron, M.A., Sierra, L.S., and Mattia, A.R., 1995. Prospective comparison of direct immunofluorescence and conventional staining methods for detection of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. in human fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.* 33(6): 1632–1634.

Andersen, L.A, Levy, J.K., McManus, C.M., McGorray, S.P., Leutenegger, C.M., Piccione, J., Blackwelder, L.K., and Tucker, S.J., 2018. Prevalence of enteropathogens in cats with and without diarrhea in four different management models for unowned cats in the southeast United States. *Vet. J.* 236:49-55.

Andersen, Y.S., Gillin, F.D., and Eckmann, L., 2006. Adaptive immunity-dependent intestinal hypermotility contributes to host defense against *Giardia* spp. *Infec. Immun.* 74(4): 2473–2476.

Amat, M., Camps, T., Manteca, X., 2016, Stress in owned cats: behavioural changes and welfare implications. *J. Fel. Med. Surg.* 18(8):577–586.

Análisis y Caracterización del sector de los animales de compañía, 2015. <https://www.mapama.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/20160222_informeestudioparapublicar_tcm30-104720>

- Ankarlev, J., Jerlstrom-Hultqvist, J., Ringqvist, E., Troell, K., and Svärd, S.G., 2010. Behind the smile, cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Microbiol.* 8:413-422.
- Arbabi, M., and Hooshyar, H., 2009. Gastrointestinal parasites of stray cats in Kashan, Iran. *Trop. Biomed.* 26(1): 16–22.
- Aurich, J., Wulf, M., Ille, N., Erber, R., Von Lewinski, Palme, R., and Aurich, C., 2015. Effects of season, age, sex, and housing on salivary cortisol concentrations in horses. *Domest. Anim. Endocrinol.* 52:11–16.
- Bahr, N.I., Palme, R., Möhle, U., Hodges, J.K., and Heistermann, M., 2000. Comparative aspects of the metabolism and excretion of cortisol in three individual nonhuman primates. *Gen. Comp. Endocrinol.* 117:427–438.
- Bajer, A., Bednarska, M., Rodo, A., 2011. Risk factors and control of intestinal parasites infections in sled dogs in Poland. *Vet. Parasitol.* 175:343-350.
- Balaji, R., Wright K.J., Turner, J.L., Hill, C.M., Dritz, S.S., Fenwick, B., Carroll, J.A., Zannelli, M.E., Beausang, L.A., and Minton, J.E., 2002. Circulating cortisol, tumor necrosis factor- α interleukin-1 β , and interferon- γ in pigs infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J. Anim. Sci.* 80:202–207.
- Balaji, R., Wright K.J., Hill, C.M., Dritz, S.S., Knoppel, E.L., and Minton, J.E., 2000. Acute phase responses of pigs challenged orally with *Salmonella typhimurium*. *J. Anim. Sci.* 78:1885–1891.
- 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. Parasitol.* 26:180-189.
- Barash, N.R., Maloney, J.G., Singer, S.M., and Dawson, S.C., 2017. *Giardia* alters commensal microbiota diversity throughout the murine gut. *Infect. Immun.* 85(6):e00948-16.
- Bardi, M., Shimizu, K., Barrett, G.M., Borgonini-Tarli, S.M., and Huffman, M.A., 2003. Peripartum cortisol levels and mother-infant interactions in Japanese macaques. *Am. J. Phys. Anthropol.* 120:298–304.
- Barja, I., Silvan, G., Martínez-Fernández, L., and Illera, J.C., 2011. Physiological Stress Responses, Fecal Marking Behavior, and Reproduction in Wild European Pine Martens (*Martes martes*). *J. Chem. Ecol.* 37:253–259.

- Barja, I., Silvan, G., and Illera, J.C., 2008. Relationships between sex and stress hormone levels in feces and marking behavior in a wild population of Iberian wolves (*Canis lupus signatus*). *J. Chem. Ecol.* 34(6):697-701
- Barr, S.C., Bowman, D.D., Hollis, N.E., 1992. Evaluation of two procedures for diagnosis of giardiasis in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 53:2028–2031.
- Bartelt, L.A., and Sartor, R.B., 2015. Advances in understanding *Giardia*: determinants and mechanisms of chronic sequelae. *F1000 Prime. Rep.* 62(7):1-14.
- Barutzki, D., and Schaper, R., 2003. Endoparasites in dogs and cats in Germany 1999-2002. *Parasitol. Res.* 90:S148-S150.
- Becker, A. C., Rohen, M., Epe, C., and Schnieder, T., 2012. Prevalence of endoparasites in stray and fostered dogs and cats in Northern Germany. *Parasitol. Res.* 111:849-857.
- Behnke, J., Bajer, A., Sinski, E., and Wakelin, D., 2001. Interactions involving intestinal nematodes of rodents, experimental and field studies. *Parasitol.* 122:S39-249.
- Berkvens, C.N., Hyatt, C., Gilman, C., Pearl, D.L., Barker, I.K., and Mastromonaco, G.F., 2013. Validation of a shed skin corticosterone enzyme immunoassay in the African house snake (*Lamprophis fuliginosus*) and its evaluation in the Eastern Massasauga rattlesnake (*Sistrurus catenatus catenatus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 194:1–9.
- Bertrand, I., Albertini, L., and Schwartzbrod, J., 2005. Comparison of two target genes for detection and genotyping of *Giardia lamblia* in human feces by PCR and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism. *J. Clin. Microbiol.* 43(12): 5940–5944.
- Beser, J., Toresson, L., Eitrem, R., Troell, K., Winięcka.Krusnell, J., and Lebbad, M., 2017. Possible zoonotic transmission of *Cryptosporidium felis* in a household. *Infect. Ecol. Epidemiol.* 5:1-5.
- Beugnet, F., Bourdeau, P., Chalvet-Montfray, K., Cozma, V., Farkass, R., Guillot, J., Halos, L., Joachim, A., Losson, B., Miró, G., Otranto, D., Renaud, M., and Rinaldi, L., 2014. Parasites of domestic owned cats in Europe, co-infestations and risk factors. *Parasit. Vectors.* 7:291-304.
- Bisset, S. A., Stone, M. L., Malik, R., Norris, J. N., O'Brien, C., Mansfield, C. S., Nicholls, J. M., Griffin, A., and Gookin, J. L., 2009. Observed occurrence of *Tritrichomonas foetus* and other enteric parasites in Australian cattery and shelter cats. *J. Fel. Med. Surg.* 11:803-807.

- Blagburn B.L., and Butler J.M., 2006. Optimize intestinal parasite detection with centrifugal fecal flotation. *Vet. Med.* 101:455e63.
- Blasco, X., Salas, A., Manuelian, C.L., Torre, C., and Ortuño, A.M., 2017. Intestinal parasitic infection in multi-cat shelters in Catalonia *Isr. J. Vet. Med* 72(3):16-21.
- Borji, H., Razmi, G., Ahmadi, A., Karami, H., Yaghfoori, S., Abedi, V., 2011. A survey on endoparasites and ectoparasites of stray cats from Mashhad (Iran) and association with risk factors. *J. Parasit. Dis.* 35:202-206.
- Bortolotti, G.R., Mougeot, F., Martinez-Padilla, J., Webster, L.M., and Piertney, S.B., 2009. Physiological stress mediates the honesty of social signals. *PLOS One.* 4(3):e4983.
- Bowman, D.D., 2013. *Georgi's Parasitology for Veterinarians.* Elsevier.
- Bowman, D.D. and Lucio-Forster, A., 2010. Cryptosporidiosis and giardiasis in dogs and cats: Veterinary and public health importance. *Exper. Parasitol.* 124:121-127.
- Bowman, D.D, Montgomery, S.P., Zajac, A.M., Eberhard, M.L., and Kazaco, K.R., 2010. Hookworms of dogs and cats as agents of cutaneous larva migrans. *Trends. Parasitol.* 26(4):162-167.
- Bowman, D.D., Hendrix, C.M., Lindsay, D.S., and Barr, S.C., 2002. *Feline Clinical Parasitology.* Iowa State University Press.
- Bouزيد, M., Halai, K., Jeffreys, D., Hunter, P.R., 2015. The prevalence of *Giardia* infection in dogs and cats, a systematic review and meta-analysis of prevalence studies from stool samples. *Vet. Parasitol.* 207:181-202.
- Bouزيد, M., Hunter, P., Chalmers, R.M., and Tyler, K.M., 2013. *Cryptosporidium* pathogenicity and virulence. *Clin. Microbiol. Rev.* 26(1): 115–134.
- Bouزيد, M., Steverding, D., and Tyler, K.M., 2008. Detection and surveillance of waterborne protozoan parasites. *Curr. Op. Biotechnol.* 19:302-306.
- Broadley, H.M., McCobb, D.C., and Slater, M.R., 2014. Effect of single-cat versus multi-cat home history on perceived behavioral stress in domestic cats (*Felis silvestrus catus*) in an animal shelter. *J. Fel. Med.Sur.* 16(2) 137–143.

- Brown, J.L., 2006. Comparative endocrinology of domestic and non-domestic felids. *Theriogenol.* 66:25–36.
- Buchanan, K.L., and Goldsmith, A.R., 2004. Noninvasive endocrine data for behavioural studies, the importance of validation. *Anim. Behav.* 67:183e185.
- Buret, A.G., 2007. Mechanisms of epithelial dysfunction in giardiasis. *Gut.* 56:316–317.
- Cacciò, S.M., and Chalmers, R.M., 2016. Human cryptosporidiosis in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 22:471–480.
- Cacciò, S.M., and Ryan, U., 2008. Molecular epidemiology of giardiasis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 160: 75-80.
- Cacciò, S.M., Beck, R., Lalle, M., Marinculic, A., and Pozio, E., 2008. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblages A and B. *Int. J. Parasitol.* 38(13): 1523-1531.
- Cantacessi, C., Giacomi, P., Croese, J., Zakrzewski, M., Sotillo, J., McCann, L., Nolan, M.J., Miterva, M., Krause, L., and Loukas, A., 2014. Impact of experimental hookworm infection on the human gut microbiota. *J. Infect. Dis.* 210:1431–4.
- Capári, B., Hamel, D., Visser, M., Winter, R., Pfister, K., Rehbein, S., 2013. Parasitic infections of domestic cats, *Felis catus*, in western Hungary. *Vet. Parasitol.* 192:33-42.
- Caplecha, V., Svoboda, M., Cepicka, I., Husnik, R., Horackova, K., and Svobodova, V., 2013. InPouch TF-Feline medium is not specific for *Tritrichomonas foetus*. *Vet. Parasitol.* 196:503-505.
- Carabotti, M., Scirocco, A., Maselli, M.A., and Severi, C., 2015. The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. *Ann. Gastroenterol.* 28(2):203–209.
- Carlstead, K., Brown, J.L., and Strawn, W., 1993. Behavioral and physiological correlates of stress in laboratory cats. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 38:143-158.
- Carr, J.A., 2002. Stress, neuropeptides, and feeding behavior: A comparative perspective. *Integ. Comp. Biol.* 42:582–590.

Cavigelli, S.A., Monfort, S.L., Whitney, T.K., Mechref, Y.S., Novotny, N., and McClintock, M.K., 2005. Frequent serial fecal corticoid measures from rats reflect circadian and ovarian corticosterone rhythms. *J. Endocrinol.* 184:153–163.

Chalmers, R.M., and Katzer, F., 2013. Looking for *Cryptosporidium*: the application of advances in detection and diagnosis. *Trend. Parasitol.* 29(5):237-251.

Chalmers, R.M., Campbell, B.M., Couch, N., Charlett, A., and Davies, A.P., 2011. Comparison of diagnostic sensitivity and specificity of seven *Cryptosporidium* assays used in the UK. *J. Med. Microbiol.* 60, 1598–1604.

Chapman, C.A., Wasserman, M.D., Gillespie, T.R., Speirs, M.L., Lawes, M.J., Saj, T.L., and Ziegler, T.E., 2006. Do food availability, parasitism, and stress have synergistic effects on red colobus populations living in forest fragments? *Am. J. Physic. Anthropol.* 31:525–534.

Charmandari, E., Tsigos, C., and Chrousos, G., 2005. Endocrinology of the stress response. *Annu. Rev. Physiol.* 67:259–84.

Chatdarong, K., Ponglowhapan, S., Karlsson, A., and Linde-Forsberg, C., 2006. The effect of ACTH stimulation on cortisol and progesterone concentrations in intact and ovariectomized domestic cats. *Theriogenol.* 66:1482–1487.

Chen, X-M., O'Hara, S.P., Huang, B.Q., Nelson, J.B., Jung-Ching, J., Zhu, G., Ward, H.D., and Larusso, N.F., 2004. Apical organelle discharge by *Cryptosporidium parvum* is temperature, cytoskeleton, and intracellular calcium dependent and required for host cell invasion. *Infect. Immun.* 72(12): 6806–6816.

Chen, X-M., Keithly, J.S., Paya, C.V., and Larusso, N.F., 2002. Cryptosporidiosis. *N. Engl. J. Med.* 346(22):1723-1731.

Chow, J., Lee, S.M., Shen, Y., Khosravi, A., and Mazman, S.K., 2010. Host-bacterial symbiosis in health and disease. *Adv. Immunol.* 107:243–274.

Clemente, J.C., Ursell, L.K., Parfrey, L.W., and Knight, R., 2012. The impact of the gut microbiota on human health, An integrative view. *Cell.* 148(6): 1258–1270.

Coelho, W. M. D., Amarante, F. T., Soutello, R. V. G., Meireles, M. V., and Bresciani, K. D. S., 2009. Occurrence of gastrointestinal parasites in fecal samples of cats in Andradina City, Sao Paulo. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 18:46-49.

Cordero del Campillo, M., Rojo Vázquez, F.A., Martínez Fernández, A.R., Sánchez Acedo, C., Hernández Rodríguez, S., Navarrete López-Cozar, J., Díez Baños, P., Quiroz Romero, H., and Carvalho Varela, M., 1999. *Parasitología Veterinaria*. McGraw-Hill Interamericana.

Cox, F.E., 2001. Concomitant infections, parasites and immune responses. *Parasitol.* 122:S23-S38.

Creel, S., Christianson, C., and Schuette, P., 2013. Glucocorticoid stress responses of lions in relationship to group composition, human land use, and proximity to people. *Conserv. Physiol.* 1:1-9.

Creel, S., Dantzer, B., Goymann, W., and Rubenstein, D., 2013. The ecology of stress: effects of the social environment. *Funct. Ecol.* 27:66–80.

Dado, d., Montoya, A., Blanco, M.A., G., Saugar, J.M., Bailo, B., and Fuentes, I., 2012. Prevalence and genotypes of *Giardia duodenalis* from dogs in Spain: possible zoonotic transmission and public health importance. *Parasitol. Res.* 111:2419–2422.

De Vries, A.C., Glasper, E.R., and Detillion, C.E., 2003. Social modulation of stress response. *Physiol. Behav.* 79:399–407.

Despommier, D., 2003. Toxocariasis clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular aspects. *Clin. Microbiol. Rev.* 16(2):265–272.

Dettmer, A.M., Novak, M.A., Meyer, J.S., and Suomi, S.J., 2014. Population density-dependent hair cortisol concentrations in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Psychoneuroendocrinol.* 42:59–67.

Devillard, S., Say, L., and Pontier, D., 2003. Dispersal pattern of domestic cats (*Felis catus*) in a promiscuous urban population: do females disperse or die?. *J. An. Ecol.* 72:203–211.

Discroll, C.A., Macdonald, D.W., and O'Brien, S.J., 2009. From wild animals to domestic pets, an evolutionary view of domestication. *PNAS.* 106(1):9971-9978.

Dorny, P., Praet, N., Deckers, N., and Gabriel, S., 2009. Emerging food-borne parasites. *Vet. Parasitol.* 163:196-206.

Dos Santos, C.S., McIntosh, D., Berto, B.P., Lúcia, V., De Jesus, T., Da Rocha, N.C., Fernandes, I., Scott, F.B., and Lopes, C.W., 2015. Diagnosis of *Pentatrichomonas hominis* from domestic cats in Southeastern Brazil. *Rev. Bras. Med. Vet.* 37(1):25-31.

Doumecq, M., and Soto, P., 2012. *Tritrichomonas foetus*, mechanisms of pathogenic action. *Vet.* 14(2): 151-161.

Dryden, M.W, Payne, P.A., and Smith, V., 2006. Accurate diagnosis of *Giardia* spp. and proper fecal examination procedures. *Vet. Therap.* 7(1):4-14.

Dryden, M.W., Payne, P.A., Ridley, R., and Smith, V., 2005. Comparison of common fecal flotation techniques for the recovery of parasite eggs and oocysts. *Vet. Therap.* 6(1):15-28.

Duarte, A., Jenkins, T.P., Latrofa, M.S., Giannelli, A., Papadopoulos, E., Carvalho, L.M., Nolan, M.J., Otranto, D., and Cantacessi, C., 2016. Helminth infections and gut microbiota, a feline perspective. *Parasit. Vectors.* 9:62-71.

Duarte, A., Castro, I., Pereira da Fonseca, I. M., Almeida, V., Madeira de Carvalho, L. M., Meireles, J., Fazendeiro, M. I., Tavares, and L., Vaz, Y., 2010. Survey of infectious and parasitic diseases in stray cats at the Lisbon metropolitan area, Portugal. *J. Fel. Med. Surg.* 12:441-446.

Dubey, J.P., 2014. Life cycle of *Cystoisospora felis* (Coccidia: Apicomplexa) in cats and mice. *J. Eukaryot. Microbiol.* 61(6):637-643.

Dubey, J.P., Ferreira, L.R., Martins, J., and Jones, J.L., 2011. Sporulation and survival of *Toxoplasma gondii* oocysts in different types of commercial cat litter. *J. Parasitol.* 97(5):751-754.

Dubey, J.P., 1993. Intestinal protozoa infections. *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.* 23(1):37-55.

Dumbell, R., Matveeva, O., and Oster, H., 2016. Circadian clocks, stress and immunity. *Front. Endocrinol.* 7:37.

Dyachenko, V., Pantchev, N., Gawlowska, S., Vrhovec, M.G., and Bauer, C., 2008. *Echinococcus multilocularis* infections in domestic dogs and cats from Germany and other European countries. *Vet. Parasitol.* 157:244-253.

- Edwards, D.I., 1993. Nitroimidazole drugs: action and resistance mechanisms. I. mechanism of action. *J. Antimicrob. Chemoter.* 31(1):9-20.
- Einarsson, E., Ma'ayeh, S., and Svärd, S., 2016. An up-date on *Giardia* and giardiasis. *Curr. Opin. Microbiol.* 34:47–52.
- Elmendorf, H., Dawsonb, S.C., and McCaffery, M., 2003. The cytoskeleton of *Giardia lamblia*. *Int. J. Parasitol.* 33:3-28.
- Epe, C., Rehker, G., Schnieder, T., Lorentzen, L., and Kreienbrock, L., 2010. *Giardia* in symptomatic dogs and cats in Europe, Results of a European study. *Vet. Parasitol.* 173:32-38.
- Epe, C., 2006. Current and future options for the prevention and treatment of canids. In: Holland, C.V., Smith, H.V., (Eds), *Toxocara*: Wallingford, Oxfordshire, UK, 339-252.
- Esch, K.J., and Petersen, C.A., 2013. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. *Clin. Microbiol. Rev.* 26(1): 58–85.
- Fahrion, A.S., Schnyder, M., Wichert, B., Deplazes, P., 2011. *Toxocara* eggs shed by dogs and cats and their molecular and morphometric species-specific identification: Is the finding of *T. cati* eggs shed by dogs of epidemiological relevance?. *Vet. Parasitol.* 177:186-189.
- Fanson, K.V., Wielebnowski, N.C., Shenk, T.M., and Lucas, J.R., 2012. Comparative patterns of adrenal activity in captive and wild Canada lynx (*Lynx canadensis*). *J. Com. Physiol. B.* 182:157–165.
- Fayer, R., Santín, M., and Macarisin, D., 2010. *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. in animals and humans. *Vet. Parasitol.* 172:23-32.
- Félix, A.S., Faustino, A.I., Cabral, E.M., and Oliveira, R.F., 2013. Noninvasive measurements of steroid hormones in zebrafish holding-water. *Zebrafish.* 10(1):110-115
- Feng, X., Wu, X., Morrill, R.J., Li, Z., Li, C., Yang, S., Li, Z., Cui, D., Lv, L., Hu, Z., Zhang, B., Yin, Y., Guo, L., Qin, D., and Hu, X., 2016. Social correlates of the dominance rank and long-term cortisol levels in adolescent and adult male rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Sci. Rep.* 6:25431.

- Feng, Y., and Xiao, L., 2011. Zoonotic potential and epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 110-140.
- Finka, L.R., Ellis, S.L., and Stavisky, J., 2014. A critically appraised topic (CAT) to compare the effects of single and multi-cat housing on physiological and behavioural measures of stress in domestic cats in confined environments. *BMC. Vet. Res.* 10:73-84.
- Finkler, H., and Tekler, J., 2010. Cortisol levels and aggression in neutered and intact free-roaming female cats living in urban social groups. *Physiol. Behav.* 99:343–347.
- Fisher, M., 2003. *Toxocara cati*: an underestimated zoonotic agent. *Trends. Parasitol.* 19:167-170.
- Fletcher, S.M., Stark, D., Harkness, J., and Ellis, J., 2012. Enteric protozoa in the developed world: a public health perspective. *Clin. Microbiol. Rev.* 420-449.
- Food and Drug Administration, 2015. Analytical Procedures and methods validation for drugs and biologics. *Guid. Ind.* 1-15.
- Foster, D.M, Gookin, J.L., Poore, M.F., Stebbins, M.E., and Levy, M.G., 2004. Outcome of cats with diarrhea and *Tritrichomonas foetus* infection. *JAVMA.* 225(6):888-892.
- Fraser, D., Weary, D.M., Pajor, E.A., and Milligan, B.N., 1997. A scientific conception of animal welfare that reflects ethical concerns. *Anim. Welf.* 6:187-205.
- Fraser, D., Ritchie, J.S., and Fraser, A.F., 1975. The term ‘stress’ in a veterinary context. *Br. Vet. J.* 131:653-662.
- Frenkel, J., 1977. *Besnoitia wallacei* of cats and rodents: With a reclassification of other cyst-forming isosporid coccidian. *J. Parasitol.* 63(4):611-628.
- Fuentes, I., Gutiérrez, M.J., and Gárate, T., 2010. Diagnóstico de las parasitosis intestinales mediante detección de coproantígenos. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 28(1):33-39.
- Fuller, g., Murray, A., Thueme, M., McGuire, M., Vonk, J., and Allard, S., 2017. Behavioral and hormonal responses to the availability of forage material in Western lowland gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*). *Zoo. Biol.* 1–12.

Fundación Affinity Petcare S.A., Infografía del estudio de abandono y adopción en 2018. <<https://www.fundacion-affinity.org/observatorio/infografia-estudio-de-abandono-y-adopcion-2018>>

Galeandro, L., Sieber-Ruckstuhl, N.S., Riond, B., Hofmann-Lehmann, R., Reusch, C.E., and Boretti, F.S., 2014. Urinary corticoid concentrations measured by 5 different immunoassays and gas chromatography-mass spectrometry in health dogs and dogs with hypercortisolism at home and in the hospital. *J. Vet. Intern. Med.* 28(5):1433–1441.

García, L.S., Shimizu, R.Y., Novak, S., Carroll, M., and Chan, F., 2003. Commercial assay for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens by rapid solid-phase qualitative immunocromatography. *J. Clin. Microbiol.* 41(1): 09–212

Gates, M.C., and Nolan, T.J., 2009. Endoparasite prevalence and recurrence across different age groups of dogs and cats. *Vet. Parasitol.* 166:153–158.

Gelanew, T., Lalle, M., Hailu, A., Pozio, E., and Cacciò, S.M., 2007. Molecular characterization of human isolates of *Giardia duodenalis* from Ethiopia. *Acta. Tropica.* 102:92-99.

Genbank: Nucleotide Blast

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome>

Generalitat de Catalunya. Ley 22/2003, del 4 de julio, de protección y defensa de los animales de compañía. Comunidad Autónoma de Cataluña.

<<http://vlex.com/vid/llei-4-proteccio-dels-animals-15727709>>

Genovesi, P., Besa, M., and Toso, S., 1995. Ecology of a feral cat (*Felis catus*) population in an agricultural area of Northern Italy. *Wildl. Biol.* 1(4):233–237.

Gesquire, L.R., Learn, N.H., Simao, M.C., Onyango, P.O., Alberts, S.C., and Altmann, J., 2011. Life at the top, rank and stress in wild male baboons. *Science.* 333(6040):357-360.

Gesto, C.M., Hernández, J., López-Patiño, M.A., Soengas, J.L., and Míguez, J.M., 2015. Is grill cortisol concentration a good acute stress indicator in fish? A study in rainbow trout and zebrafish. *Comp. Biochem. Physiol.* 188:65–69.

- Geurden, T., Berkvens, D., Casaert, S., Vercruyse, J., Claerebout, E., 2008. A Bayesian evaluation of three diagnostic assays for the detection of *Giardia duodenalis* in symptomatic and asymptomatic dogs. *Vet. Parasitol.* 157:14–20.
- Geurden, C., Vercruyse, J., and Claerebout, E., 2006. Field testing of a fenbendazole treatment combined with hygienic and management measures against a natural *Giardia* infection in calves. *Vet. Parasitol.* 142:367–371.
- Gil, H., Cano, L., Lucio, A., Bailo, B., De Mingo, M.H., Cardona, G.A., Fernández-Basterra, J.A., Aramburu-Aguirre, J., López-Molina, N., and Carmena, D., 2017. Detection and molecular diversity of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in sheltered dogs and cats in Northern Spain. *Infect. Genet. Evol.* 50:62–69.
- Gillespie, T.R., Barelli, C., and Heistermann, M., 2013. Effects of social status and stress on patterns of gastrointestinal parasitism in wild white-handed gibbons (*Hylobates lar*). *Am. J. Physic. Anthropol.* 150:602–608.
- Gookin, J.L., Hanrahan, K., and Levy, M.G., 2017. The conundrum of feline trichomoniosis. The more we learn, the “trickier” it gets. *J. Fel. Med. Surg.* 19:261–274.
- Gookin, J.L., Foster, D.M., Poore, M.F., Stebbins, M.E., and Levy, M.G., 2003. Use of commercially available culture system for diagnosis of *Tritrichomonas foetus* in cats. *JAVMA.* 222(10):1376–1379.
- Gookin, J.L., Levy, M.G., Papich, M.G., Poore, M.F., and Breitschwerdt, E.B. 2001. Experimental infection of cats with *Tritrichomonas foetus*. *Am. J. Vet. Res.* 62(11):1690–1697.
- Gookin, J.L., Breitschwerdt, E.B., Levy, M.G., Gager, R.B., and Benrund, J.G., 1999. Diarrhea associated with trichomoniosis in cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 215(10):1450–1454.
- Gotfred-Rasmussen, H., Lund, L., Enemark, L.E., Erlandsen, M., and Petersen, E., 2016. Comparison of sensitivity and specificity for 4 methods for detection of *Giardia duodenalis* in feces, immunofluorescence and PCR are superior to microscopy of concentrated iodine-stained samples. *Diag. Microb. Infect. Dis.* 84(3):187–190.
- Goyal, N., Rishi, P., and Shukla, G., 2013. *Lactobacillus rhamnosus* GG antagonizes *Giardia intestinalis* induced oxidative stress and intestinal disaccharidases: an experimental study. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 29:1049–1057.

Gow, R., Thomson, S., Rieder, M., Van uum, S., and Koren, G., 2010. An assessment of cortisol analysis in hair and its clinical application. *Forensic. Sci. Int.* 196:32–37.

Gow, A.G., Gow, D.J., Hall, E.J., Langton, D., Clarke, C., and Pappasoulotis, K., 2009. Prevalence of potentially pathogenic enteric organisms in clinically healthy kittens in the UK. *J. Fel. Med. Surg.* 11:655-662.

Gracenea, M., Gómez, M.S., and Torres, J., 2009. Prevalence of intestinal parasites in shelter dogs and cats in the metropolitan area of Barcelona (Spain). *Acta. Parasitol.* 54(1), 73–77.

Graham, L.H., and Brown, J.L., 1996. Cortisol metabolism in the domestic cat and implications for non-invasive monitoring of adrenocortical function in endangered felids): unfortunately, many felid species void urine by “spraying,” thus limiting the practicality of this approach. *Zoo Biol.* 15:71-82.

Grellet, A., Polack, B., Feugier, A., Baralon-Boucraut, C., Grandjean, D., Vandewynckel, L., Cian, A., Meloni, D., and Viscogliosi, E., 2013. Prevalence, risk factors of infection and molecular characterization of trichomonads in puppies from French breeding kennels. *Vet. Parasitol.* 197: 418– 426.

Gruffydd-Jones, T., Addie, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Egbernik, H., Frymus, T., Hartmann, K., Hosie, M.J., Lloret, A., Lutz, H., Marsilio, F., Möstl, K., Pennisi, M.G., Radford, A.D., Thiry, E., Truyen, U., and Horzinek, M.C., 2013a. Giardiasis in cats. ABCD guidelines on prevention and management. *J. Fel. Med. Surg.* 15:650-652.

Gruffydd-Jones, T., Addie, D., Belákm S., Boucraut-Baralon, Egberkin, H., Frymus, T., Hartman, K., Hosie, M.J., Lloret, A., Lutz, H., Marsilio, F., Möstl, K., Pennisi, M.G., Radford, A.D., Thiry, E., Truyen, U., and Horzinek, M.C., 2013b. Tritrichomoniasis in Cats: ABCD guidelines on prevention and management. *J. Fel. Med. Surg.* 15:647-649.

Halliez, M.C., and Buret, A.C., 2013. Extra-intestinal and long term consequences of *Giardia duodenalis* infections. *World. J. Gastroenterol.* 19(47):8974-8985.

Hansen, A., Skarbye, L.K., Vinther, L.M., Willesen, J.L., Pipper, C.B., Olsen, C.S., and Mejer, H., 2016. Occurrence and clinical significance of *Aelurostrongylus abstrusus* and other endoparasites in Danish cats. *Vet. Par.* 1-30.

Heyworth, M.F., 2016. *Giardia duodenalis* genetic assemblages and hosts. *Parasite.* 23:13.

- Hernández-Jáuregui, D.M., Maldonado, F.A., Pérez, R.A., Pardo, M.R., and De Aluja, A.s., 2005. Cortisol in saliva, urine, and feces: Non-invasive assessment of wild animals. *Vet. Méx.* 36(3):325-337.
- Hinney, B., Ederer, C., Stengl, C., Wilding, K., Štrkolcová, G., Harl, J., Flechl, E., Fuehrer, H-P., and Joachim, A., 2015. Enteric protozoa of cats and their zoonotic potential, a field study from Austria. *Parasitol. Res.* 114:2003-2006.
- Hoepelman, A.I., 1996. Current therapeutic approaches to cryptosporidiosis in immunocompromised patients. *J. Antimicrob. Chemother.* 37:871-880.
- Holliday, M., Deni D., and Gunn-Moore, D.A., 2009. *Tritrichomonas foetus* infection in cats with diarrhoea in a rescue colony in Italy. *J. Fel. Med. Surg.* 11:131-134
- Huang, D.B., and White, A.C., 2006. An updated review on *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Gastroenterol. Clin. N. Am.* 35:291-314.
- Huber, S., Palme, R., and Arnold, W., 2003. Effects of season, sex, and sample collection on concentrations of fecal cortisol metabolites in red deer (*Cervus elaphus*). *Gen Comp Endocrinol.* 130:48–54.
- Hulsman, a., Dalerum, F., Ganswindt, A., Muenscher, S., Bertschinger, H.J., and Paris, M., 2011. Non-invasive monitoring of glucocorticoid metabolites in brown hyaena (*Hyaena brunnea*) feces. *Zoo Biol.* 30:451–458.
- Humen, M.A., De Antoni, G.L., benyacoub, J., Costas, M.E., Cardozo, M.I., Kozubsky, L., Saudan, K-Y., Boenzli-Bruand, A., Blum, S., Schiffrin, E.J., and Pérez, F., 2004. *Lactobalillus johnsonii* LA1 antagonizes *Giardia intestinalis* in vivo. *Infec. Immun.* 73(2): 1265–1269.
- Inpankaew, T., Schär, F., Odermatt, P., Dalsgaard, A., Chimnoi, W., Khieu, V., Muth, S., Traub, R.J., 2014. Low risk of transmission of zoonotic *Giardia duodenalis* from dogs to humans in rural Cambodia. *Parasit. Vectors.* 7: 414-416.
- Ito, Y., Itoh, N., Kimura, Y., and Kanai, K., 2016. Prevalence of intestinal parasites in breeding cattery cats in Japan. *J. Fel. Med. Surg.* 18(10) 834–837.
- Ito, N., Ito, T., Kromminga, A., Bettermann, A., Takigawa M., Kees F., Straub R., Paus R., 2005. Human hair follicles display a functional equivalent of the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis and synthesize cortisol, *FASEB J.* 10:1332–1334.

Itoh, N., Ikegami, H., Takagi, M., Ito, Y., Kanai, K., Chikazawa, S., Hori, Y., Hoshi, F., and Higuchi, S., 2012. Prevalence of intestinal parasites in private-household cats in Japan. *J. Fel. Med. Surg.* 14:436.

Janeczko, S., and Griffin, B., 2010. *Giardia* infection in cats. *Compend. Contin. Educ. Vet.* 32(8):E4.

Joffe, D., Van Niekerk, D., Gagné, F., Gilleard, J., Kutz, S., Lobingier, R., 2011. The prevalence of intestinal parasites in dogs and cats in Calgary, Alberta. *Can. Vet. J.* 52:1323-1328.

Johnstone, C.P., Reina, R.D., and Lill, A., 2012. Interpreting indices of physiological stress in free-living vertebrates. *J Comp Physiol.*182:861–879.

Keay, J., Singh, J., Gaunt, M.C., and Kaur, T., 2006. Fecal glucocorticoids and their metabolites as indicators of stress in various mammalian species. A literature review. *J. Zoo. Wild. Med.* 37(3):234–244.

Kenagy, G.J., and Place, N.J., 2000. Seasonal changes in plasma glucocorticosteroids of free-living female yellow-pine chipmunks: Effects of reproduction and capture and handling. *Gen. Comp. Endocrinol.* 117:189-199.

Kessler, M.R., and Turner, D.C., 1997. Stress and adaptation of cats (*Felis silvestris catus*) housed singly, in pairs and in groups in boarding catteries. *Anim. Welf.* 6:243-254.

Khan, M.Z., Altmann, J., Isani, S.S., and Yu, J., 2002. A matter of time: evaluating the storage of fecal samples for steroid analysis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 128:57–64.

Klasing, K.C., 2005. Potential impact of nutritional strategy on noninvasive measurements of hormones in birds. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1046:5–16.

Khademvatan, S., Abdizadeh, R., Rahim, F., Hashemitabar, M., Ghasemi, M., and Tavalla, M., 2014. Stray cats, gastrointestinal parasites and its association with public health in Ahvaz City, South Western of Iran. *Jundishapur J. Microbiol.* 7:e11079.

Khalafalla, R. E., 2011. A survey study on gastrointestinal parasites of stray cats in Northern region of Nile Delta, Egypt. *PLoS One.* 6:3-6.

Kingsbury, D.D., Marks, S.L., Cave, N.J., and Grahn, R.A., 2010. Identification of *Tritrichomonas foetus* and *Giardia* spp. infection in pedigree show cats in New Zealand. *NZ. Med. J.* 58(1), 6-10.

Koehler, A.V., Jex, A.R., Haydon, S.R., Stevens, M.A., and Gasser, R.B., 2014. *Giardia*/giardiasis: A perspective on diagnostic and analytical tools. *Biotechnol. Adv.* 32:280-289.

Konturek, P.C., Brzozowski, S.J., and Konturek, S.J., 2011. Stress and the gut: pathophysiology, clinical consequences, diagnostic approach and treatment options. *J. Physiol. Pharmacol.* 62(6):591-599.

Kopper, J.J. and Mansfield, L.S., 2010. Development of improved methods for delivery of *Trichuris muris* to the laboratory mouse. *Parasitol. Res.* 107:1103-1113.

Korkmaz, U. F., Gökpınar, S., and Yildiz, K., 2016. Prevalence of intestinal parasites in cats and their importance in terms of public health. *Turkiye. Parazitol. Derg.* 40:194-198

Kostopoulou, D., Claerebout, E., Arvanitis, D., Ligda, P., Voutzourakis, N., Casaert, S., and Sotiraki, S., 2017. Abundance, zoonotic potential and risk factors of intestinal parasitism amongst dog and cat populations: The scenario of Crete, Greece. *Parasit. Vectors.* 10:43-55.

Kuehner, K.A., Marks, S.L., Kass, P.H., Saute-Louis, C., Grahn, R.A., Barutzki, D., and Hartmann, K., 2011. *Tritrichomonas foetus* infection in purebred cats in Germany: Prevalence of clinical signs and the role of co-infection with other enteroparasites. *J. Fel. Med. Surg.* 13: 251-259.

Kuk, S., Yazar, S., and Cetinkaya, U., 2012. Stool sample storage conditions for the preservation of *Giardia intestinalis* DNA. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.* 107(8): 965-968.

Kváč, M., Hofmannová, L., Ortega, Y., Holubová, N., Horčíčková, M., Kicia, M., Hlásková, L., Květoňová, D., Sak, B., and McEvoy, J., 2017. Stray cats are more frequently infected with zoonotic protists than pet cats. *Folia. Parasitol.* 64:34-39.

Lalle, M., Pozio, E., Capelli, G., Bruschi, F., Crotti, D., and Cacciò, S.M., 2005. Genetic heterogeneity at the b-giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *Int. J. Parasitol.* 35:207-213.

- Laudenslager, M.L., Jorgensen, M.J., and, Fairbanks, L.A., 2012. Developmental patterns of hair cortisol in male and female nonhuman primates: Lower hair cortisol levels in vervet males emerge at puberty. *Psychoneuroendocrinol.* 37:1736—1739.
- Lee, S.C., Tang, M.S., Yvonne, T., Lim, A.L., Choy, S.H., Kurtz, Z.D., Cox, L.M., Gundra, U.M., Cho, I., Bonneau, R., Blaser, M.J., Chua, K.H., and Loke, P., 2014. Helminth colonization is associated with increased diversity of the gut microbiota. *Plos Neg. Trop. Dis.* 8(5):e2880.
- Lee, A., Schantz, P. M., Kazacos, K. R., Montgomery, S. P., Bowman, D. D., 2010. Epidemiologic and zoonotic aspects of ascarid infections in dogs and cats. *Trends. Parasitol.* 26:155-161.
- Le Moal, M., 2007. Historical approach and evolution of the stress concept: A personal account. *Psychoneuroendocrinol.* 32:S3–S9.
- Leitch, G.J., and He, Q., 2012. Cryptosporidiosis, an overview. *J. Biomed. Res.* 25(1):1-16.
- Lendner, M., and Dauschies, A., 2014. *Cryptosporidium* infections: molecular advances. *Parasitol.* 141, 1511–1532.
- Lequin, R.M., 2005. Enzyme immunoassay (EIA)/Enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA). *Clin. Chem.* 51:12 2415–2418.
- Li, J., Qi, M., Chang, Y., Wang, R., Li, T., Dong, H., and Zhang, L., 2015. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, and *Enterocytozoon bienusi* in captive wildlife at Zhengzhou, China. *J. Eukaryot. Microbiol.* 62, 833–839.
- Lilly, E., and Worthman, C., 2013. High prevalence of *Toxoplasma gondii* oocyst shedding in stray and pet cats (*Felis catus*) in Virgini, United States. *Parasite & Vec.* 6:266.
- Lindsay D.S., Dubey, J.P., and Blagburn, B., 1997. Biology of *Isospora* spp. from humans, nonhuman primates, and domestic animals. *Clin. Microbiol. Rev.* 19-34.
- López-Romero, G., Quintero, J., García-Astiazarán, H., and Velázquez, C., 2015. Host defences against *Giardia lamblia*. *Parasite. Immunol.* 37:394-406.

- Love, O.P., Wynne-Edwards, K.P., Bond, L., and Williams, T.D., 2008. Determinants of within- and among-clutch variation in yolk corticosterone in the European starling. *Horm. Behav.* 53:104–111.
- Lucio-Forster, A., and Bowman, D.D., 2011. Prevalence of fecal-borne parasites detected by centrifugal flotation in feline samples from two shelters in upstate New York. *J. Fel. Med. Surg.* 13:300-303.
- Lucio-Forster, A., Griffiths, J.K., Cama, V.A., Xiao, L., and Bowman, D.D., 2010. Minimal zoonotic risk of cryptosporidiosis from pet dogs and cats. *Trens. Parasitol.* 26(4):174-179.
- Lun, Z-R., and Gajadhar, A.A., 1999. A simple and rapid method for staining *Tritrichomonas foetus* and *Trichomonas vaginalis*. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11:471-474.
- Lutz, C.K., Tiefenbacher, S., Jorgensen, M.J., Meyer, J.S., and Novak, M.A., 2000. Techniques for collecting saliva from awake, unrestrained, adult monkeys for cortisol assay. *Ame. J. Primatol.* 52:93–99.
- Lynch, J.W., Ziegler, T.E., and Strier, K.B., 200. Individual and seasonal variation in fecal testosterone and cortisol levels of wild male tufted capuchin monkeys, (*Cebus apella nigrinus*). *Horm. Behav.* 41:275–287.
- Macpherson, C.N.L., 2013. The epidemiology and public health importance of toxocariasis: A zoonosis of global importance. *Int. J. Parasitol.* 43:999-1008.
- Manteuffel, G., 2002. Central nervous regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and its impact on fertility, immunity, metabolism and animal welfare. *Arch. Tierz. Dummerstorf.* 45(6):575-595.
- Marks, S.L., Hanson, T.E., and Melli, A.C., 2004. Comparison of direct immunofluorescence, modified acid-fast staining, and enzyme immunoassay techniques for detection of *Cryptosporidium* spp. In naturally exposed kittens. *J. Am. Vet. Assoc.* 225(19):1549-1553.
- McCobb, E.C., Patronek, G.J., Marder, A., Dinnage, J.D., and Stone, M.S., 2005. Assessment of stress levels among cats in four animal shelters. *JAVMA.* 226(4):548-555.
- McDonald, G.E., and Fuller, T.K., 2005. Effects of spring acorn availability on black bear diet, milk composition and survival. *J. Mammal.*, 86(5):1022–1028.

- McDonald, D., Yamaguchi, N., and Kerby, G., 2000. Group-living in the domestic cat: its sociobiology and epidemiology. In: The domestic cat: the biology of its behavior 2nd edition. Cambridge University Press.
- McDowall, R., Peregreine, A.S., Leonard, E.K., Lacombe, C., Lake, M., rebele, A., and Cai, H.Y., 2011. Evaluation of the zoonotic potential of *Giardia duodenalis* in fecal samples from dogs and cats in Ontario. Can. Vet. J. 52:1329–1333.
- McLamb, E., 2013. Real ecology, born in the streets: the global impact of feral cat, <<http://www.ecology.com/2013/08/27/global-impact-feral-cats>>
- Mekaru, S., Marks, S.L., Felley, A.J., Chouicha, N., and Kass, P.H., 2007. Comparison of direct immunofluorescence, immunoassays, and fecal flotation for detection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. in naturally exposed cats in 4 Northern California animal shelter. J Vet. Intern. Med. 21:959–965.
- Millsbaugh, J.J., and Washburn, B.E., 2004. Use of fecal glucocorticoid metabolite measures in conservation biology research: considerations for application and interpretation. Gen. Comp. Endocrinol. 138:189-199.
- Mircean, V., Györke, A., Jarca, A., Cozman, V., 2011. Prevalence of *Giardia* species in stool samples by ELISA in household cats from Romania and risk factors. J. Fel. Med. Surg. 13:479-482.
- Mircean, V., Titilincu, A., Vasile, C., 2010. Prevalence of endoparasites in household cat (*Felis catus*) populations from Transylvania (Romania) and association with risk factors. Vet. Parasitol. 171:163-166.
- Mirzaghavami, M., Sadraei, J., and Forouzandeh, M., 2016. Detection of *Cryptosporidium* spp. in free ranging animals of Teheran, Iran. J. Parasit. Dis. 40(4):1528–1531.
- Molnar, B., Fattbert, J., Palme, R., Ciucci, P., Betschart, B., Smith, D.W., and Diehl, P-A., 2014. Environmental and intrinsic correlates of stress in free-ranging wolves. PLOS One. 1-25.
- Monis, P.T., Cacciò, S.M., and Thompson, A., 2009. Variation in *Giardia*, towards a taxonomic revision of the genus. Trends Parasitol. 25(2):93-100.

- Morgan, U.M., Pallant, L., Dwyer, B.W., Forbes, D.A., Rich, D.A., and Thompson, R.C., 1998. Comparison of PCR and microscopy for detection of *Cryptosporidium parvum* in human fecal Specimens. *J. Clin. Microbiol.* 36(4):995-998.
- Morin-Adeline, V., Lomas, R., O'Meally, D., Stack, C., Conesa, A., and Slapeta, J., 2014. Comparative transcriptomics reveals striking similarities between the bovine and feline isolates of *Tritrichomonas foetus*: consequences for in silico drug-target identification. *BMC. Genom.* 15:955.
- Mormède, P., Andanson, S., Aupérin, B., Beerda, B., Guémené, D., Mlamkvist, J., Manteca, X., Manteuffel, G., Prunet, P., Van Reen, C.G., Richard, S., and Veissier, I., 2007. Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiol. Beh.* 92:317–339.
- Morrondo, P., Díez-Morrondo, C., Pedreira, J., Díez-Baños, N., Sánchez-Andrade, R., Paz-Silva, A., Díez-Baños, P., 2006. *Toxocara canis* larvae viability after disinfectant-exposition. *Parasitol. Res.* 99:558-561.
- Möstl, K., Egbernik, H., Addie, D., Frymus, T., Boucraut-Baralon, C., Truyen, U., Hartmann, K., Lutz, H., Gruffydd-Jones, T., Radford, A.D., Lloret, A., Pennisi, M.G., Hosie, M.J., Marsilio, F., Thiry, E., Belák, S., Horzinek, M., 2013. Prevention of infectious diseases in cat shelters. ABCD guidelines. *J. Fel. Med. Surg.* 15:546-554.
- Möstl, E., Rettenbacher, S., and Palme, R., 2005. Measurement of corticosterone metabolites in bird's droppings: An analytical approach. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1046:17–34.
- Möstl, E., Maggs, J.L., Schrötter, G., Besenfelder, U., and Palme, R., 2002. Measurement of cortisol metabolites in faeces of ruminants, 2002. *Vet. Res. Comm.* 26:127-139.
- Möstl, E., and Palme, R., 2002. Hormones as an indicators of stress. *Dom. An. Endocrinol.* 23:67–74.
- Muehlenbein, M.P., 2006. Intestinal parasite infections and fecal steroid levels in wild chimpanzees. *Am. J. Physic. Anthropol.* 130:546–550.
- Nantavisai, K., Mingthin, M., Tan-Ariya, P., TRangsing, R., Naaglor, T., and Leelayoova, S., 2007. Evaluation of the sensitivities of DNA extraction and PCR methods. *J. Clin. Microbiol.* 45(2):581-583.

Navarro i Martínez, L., Del Águila, C., and Bornay-Llinares, J., 2010. *Cryptosporidium*: un género en revisión. Situación en España. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 29(2):135–143.

Nestlé Puina Fecal Scoring System:

<http://www.ivghospitals.com/assets/2-11_IVGNewsletter>

Nicholson, L.B., 2016. The immune system. *Ess. Biochem.* 60 275–301.

Nijse, R., Mughini-Gras, L., Wagenaar, J.A., and Ploeger, H.W., 2016. Recurrent patent infections with *Toxocara canis* in household dogs older than six months, a prospective study. *Parasit. Vectors.* 9:531-542.

O'Brien, S.J., 1997. Phylogenetic reconstruction of the Felidae using 16S rRNA and NADH-5 mitochondrial genes. *J Mol. Evol.* 44(1):S98–S116.

O'Handley, R.M., and Olson, M.E., 2006. Giardiasis and cryptosporidiosis in ruminants. *Vet. Clin. Food. Anim.* 22:623–643.

O'Hara, A.M, and Shanahan, F. 2006. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep.* 7:688–693.

Okhyusen, C.P., and Chapell, C.L., 2002. *Cryptosporidium* virulence determinants – Are we there yet? *Int. J. Parasitol.* 32:517-525.

Ortuño, A. and Castellà, J., 2011. Intestinal parasites in shelter dogs and risk factors associated with the facility and its management. *Isr. J. Vet. Med.* 66:103-107.

Lappin, M.R., 2010. Update on the diagnosis and management of *Isospora* spp. infections in dogs and cats. *Top. Companion. Anim. Med.* 25(3):133-135.

Ottaway, D.S., and Hawkins, D.M., 2003. Cat housing in rescue shelters: a welfare comparison between communal and discrete-unit housing. *An. Welf.* 12:173-189.

Overgaaw, P. A. M. and Knapen, F., 2013. Veterinary and public aspects of *Toxocara* spp. *Vet. Parasitol.* 193:398-403.

Page, R.J., Ross, J., and Bennett, D.H., 1992. home ranges of feral cats at Avonmouth Docks. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 12(1):23-26.

- Pallant, L., Barutzki, D., Schaper, R., Thompson, A. 2015. The epidemiology of infections with *Giardia* species and genotypes in well cared for dogs and cats in Germany. *Parasit. Vectors* 8:2-15.
- Palme, R., Touma, C., Arias, N., Dominchin, M.F., and Lepschy, M., 2013. Steroid extraction: Get the best of fecal samples. *Wien. Tierarztl. Monatsschr.* 100:237-246.
- Palme, R., 2012. Monitoring stress hormone metabolites as a useful, non-invasive tool for welfare assessment in farm animals. *Anim. Welf.* 21:331-337.
- Palme, R., 2005. Measuring fecal steroids: Guidelines for practical application. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1046:75–80.
- Palme, R., Rettenbacher, S., Touma, C., El-Bahr, M., and Möstl, E., 2005. Stress hormones in mammals and birds: comparative aspects regarding metabolism, excretion, and noninvasive measurement in fecal samples. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1040:162–171.
- Palme, R., Robia, C., Baumgartner, W., and Möstl, E. 2000. Transport stress in cattle as reflected by an increase in faecal cortisol metabolites. *Vet. Rec.* 146:108–9.
- Panaro, M.A., Cianciulli, A., Mitolo, V., Mitolo, C.V., Acquafredda, A., Brandonisio, O., and Cavallo, P., 2007. Caspase-dependent apoptosis of the HCT-8 epithelial cell line induced by the parasite *Giardia intestinalis*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 51:302–309.
- Papini, R., Cardini, G., Paoletti, B., and Giangaspero, A., 2007. Detection of *Giardia* assemblage A in cats in Florence, Italy. *Parasitol. Res.* 100:653–656.
- Paul, M.J., George, M.T., Zucker, I., and Butler, M.P., 2007. Photoperiodic and hormonal influences on fur density and regrowth in two hamster species. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 293:R2363–R2369.
- Payne, P.A., and Artzer, M., 2009. The biology and control of *Giardia* spp. and *Tritrichomonas foetus*. *Vet. Clin. Small. Anim.* 39:993–1007.
- Paz e Silva, F.M., Monobe, M.M., Lopes, R.S., and Araujo Jr., J.P., 2012. Molecular characterization of *Giardia duodenalis* in dogs from Brazil. *Parasitol. Res.* 110:325-334.

- Pearson, B.L., JUDGE, P.G., and Reeder, D.M., 2008. Effectiveness of saliva collection and EIA for the quantification of cortisol in socially housed baboons. *Am. J. Primatol.* 70:1145–1151.
- Pedraza-Díaz, S., AMAR, c., Nichols, G.L., and McLauchlin, J., 2001. Nested polymerase chain reaction for amplification of the *Cryptosporidium* oocyst Wall protein gene. *Emerg. Infect. Dis.* 7:49-56.
- Pesavento, P.A., and Murphy, B.G., 2014. Common and emerging infectious diseases in the animal shelter. *Vet. Pathol.* 51(2):478–491.
- Petney, T.N., and Andrews, R.H., 1998. Multiparasite communities in animals and humans: frequency, structure and pathogenic significance. *Int. J. Parasitol.* 28: 377-393.
- Petry, G., Kruedewagen, E., Kampkoetter, A., and Krieger, H., 2011. Efficacy of Empodepside/Toltrazuril suspension (ProcoxR Oral suspension for dogs) against mixed experimental *Isospora felis/ Isospora rivolta* infection in cats. *Parasitol. Res.* 109:S29–S36.
- Piekarska, J., Bajzert, J., Gorczykowski, M., and Podkowik, M., 2016. Molecular identification of *Giardia duodenalis* isolates of domestic dogs and cats in Wroclaw, Poland. *Ann. Agric. Environ. Med.* 23(3):410-415.
- Pineda, M.H., and Dooley, M.P., 2003. McDonald's Veterinary Endocrinology and Reproduction 5th edition. Iowa State Press.
- Polak, K., and Smith-Blackmore, M., 2014. Animal shelters: Managing heartworms in resource-scarce environments. *Vet. Parasitol.* 206:78-82.
- Profizi, C., Cian, A., Meloni, D., Hugonnard, M., Lambert, V., Groud, K., Gagnon, A-C., Viscogliosi, E., and Zenner, L., 2013. Prevalence of *Tritrichomonas foetus* infections in French catteries. *Vet. Parasitol.* 196: 50– 55.
- Rajurkar, M.N, Lall, N., Basak, S., and Mallick, S.K., A simple method for demonstrating the *Giardia lamblia* trophozoite. *J. Clin. Diag. Res.* 6(9):1492-1494.
- Ramos, D., Reche-Junior, A., Fragoso, P.L., Palme, R., Yanasse, N.K., Gouvêa, V.R., Beck, A., and Mills, D.S., 2013. Are cats (*Felis catus*) from multi-cat households more stressed? Evidence from assessment of fecal glucocorticoid metabolite analysis. *Physiol. Beh.* 122: 72–75.

- Ramos, D., Arena, M.N., Reche-Junior, A., Daniel, A.G., Albino, M.V., Vasconcellons, A.S., Viau, P., and Oliveira, C.A., 2012. Factors affecting faecal glucocorticoid levels in domestic cats (*Felis catus*): a pilot study with single and large multi-cat households. *Anim. Welf.* 21:285-291.
- Randi, E. and Ragni, B., 1991. Genetic variability and biochemical systematics of domestic and wild cat populations (*Felis silvestris*: Felidae). *J. Mammal.* 72(1):79–88.
- Read, C.M., Monis, P.T., and Thompson, R.C., 2004. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. *Infect Genet Evol.* 4:125–130.
- Reynolds, L.A., Smith, K.A., Filbey, K.J., Harcus, Y., Hewitson, J.P., Redpath, S.A., Valdez, Y., Yebra, M.J., Finlay, B.B., and Maizels, R.M., 2014. Commensal-parhogen interactions in the intestinal tract, *Lactobacilli* promote infection with, and are promoted by helminth parasites. *Gut. Microb.* 5(4): 522–532.
- Roberts-Thomson, I., Grove, D.I., Stevens, D.P., and Warren, K.S., 1976. Suppression of giardiasis during the intestinal phase of trichinosis in the mouse. *Gut.* 17:953-958.
- Rochlitz, I., 1999. Recommendations for the housing of cats in the home, in catteries and animal shelters, in laboratories and in veterinary surgeries. *J. Fel. Med. Surg.* 1:181-191.
- Rochlitz, I., Podberscek, A.L., and Broom, D.M., 1995. Welfare of cats in a quarantine cattery. *Vet. Rec.* 143:35-39.
- Romero, L.M., 2002. Seasonal changes in plasma glucocorticoid concentrations in free-living vertebrates. *Gen. Comp. Endocrinol.* 128:1–24.
- Romero, L.M., and Butler, L.K., 2007. Endocrinology of stress. *Int. J. Comp. Psychol.* 20:89-95.
- Romero, L.M., and Reed, J.M., 2005. Collecting baseline corticosterone samples in the field: is under 3 min good enough? *Comp. Biochem. Physiol.* 140:73–79.
- Rosado, T.W., Specht, A., and Marks, S.L., 2007. Neurotoxicosis in 4 cats receiving ronidazole. *J. Vet. Intern. Med.* 21:328-331.
- Rosner, W., 1990. The functions of corticosteroid-binding globulin and sex hormone-binding globulin: recent advances. *Endocr. Rev.* 11:80-91.

- Rossle, N.F., and Latif, B., 2013. Cryptosporidiosis as threatening health problem: A review. *Asian Pac J Trop Biomed.* 3(11): 916-924.
- Round, J.L., and Mazmanian, S.K., 2009. The gut microbiome shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 9(5): 313–323.
- Roxström-Lindquist, K., Palm, D., Reiner, D., Ringqvist, E., and Svärd, S.G., 2006. *Giardia* immunity, an update. *Trend. Parasitol.* 22(1):26-32.
- Ryan, U., Fayer, R., Xiao, L., 2014. *Cryptosporidium* species in humans and animals: Current understanding and research needs. *Parasitol.* 141:1667–1685.
- Ryan, U., and Cacciò, S.M., 2013. Zoonotic potential of *Giardia*. *Int. J. Parasitol.* 43:943-956.
- Ryan, U., Xiao, L., Read, C., Zhou, L., Lal, A.A., and Pavlasek, I., 2003. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(7): 4302–4307.
- Sabshin, S.J., Levy, J., Tupler, T., Tucker, S.J., Greiner, E.C., Leutenegger, C.M., 2012. Enteropathogens identified in cats entering a Florida animal shelter with normal feces or diarrhea. *JAVMA.* 241:331-337.
- Saitoh, Y. and Itagaki, H., 1989. Dung beetles, *Onthophagus* spp., as a potential transport hosts of feline coccidian. *Jpn. J. Vet. Sci.* 52(2):293-297.
- Saleh, M.N., Gilley, A.D., Byrnes, M.K., and Zajac, A., 2016. Development and evaluation of a protocol for control of *Giardia duodenalis* in a colony of group-housed dogs at a veterinary medical college. *JAVMa.* 249(6):644-649.
- Sands, J., and Creel, S., 2004. Social dominance, aggression and faecal glucocorticoid levels in a wild population of wolves, *Canis lupus*. *Anim. Behav.* 67:387-396.
- Sapolsky, R.M., Romero, M., and Munck, A.U., 2000. How do glucocorticoids influence stress responseS? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endoc. Rev.* 21(1):55–89.
- Schatz, S., and Palme, R., 2001. Measurement of fecal glucocorticoid metabolites in cats and dogs: a non-invasive method for evaluating adrenocortical function. *Vet. Res. Comm.*25:281-287.

- Schibler, U., Ripperger, J., and Brown, S.A., 2003. Peripheral circadian oscillators in mammals: time and food. *J. Biol. Rhythms*. 18(3):250-260.
- Scorza, V., and Tangtrongsup, S., 2010. Update on the diagnosis and management of *Cryptosporidium* spp infections in dogs and cats. *Top. Comp. Anim. Med.* 163-169.
- Scorza, V., Brewer, M.M., and Lappin, M.R., 2003. Polymerase chain reaction for the detection of *Cryptosporidium* spp. in cat feces. *J. Parasitol.* 89(2):423-426.
- Scott, K.G., Logan, M.R., Klammer, G.M., Teoh, D.A., and Buret, A.G., 2000. Jejunal brush border microvillous alterations in *Giardia muris*-infected mice: Role of T-lymphocytes and interleukin-6. *Infect. Immun.* 68(6): 3412–3418.
- Seale, J.V., Wood, S.A., Atkinson, H.C., Lightman, S.L., Ingram, C.D., Jessop, D.S., and Harbuz, M.S., 2004. Gonadectomy reverses the sexually diergic patterns of circadian and stress-induced hypothalamic–pituitary–adrenal axis activity in male and female rats. *J. Neuroendocrinol.* 16(6):516–524.
- Sekirov, I., Russell, S.L., Antunes, C.M., and Finlay, B.B., 2010. Gut microbiota in health and disease. *Physiol. Rev.* 90:859–904.
- Sepahvand, A., Pestehchian, N., Yousefi, H.A., and Gharehbaba, R.P., 2017 - Comparison and evaluation of four methods for extracting DNA. *J. Parasit. Dis.* 41(1):263-267.
- Serra, C.M., Antunes, C.M., and Coimbra, R.A., 2003. Parasitological study with faecal samples of stray and domiciliated cats (*Felis catus domesticus*) from the Metropolitan Area of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 36(3):331-334.
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., and Johne, R., 2012. PCR inhibitors, occurrence, properties and removal. *J. Ap. Microbiol.* 113, 1014—1026.
- Sheriff, M.J., M., Dantzer, B., Delehanty, B., Palme, R., Boonstra, R., 2011. Measuring stress in wildlife: techniques for quantifying glucocorticoids. *Oecol.* (2011) 166:869–887.
- Shirley, D-A., Moonah, S.N., and Kotloff, K.L., 2012. Burden of disease from cryptosporidiosis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 25(5): 555–563.
- Shrivastava, A.K., Kumar, S., Smith, W.A., and Sahu, P.S., 2017. Revisiting the global problema of cryptosporidiosis and recommendations. *Trop. Parasitol.* 7(1):8-17.

Shukla, G., Kaur, H., and Sharma, L., 2013. Comparative therapeutic effect of probiotic *Lactobacillus casei* alone and in conjunction with antiprotozoal drugs in murine giardiasis. *Parasitol. Res.* 112:2143–2149.

Singer, S.M., and Nash, T.E., 2000. The role of normal flora in *Giardia lamblia* infections in mice. *J. Infect. Dis.* 181:1510-1512.

Sinski, E., and Behnke, J.M., 2004. Apicomplexan parasites: Environmental contamination and transmission. *Pol. J. Microbiol.* 53:67-73.

Skrzypczyk, H.J., and Verdier, P., 2013. Bioanalytical assays: RIA/EIA. *Drug. Discov. Eval. Saf. Pharmacokinet. Assays.* 869-866.

Slapeta, J., 2017. DNA barcoding of *Cryptosporidium*. *Parasitol.* 12:1-9.

Slapeta, J., 2013. Cryptosporidiosis and *Cryptosporidium* species in animals and humans: A thirty color rainbow? *Int. J. Parasitol.* 43:957-970.

Slapeta, J., Muller, N., Stack, C.M., Walker, G., Lew-Tabor, A., Tachezy, J., and Frey, C., 2012. Comparative analysis of *Tritrichomonas foetus* (Riedmuller, 1928) cat genotype, *T. foetus* (Riedmuller, 1928) cattle genotype and *Tritrichomonas suis* (Davaine, 1875) at 10 DNA loci. *Int. J. Parasitol.* 42:143–1149.

Smith, D.F., Durman, K.J., Roy, D.B., and Bradshaw, J.W., 1990. Behavioural aspects of the welfare of rescued cats. *J. fel. Adv. Bur.* 31:25-28.

Sommer, M.F., Rupp, P., Pietsch, M., Kaspar, A., and Beelitz, P., 2018. *Giardia* in a selected population of dogs and cats in Germany - diagnostics, coinfections and assemblages. *Vet. Parasitol.* 249:49-56.

Soliman, R.H., Fuentes, I., and Rubio, J.M., 2011. Identification of a novel Assemblage B subgenotype and a zoonotic Assemblage C in human isolates of *Giardia intestinalis* in Egypt. *Parasitol. Int.* 60(4):507-11.

Sotiriadou, i., Pantchev, N., Gassmann, D., and Karanis, P., 2013. Molecular identification of *Giardia* and *Cryptosporidium* from dogs and cats. *Parasite.* 20:8-14.

Sowemimo, O., 2012. Prevalence and intensity of gastrointestinal parasites in domestic cats in Ode-Irele and Oyo communities, Southwest Nigeria. *J. Parasitol. Vector. Biol.* 4(1):7-13

- Spada, E., Proverbio, D., Pepa, A. D., Domenichini, G., De Giorgi, G. B., Traldi, G., and Ferro, E., 2013. Prevalence of faecal-borne parasites in colony stray cats in Northern Italy. *J. Fel. Med. Surg.* 15:672.
- Spano, F., Putignani, L., McLauchlin, J., Casemore, D.P., and Crisanti, A., 1997. PCR-RFLP analysis of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene discriminates between *C. wrairi* and *C. parvum*, and between *C. parvum* isolates of human and animal origin. *FEMS Microbiol. Lett.* 150:209-217.
- Sprong, H., Cacciò, S.M., and Van der Giessen, J.W., 2009. Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* 3(12):e558.
- Staley, M., Conners, M.G., Hall, and Miller, L.J., 2018. Linking stress and immunity, Immunoglobulin A as a non-invasive physiological biomarker in animal welfare studies. *Horm. Behav.* 102:55-68.
- Stavisky, J., Brennan, M.L., Downes, M., and Dean, R., 2012. Demographics and economic burden of unowned cats and dogs in the UK, results of 2010 census. *BMC Vet. Res.* 8:163.
- Stella, J.L., and Croney, C.C., 2016. Environmental aspects of domestic cat care and management: Implications for cat welfare. *Sci. World. J.* 1-7.
- Stevenson, E.T., Gese, E.M., Neuman-Lee, L.A., and French, S., 2017. Levels of plasma and fecal glucocorticoid metabolites following an ACTH challenge in male and female coyotes (*Canis latrans*). *J. Comp. Physiol. B.* 188(2):345-358.
- Stewart, M., Webster, J.R., Schaefer, A.L., Cook, N.J., and Scot, S.L., 2005. Infrared thermography as a non-invasive tool to study animal welfare *Anim. Welf.* 14:319-325.
- Stockdale, H., Rodning, S., Givens, M., Carpenter, D., Lenz, S., Spencer, J., Dykstra, C., Lindsay, D., and Blagburn, B., 2007. *J. Parasitol.* 93(6): 1429–1434.
- Strand, E.A., Robertson, L.J., Hanevik, K., Avsvag, J.O., and Langeland, N., 2008. Sensitivity of a *Giardia* antigen test in persistent giardiasis following an extensive outbreak. *Clin. Microbiol. Infect.* 14:1069–1071.
- Stromberg, B.E., 1997. Environmental factors influencing transmission. *Vet. Parasitol.* 72:247-264.

Supali, T., Verweij, J.J., Wiria, A.E., Djuardi, Y., Hamid, F., Kaisar, M.M.M., Wammes, L.J., Van Lieshout, L., Luty, A.J.F., Sartono, E., and Yasdanbakhsh, M., 2010. Polyparasitism and its impact on the immune system. *Int. J. Parasitol.* 40:1171–1176.

Szwabe, K., and Blaszkowska, J., 2017. Stray dogs and cats as potential sources of soil contamination with zoonotic parasites. *Ann. Agric. Environ. Med.* 24(1):39-43.

Talló-Parra, O., Manteca, X., Sabés-Alsina, M., Carbajal, A., and López-Bejar, M., 2015. Hair cortisol detection in dairy cattle by using EIA: protocol validation and correlation with faecal cortisol metabolites. *Animal.* 9(6): 1059-64.

Tangtrongsup, S., and Scorza, V., 2010. Update on the diagnosis and management of *Giardia* spp. infections in dogs and cats. *Top. Comp. Anim. Med.* 155-162.

Tempel, D.J., and Gutiérrez, R.J., 2003. Fecal corticosterone levels in California spotted owls exposed to low-intensity chainsaw sound. *Wildl. Soc. Bull.* 31(3), 698-702.

Terio, K.A., Brown, J.L., Moreland, R., and Munson, L., 2002. Comparison of different drying and storage methods on quantifiable concentrations of fecal steroids in the cheetah Zoo. *Biol.* 21:215–222.

The Statistical Portal: Number of dogs and cats in the European Union in 2017, by country. <<https://www.statista.com/statistics/515410/cat-population-european-union-eu-by-country>>

Thompson, R.C.A., Koh, W.H., and Clode, P.L., 2016. *Cryptosporidium* – What is it? *Food. Waterborne. Parasitol.* 4:54-61.

Thompson, R.C.A., and Ash, A., 2016. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections. *Inf. Gen. Evol.* 40:315-323.

Thompson, R.C.A., and Smith, A., 2011. Zoonotic enteric protozoa. *Vet. Parasitol.* 182:70-78.

Thompson, R.C.A., Palmer, C.S., and O’Handley, R., 2008. The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. *Vet. J.* 177:18-25.

Thompson, R.C., Olson, M.E., Zhu, G., Enomoto, S., Abrahamsen, M.S., and Hijjawi, N.S., 2005. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. 59:77-158.

Thompson, R.C.A., 2004. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Vet Parasitol.* 126:15-35.

Thumbi S.M., Bronsvoort, B.M. de. C., Poole, E.J., Kiara, H., Toye, P., Ndila, M., Conradie, I., Jennings, A., Handel, I.G., Coetzer, J.A.W., Hanotte, O., Woolhouse, M.E.J., 2013. Parasite co-infections show synergistic and antagonistic interactions on growth performance of East African zebu cattle under one year. *Parasitol.* 140:1789-1798.

Tolbert, M.K., and Gookin, J.L., 2016. Mechanisms of *Tritrichomonas foetus* Pathogenicity in Cats with Insights from venereal trichomonosis. *J. Vet. Intern. Med.* 30:516–526.

Tomley, F.M., and Soldati, D.S., 2001. Mix and match modules: structure and function of microneme proteins in apicomplexan parasites. *Trend. Parasitol.* 17(2):81-88.

Touma, C., and Palme, R., 2005. Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: The importance of validation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1046: 54–74.

Touma, C., Palme, R., and Sachser, N., 2004. Analyzing corticosterone metabolites in fecal samples of mice: a noninvasive technique to monitor stress hormones. *Horm. Behav.* 45:10– 22.

Touma, C., Sachser, N., Möstl, E., and Palme, R., 2003. Effects of sex and time of day on metabolism and excretion of corticosterone in urine and feces of mice. *Gen. Comp. Endocrinol.* 130:267–278.

Traversa, D., 2012. Èt roundworms and hookworms: A continuing need for global worming. *Parasit. Vectors.* 5:91

Turner, P., Berry, J., and MacDonalds, S., 2012. Animal shelters and animal welfare: Raising the bar. *Can. Vet. J.* 53(8):893-896.

Taylor, M.A., Coop, R.L., Wall, R.L.; 2016. *Veterinary Parasitology* 4th edition. Wiley Blackwell.

Tysnes K.R., Shancke, E., and Robertson, L., 2014. Subclinical *Giardia* in dogs: A veterinary conundrum relevant to human. *Trends. Parasitol.* 30(11):520-527.

Tysnes, K.R., Gjerde, B., Nodtvedt, A., and Skancke, E., 2011. A cross-sectional study of *Tritrichomonas foetus* infection among healthy cats at shows in Norway. *Acta. Vet. Scand.* 53:39-45.

- Tzannes, S., Batchelor, D.J., Graham, P.A., Pinchbeck, G.L., Wastling, J., German, A.J., 2008. Prevalence of *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Isoospora* species infections in pet cats with clinical signs of gastrointestinal disease. *J. Fel. Med. Surg.* 10:1-8.
- Tzipori, S., and Ward, H., 2002. Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microb. Infec.* 4:1047-1058.
- Uchoa, F.F., Sudré, A.P., Campos, S.D., and Almosny, N.R., 2018. Assessment of the diagnostic performance of four methods for the detection of *Giardia duodenalis* in fecal samples from human, canine and feline carriers. *J. Microbiol. Met.* 145:73-78.
- Uehlinger, F.D., Naqvi, S.A., Greenwood, S.J., McClure, J.T., Conboy, G., O'Handley, R., and Barkema, H.W., 2017. Comparison of five diagnostic tests for *Giardia duodenalis* in fecal samples from young dogs. *Vet. Parasitol.* 244:91-96.
- Uetake, K., Goto, A., Koyama, R., Kikuchi, R., and Tanaka, T., 2013. Effects of single caging and cage size on behavior and stress level of domestic neutered cats housed in an animal shelter. *An. Sci. J.* 84:272-274.
- Vasilopoulos, R.J., Rickard, L.G.L., Mackin, A.J., Pharr, G.T., and Huston, C.L., 2007. Genotypic analysis of *Giardia duodenalis* in domestic cat. *J. Vet. Intern. Med.* 21:352-355.
- Vejdani, M., Mansour, R., Hamzavi, Y., Vejdani, S., Nazeri, N., and Michaeli, A., 2014. Immunofluorescence assay and PCR analysis of *Cryptosporidium* oocysts and species from human faecal specimens. *Jundishapur. J. Microbiol.* 7(6): e10284.
- Verocai, G.G., Tavares, P.V., Ribeiro, F. de A., Correia, T.R., and Scott, F.B., 2010. Effects of disinfectants on *Toxocara canis* embryogenesis and larval establishment in mice tissues. *Zoon. Pub. Health* 57:e213-e216.
- Villeneuve, A., Polley, L., Jenkins, E., Schurer, J., Gilleard, J., Kutz, S., Conboy, G., Benoit, D., Seewald, W., and Gagné, F., 2015. *Parasit. Vectors.* 8:281-291.
- Vlčková, K., Pafco, B., Petrzalkova, K.J., Modry, D., Todd, A., Yeoman, C.J., Torralba, M., Wilson, B.A., Stumpf, R.M., White, B.A., Nelson, K.E., Leigh, S.R., and Gomez, A., 2018 - Relationships between gastrointestinal parasite infections and the fecal microbiome in free-ranging Western Lowland gorillas. *Front. Microbiol.* 9(1202):1-12.

Jared Vogue, J., Larson, K.L., 2011. Cryptosporidiosis. Center for Food Security and Public Health, Iowa State University.

Waap H, Gomes J, and Nunes T., 2014. Parasite communities in stray cat populations from Lisbon, Portugal. *J. Helminthol.* 88:389- 95.

Walden, H.S., Dykstra, C., Dillon, A., Rodning, S., Givens, D., Bird, R., Newton, J., Lindsay, D., 2013. A new species of *Tritrichomonas* (Sarcomastigophora: Trichomonida) from the domestic cat (*Felis catus*). *Parasitol. Res.* 112:2227–2235.

Walker, S.L., Smith, R.F., Jones, D.N., Routly, J.E., and Dobson, H., 2008. Chronic stress, hormone profiles and estrus intensity in dairy cattle. *Horm. Behav.* 53:493–501.

Washburn, B.E., and Millspaugh, J.J., 2002. Effects of simulated environmental conditions on glucocorticoid metabolite measurements in white-tailed deer feces. *Gen. Comp. Endocrinol.* 127:217–222.

Watkins, R.R., and Eckmann, L., 2014. Treatment of giardiasis: current status and future directions. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 16:396.

White, C., 2004. Nitazocanide, a new broad spectrum antiparasitic agent. *Expert. Rev. Anti-infect.* 2(1):43-50.

Wielebnowski, N.C., Fletchall, N., Carlstead, K., Busso, J.M., and Brown, J., 2002. Noninvasive assessment of adrenal activity associated with husbandry and behavioral factors in the North American clouded leopard population. *Zoo. Biol.* 21:77–98.

Wilke, H., and Robertson, J.L., 2009. Preservation of Giardia cysts in stool samples for subsequent PCR analysis. *J. Microbiol. Met.* 78:292-296

Wingfield, J.C., and Kitaysky, A.S., 2002. Endocrine response to unpredictable environmental events. Stress or anti-stress hormones. *Integ. Comp. Biol.* 42:600–609.

Wood, C.L., Tanner, B.D., Higgins, L.A., Dennis, J.S., Luempert III L.G., 2014. Effectiveness of a steam cleaning unit for disinfection in a veterinary hospital. *Am. J. Vet. Res.* 75:1083-1088.

Wood, P., 2009. Salivary cortisol assays - research or routine? *Ann. Clin. Biochem.* 46:183–196.

- Xenoulis, P.G., Lopinski, D.J., Read, S.A., Suchodolski, J.S., and Steiner, J.M., 2013. Intestinal *Tritrichomonas foetus* infection in cats: a retrospective study of 104 cases. *J. Fel. Med. Surg.* 15(12) 1098–1103.
- Xenoulis, P.G., Saridomichelakis, M.N., Read, S.A., Suchodolski, J.S., and Steiner, J.M. 2010. Detection of *Tritrichomonas foetus* in cats in Greece. *J. Fel. Med. Surg.* 12, 831-833.
- Xiao, L., 2009. Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update. *Exp. Parasitol.* 124:80–89.
- Xu, H., Jin, Y., Wu, W., Li, P., Wang, L., Li, N., Feng, Y., Xiao, L., 2016. Genotypes of *Cryptosporidium* spp., *Enterocytozoon bieneusi* and *Giardia duodenalis* in dogs and cats in Shanghai, China. *Parasit. Vectors.* 9:121-129.
- Yang, R., Lau, J., Ying, J., Monis, P., and Ryan, U., 2015. Molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* in cats (*Felis catus*) in Western Australia. *Exp. Parasitol.* 155:13-18.
- Young, K.M., Walker, S.L., Lanthier, C., Waddell, W.Y., Monfort, S.L., and Brown, J.L., 2004. Noninvasive monitoring of adrenocortical activity in carnivores by fecal glucocorticoid analyses. *Gen. Com. Endocrinol.* 137:148–165.
- Yu, J-R., Lee, S-U. and Par, W-Y., 2009. Comparative sensitivity of PCR sets for detection of *Cryptosporidium parvum*. *Korean. J. Parasitol.* 47(3):293-297.
- Zajac, A.M., and Conboy, G.A., 2012. *Veterinary Clinical Parasitology* 8th edition. Wiley Blackwell.
- Zajac, A. M., and Johnson, J., 2002. Evaluation of the importance of centrifugation as a component of zinc sulfate fecal flotation examinations. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 38:221-224.
- Zanzani, S. A., Gazzonis, A. L., Scarpa, P., Berrilli, F., Manfredi, M. T., 2014. Intestinal parasites of owned dogs and cats from metropolitan and micropolitan areas: Prevalence, zoonotic risks, and pet owner awareness in northern Italy. *BioMed. Res. Int.* 1-10.
- Zeugswetter, F.K., Neffe, F., Schwendenwein, I., Tichy, A., and Möstl, E., 2013. Configuration of antibodies for assay of urinary cortisol in dogs influences analytic specificity. *Dom. An. Endocrinol.* 45:98–104.

Zheng, G., Hu, W., Liu, Y., Luo, Q., Tan, L., Li, G., 2015. Occurrence and molecular identification of *Giardia duodenalis* from stray cats in Guangzhou, Southern China. Korean J. Parasitol. 53:119–124.