THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

Biologie Santé-option Parasitologie

École doctorale Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé (CBS2)

Unité de recherche UMI233-TRANSVIH-MI (IRD)

Epidémiologie et diversité génétique des géohelminthes et des filaires du genre *Mansonella* sp. à l'interface homme-primates non-humains au Cameroun et au Gabon

Présentée par Constant SIRIMA

Le 20 octobre 2021

Sous la direction de Michel BOUSSINESQ et Sabrina LOCATELLI

Devant le jury composé de

Laurence LACHAUD, Professeur, Université de Montpellier	Présidente
Sabrina KRIEF, Professeur, Muséum National d'Histoire Naturelle	Rapporteur
Stéphane RANQUE, Professeur, Aix Marseille Université	Rapporteur
Antoine BERRY, Professeur, Université de Toulouse	Examinateur
Michel BOUSINESQ, Docteur, IRD	Directeur de thèse
Sabrina LOCATELLI, Docteur, IRD	Co-encadrante

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

Remerciements

Je remercie le **Professeur Sabrina KRIEF** et le **Professeur Stéphane RANQUE** d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse en qualité de rapporteurs.

Je remercie le **Professeur Laurence LACHAUD** et le **Professeur Antoine BERRY** d'avoir accepté siéger dans le jury de thèse en qualité d'examinateurs.

Je remercie le **Docteur Sabrina LOCATELLI** et le **Docteur Michel BOUSSINESQ** d'avoir d'avoir encadré ce travail de thèse.

J'adresse mes remerciements à la **Fondation Méditerranée Infection** pour m'avoir offert l'opportunité de faire cette thèse à travers une bourse de recherche doctorale.

Résumé

Les Primates non humains (PNH) sont infectés par de nombreuses espèces de parasites allant des protozoaires aux helminthes. La forte prévalence de certaines infections parasitaires chez les PNH peut faire de ces animaux des réservoirs de pathogènes potentiellement zoonotiques. De nombreux géohelminthes sont partagés entre les humains et les PNH : notamment *Trichuris* sp., *Oesophagostomum* sp., *Ascaris lumbricoides,* les ankylostomes. Ils sont responsables de géohelminthiases qui sont des menaces pour la santé publique et la conservation des animaux. Les *Mansonella* sp. font parties des filaires qui infectent les PNH, et *M. perstans* est très répandu en Afrique subsaharienne où vivent une forte population de PNH. L'objectif de notre travail de thèse est de déterminer la prévalence, la diversité génétique des géohelminthes et des filaires du genre *Mansonella* à l'interface Homme/PNH au Cameroun et au Gabon.

Au total 315 échantillons fécaux provenant de 6 espèces de PNH (65 *Gorilla gorilla*, 12 *Mandrillus sphinx*, 222 *Pan troglodytes*, 9 *Cercocebus torquatus*, 3 *Cercocebus agilis* et 4 *Cercopithecus nictitans*) du Cameroun et du Gabon ont été analysés. L*'ITS2* a été amplifié pour détecter la présence de *Trichuris* sp., *Necator* sp., *Oesophagostomum* sp., et l'*ITS1* pour détecter la présence d'*Ascaris* sp. Les fragments d'ADN des gènes *cox1* et *12S* rDNA ont été amplifiés pour détecter la présence de filaires du genre *Mansonella* sp. Des gouttes de sang ont été collectées sur papier filtre chez 20 sujets humains présentant une infection connue à *M. perstans* vivant dans le district sanitaire d'Okola (Cameroun) ont été analysés afin de servir de références pour les analyses phylogénétiques.

Les gorilles étaient plus fréquemment infectés par *Necator* sp. 53,8% (35/65) suivis des chimpanzés 45,0% (100/222). Les gorilles étaient également les PNH les plus infectés par *Oesophagostomum* 78,5% (51/65), suivis des chimpanzés 70,7% (157/222), des mandrills (8/12) et des mangabeys (7/12). *O. bifurcum* a été détecté chez des chimpanzés et un mangabey à tête rouge. Seulement un gorille, un chimpanzé et un cerccopithèque hocheur étaient infectés par *Trichuris* sp. Aucun Ascaris n'a été observé dans aucun des échantillons analysés. Au total, 121 (38%) échantillons ont produit des séquences homologues aux séquences de référence d'Onchocercidae. Les analyses phylogénétiques ont montré que les séquences *cox1* obtenues à partir de cinq échantillons fécaux de chimpanzés du Gabon et de deux chimpanzés du Cameroun se regroupent avec *M. perstans*. La plupart des autres séquences se sont regroupées au sein du genre *Mansonella*. L'association entre la détection de l'ADN de filaire et la présence d'ADN de *Oesophagostomum* sp. et *Necator* sp. a été significative chez les gorilles. Les recherches futures devraient se concentrer sur une meilleure identification, au niveau moléculaire, des espèces de *Mansonella* sp. *Necator* sp. et d*'Oesophagostomum* sp. infectant les PNH et sur la manière dont les populations humaines peuvent être affectées par la proximité accrue résultant de l'anthropisation des zones forestières.

Mots clés : *Mansonella* sp., Géohelminthes, Phylogénie, Zoonose, Primates non humains, Afrique

Summary

Non-human primates (NHP) are infected with many species of parasites ranging from protozoa to helminths. The high prevalence of certain parasitic infections in HNPs may make these animals reservoirs of potentially zoonotic pathogens. Many geohelminths are shared between humans and HNPs: notably *Trichuris* sp., *Oesophagostomum* sp., *Ascaris lumbricoides*, hookworms. They are responsible for geohelminthiasis which are public health and animal conservation concerns. *Mansonella* sp. are among the filariae that infect HNPs, and *M. perstans* is widespread in sub-Saharan Africa where there is a large population of HNPs. The objective of our thesis is to determine the prevalence and genetic diversity of geohelminths and filaria of the genus *Mansonella* at the human/HNP interface in Cameroon and Gabon.

A total of 315 fecal samples from 6 PNH species (65 *Gorilla gorilla*, 12 *Mandrillus sphinx*, 222 *Pan troglodytes*, 9 *Cercocebus torquatus*, 3 *Cercocebus agilis* and 4 *Cercopithecus nictitans*) from Cameroon and Gabon were analyzed. The *ITS2* was amplified to detect the presence of *Trichuris* sp., *Necator* sp., *Oesophagostomum* sp., and the *ITS1* to detect the presence of *Ascaris* sp. DNA fragments of the *cox1* and *12S* rDNA genes were amplified to detect the presence of filariae of the genus *Mansonella* sp. Blood drops were collected on filter paper from 20 human subjects with known *M. perstans* infection living in the Okola Health District (Cameroon) and were analyzed to serve as references for phylogenetic analyses.

Gorillas were most frequently infected with *Necator* sp. 53.8% (35/65) followed by chimpanzees 45.0% (100/222). Gorillas were also the most infected HNPs with *Oesophagostomum* 78.5% (51/65), followed by chimpanzees 70.7% (157/222), mandrills (8/12) and mangabeys (7/12). *O. bifurcum* was detected in chimpanzees and a red-headed mangabey. Only one gorilla, one chimpanzee, and one greater spot-nosed monkey were infected with *Trichuris* sp. No *Ascaris* was observed in any of the samples analyzed. A total of 121 (38%) samples yielded sequences homologous to reference sequences of Onchocercidae. Phylogenetic analyses showed that *cox1* sequences obtained from five fecal samples of chimpanzees from Gabon and two chimpanzees from Cameroon clustered with *M. perstans*. Most other sequences clustered within the genus *Mansonella*. The association between detection of filaria DNA and the presence of *Oesophagostomum* sp. and *Necator* sp. DNA was significant in gorillas. Future research should focus on better identifying, at the molecular level, the species of *Mansonella* sp. *Necator* sp. and *Oesophagostomum* sp. infecting HNPs and how human populations may be affected by the increased proximity resulting from anthropization of forest areas.

Keywords: *Mansonella* sp., Soil transmitted-helminths, Phylogeny, Zoonosis, Non-human primates, Africa

Table des matières

Remerciements **1**

Résumé **2**

Summary **3**

Liste des figures **8**

Liste des tableaux **9**

Abréviations et acronymes **10**

CHAPITRE I : Introduction **12**

1.1 Le risque zoonotique 12

1.2 Les parasites etudiés 15

1.3 Justification de l'étude 20

1.4 Questions de recherche 20

1.5 Hypothèses 21

1.6 Objectifs 21

1.6.1 Objectif général 21

1.6.2 Objectifs spécifiques 21

1.7 Importance de l'étude 22

Chapitre II : Revue de la littérature **24**

2.1. Revue de la prévalence des géohelminthes chez les gorilles et les chimpanzés en Afrique 24

2.1.1 *Ascaris* sp. chez les chimpanzés et gorilles 24

2.1.2 *Trichuris* sp. chez les chimpanzés et gorilles 24

2.1.3 Ankylostomes chez les chimpanzés et gorilles 25

2.1.4 *Oesophagostomum* sp. chez les chimpanzés et gorilles 26

2.2. Helminthes du tractus gastro-intestinal des primates non-humains (PNH) 26

2.2.1 Morphologie et cycle évolutif de Trichuris sp. 26

2.2.2 Morphologie et cycle évolutif *d'Ascaris* sp 29

2.2.3 Morphologie et cycle évolutif des ankylostomes 31

2.2.4 Morphologie et cycle évolutif *d'Oesophagostomum* sp. 33
2.3 Filaire : *Mansonella* sp. 35
2.4 Manifestations cliniques des géohelminthiases chez les PNH 37
2.4.1 Ascaridiase chez les PNH 37
2.4.2 Ankylostomose chez les PNH 37
2.4.3 Oesophagostomose chez les PNH 38
2.4.4 Trichurose chez les PNH 38
2.5. Diagnostic biologique 38
2.5.1 Diagnostic biologique des GH 38
2.5.2 Diagnostic biologique de *M. perstans* 41
2.5.3 Diagnostic moléculaire 42
2.6 Lutte contre les zoonoses 44
2.6.1 Programmes de contrôle des GH 44
2.6.2 Médicaments anthelminthiques 45
CHAPITRE III : Matériel et Méthodes 48
3.1 Sites et populations d'étude 48
3.1.1 Somalomo 48
3.1.2 Lobéké/Mambélé 48
3.1.3 Djoum 49
3.1.4 Makatamangoye 51
3.2 Prélèvements de sang chez l'homme et extraction d'ADN de filaires 51
3.3 Collecte de fèces provenant de PNH 52
3.4 Analyses en laboratoire 54
3.4.1 Extraction d'ADN et détermination des espèces de PNH 54
3.4.2 Recherche d'ADN de filaires 55
3.4.3 Amplification des fragments *ITS* 55
3.4.4 Détection moléculaire d'*Oesophagostomum* sp. et *Necator* sp. 55

3.4.5 Détection moléculaire de *Trichuris* sp. 56
3.4.6 Détection moléculaire d'*Ascaris* sp. 56
3.4.7 Séquençage et analyse de séquences 59
3.5 Analyses 59
3.5.1 Analyses statistiques 59
3.5.2 Analyses phylogénétiques 59
Chapitre IV : Résultats 63
4.1 Article 1 : Infection des PNH sauvages par des GH au Cameroun et au Gabon 63
4.1.1 Espèces hôtes et génotypes des individus 63
4.1.2 Prévalence des infections par les GH 63
4.1.3 Prévalence des co-infections par *Oesophagostomum* et *Necator* chez les chimpanzés et les gorilles 66
4.1.4 Prévalence des infections parasitaires selon le sexe des PNH étudiés 67
4.1.5 Analyses phylogénétiques 68
4.2. Article 2 : Détection de l'ADN de filaires étroitement apparentées à *Mansonella perstans* dans des échantillons fécaux de primates non humains sauvages au Cameroun et au Gabon 75
4.2.1 Résultats PCR et homologie des filaires dans les fragments d'ADNr *cox1* et *12S* des six espèces de PNH 75
4.2.2 Analyses phylogénétiques des fragments des gènes *cox1* et *12S* ADNr 76
4.2.3 Relation entre la détection d'ADN de filaires dans les selles et présence d'une co-infection avec des nématodes gastro-intestinaux 81
Chapitre V : Discussion 84
5.1 Prévalence des infections par *Trichuris* sp., *Ascaris lumbricoides, Necator* sp. et *Oesophagostomum sp.* 84
5.2 Prévalence des infections par *Oesophagostomum* sp. et *Necator* sp. en fonction du sexe des PNH 85
5.3 Prévalence des infections par les géohelminthes en fonction des sites d'études 85
5.4 Analyses phylogénétiques des séquences d'ADN d'*Oesophagostomum* sp. 86

5.5 Coinfection *Oesophagostomum* et *Necator* 88

5.6 Détection de l'ADN de filaires du genre *Mansonella* dans les matières fécales 89

5.7 Analyses phylogénétiques des séquences d'ADN de filaires du genre *Mansonella* détecté chez les PNH 90

5.8 Détection d'ADN de filaires du genre *Mansonella* et co-infection avec *Oesophagostomum* sp., *Necator* sp..... 91

Chapitre VI : Conclusions 95

References 97

Annexes 121

Liste des figures

Figure 1 : Cycle évolutif de *Trichuris* sp. 28
Figure 2 : Cycle évolutif *d'Ascaris* sp. 30
Figure 3 : Cycle évolutif des ankylostomes. 32
Figure 4 : Cycle évolutif *d'Oesophagostomum* sp. 34
Figure 5 : Cycle évolutif de *M. perstans* 36
Figure 6 : Carte du Cameroun avec localisation de la Reserve de faunique du Dja (Somalomo, Djoum), et du Parc National de Lobéké. 50
Figure 7: Carte avec localisation du village de Matakamangoye (Gabon) 51
Figure 8 : Arbre phylogénétique construit selon la méthode du MV de la région ITS2 des espèces *Necator* inférées par le modèle HKY+F. 71
Figure 9 : Arbre phylogénétique construit selon la méthode du MV de la région ITS2 d'*Oesophagostomum* sp. inféré à l'aide du modèle K2P+G4. 73
Figure 10 : Arbre phylogénétique construit selon la méthode du MV de la région ITS2 de *Trichuris* sp. inféré à l'aide du modèle TN+F+R2. 74
Figure 11: Arbre phylogénétique basé sur les séquences du gène de la sous-unité 1 du cytochrome c oxydase (*cox1*) provenant de 85 spécimens d'Onchocercidae. 79
Figure 12: Arbre phylogénétique basé sur des séquences génétiques d'ADNr *12S* provenant de 52 spécimens d'Onchocercidae 80

Liste des tableaux

Tableau I : les espèces de *Trichuris* avec leurs hôtes définitifs et leur répartition géographique 18
Tableau II : les espèces d*'Ascaris* avec leurs hôtes définitifs et leur répartition géographique. 18
Tableau III : les espèces d'ankylostomes avec leurs hôtes définitifs et leur répartition géographique 19
Tableau IV : les espèces d*'Oesophagostomum* avec leurs hôtes définitifs et leur répartition géographique 20
Tableau V: Protocoles de traitement des helminthiases 46
Tableau VI: Résumé des caractéristiques des sites d'étude 53
Tableau VII : Amorces et programme d'amplification de la région *12S* de l'ADNr 55
Tableau VIII : Programmes d'amplification des produits PCR pour la détection des filaires. 57
Tableau IX : Programmes d'amplification des produits PCR 58
Tableau X : Résumé des analyses éffectuées au laboratoire 61
Tableau XI : Résumé des résultats de la PCR pour les GH et des séquences *ITS2* disponibles pour les analyses phylogénétiques 65
Tableau XII : Echantillons positifs à la PCR pour *Necator* et *Oesophagostomum* 66
Tableau XIII : Nombre de chimpanzés, de gorilles ou des deux espèces combinées, positifs ou négatifs pour *Oesophagostomum* sp., co-infectés ou non avec *Necator* sp. (les valeurs sous l'hypothèse nulle de co-infections, sont indiquées entre parenthèses) 67
Tableau XIV : Nombre de chimpanzés femelles et mâles positifs ou négatifs pour *Oesophagostomum* sp. et pour *Necator* sp. et comparaison de la prévalence entre les sexes.. 67
Tableau XV : Les espèces de GH, selon le site d'étude, les haplotypes, et le nombre de PNH chez lesquels des séquences ont été obtenues. 69
Tableau XVI : Résumé des résultats de la PCR pour les filaires et du BLASTn selon les espèces de PNH et le site de prélèvement 76
Tableau XVII : Résumé des résultats d'individus positifs dans les arbres phylogénétiques selon les espèces de PNH et le site de prélèvement. 78
Tableau XVIII : Association entre la détection d'ADN de filaires (ADNr *12S* et *cox1*) et l'infection par les nématodes gastro-intestinaux (*ITS2*) 81
Tableau XIX : Tableau de contingence des coinfections et résultat du test exact de Fisher (test bilatéral) 82

Abréviations et acronymes

12s rDNA	ADN ribosomique 12S
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNmt	ADN mitochondrial
ADNr	ADN ribosomique
COX1	*Cytochrome c oxidase subunit 1*
CP	Chimiothérapie Préventive
ELISA	*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
EPG	Œufs par gramme de selles
GH :	Géohelminthe
ITS1	*Internal Transcribed Spacer I*
ITS2	*Internal Transcribed Spacer II*
KK	Kato-Katz
LAMP	*Loop-Mediated isothermal Amplification*
MTN	Maladies Tropicales Négligées
MV	Maximum de Vraissemblance
NGS	*Next-Generation Sequencing*
ONG	Organisation Non Gouvernementale
PCR	*Polymerase Chain Reaction* ou réaction de polymérase en chaine
PN	Parc National
PNH :	Primates non humains
PNL	Parc National de Lobéké
SIV :	*Simian Immunodeficiency Virus*

CHAPITRE I : Introduction

CHAPITRE I : Introduction

1.1 Le risque zoonotique

Au cours des dernières décennies, les activités humaines ont entrainé des changements irréversibles des habitats des primates non humains (PNH) [1]. La recherche de nouvelles terres cultivables a considérablement réduit les espaces de vie des PNH augmentant ainsi les interactions entre ces derniers et les humains. Les mouvements migratoires (dus aux conflits armés ou à la recherche de terres plus fertiles) et la déforestation détruisent rapidement les habitats naturels des PNH sauvages, contraignant ces derniers à vivre en proximité avec les humains [2]. De plus, en Afrique, pour améliorer leur situation économique, les populations font le commerce de la viande issue de la chasse des PNH, ce qui aggrave la situation. La chasse est très répandue dans les us et coutumes des populations autochtones qui, initialement, chassaient surtout pour leur subsistance. Aujourd'hui, elle est devenue une activité génératrice de revenus ce qui conduit à l'abattage d'importantes quantités de gibier [3].

Les enquêtes parasitologiques menées sur différentes populations de PNH vivant en liberté ou maintenus en captivité ont permis de détecter la présence de nombreuses espèces de parasites allant des protozoaires aux helminthes [4]. La forte prévalence de certaines infections parasitaires chez les PNH peut faire de ces animaux des réservoirs de pathogènes potentiellement zoonotiques [5]. La transmission de ces parasites des PNH aux humains peut se faire par l'intermédiaire d'arthropodes vecteurs (exemple : *Plasmodium*), par transmission oro-fécale ou pénétration transcutanée (géohelminthes, GH) ou par contact direct ou prolongé avec le PNH (virus Ebola) [5].

Un certain nombre de maladies zoonotiques a été notifié, fournissant ainsi des preuves de la possibilité d'infection des PNH et des humains par les mêmes agents pathogènes. Tel est le cas de certains virus et bactéries transmis par voie aérienne et provoquant des infections respiratoires ou de la sphère ORL, comme les virus de la grippe, l'adénovirus, le rhinovirus, le virus respiratoire syncitial, les virus de la rougeole ou des oreillons, le cytomégalovirus, ou le pneumocoque ; ou de germes entériques comme les poliovirus, les virus Coxsackie, certaines bactéries (*Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*) [6]. La circulation de ces agents pathogènes parmi les PNH sauvages peut avoir des conséquences négatives pour la santé publique et les programmes de gestion et de conservation de la faune [7].

Les PNH sont les hôtes de plusieurs espèces de protozoaires sanguicoles, tissulaires et intestinaux qui peuvent causer des maladies graves chez les êtres humains. Des hématozoaires

du genre *Plasmodium* ont été décrits chez des gorilles, des chimpanzés et des bonobos [8–13]. Des données récentes ont fourni les preuves définitives que le parasite responsable du paludisme chez l'homme (*P. falciparum*) provenait des gorilles [13]. Les différentes espèces de *Plasmodium* infectant l'homme (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale, P. knowlesi*) ont été aussi retrouvées chez plusieurs espèces de PNH, et d'autres espèces du genre *Plasmodium* non décrite auparavant chez les chimpanzés et les gorilles ont été détectées en Afrique [11, 14–16].

Concernant les nématodoses, les PNH sont infectés par de nombreuses espèces de filaires. *Onchocerca volvulus*, responsable de l'onchocercose humaine a été observé une seule fois chez un gorille et peut être transmis expérimentalement au chimpanzé et au mangabey (*Cercocebus atys*). On considère cependant que ce parasite n'a pas de réservoir animal. *Dirofilaria immitis*, filaire responsable de graves problèmes cardiaques chez le chien et le chat, a été détecté chez les orangs-outans et plusieurs autres espèces du genre *Dirofilaria* ont été trouvées chez des PNH : *D. corynodes* chez des PNH des genres *Cercopithecus* et *Cercocebus* en Afrique, *D. tawila* chez des colobes d'Afrique de l'ouest, ou *D. repens*, *D. magnilarvatum* et *D. macacae* chez des macaques en Asie. *Loa loa*, l'agent étiologique de la loase humaine a également été signalé chez les gorilles, les chimpanzés, les drills, les mandrills et diverses espèces de cercopithèques [17]. On considère cependant que les « souches » humaine et simienne de *L. loa* ont un cycle parasitaire séparé. En effet, la densité des microfilaires de *L. loa* varie au cours du nycthémère, le pic de microfilarémie survenant dans la journée chez l'homme et dans la nuit chez les PNH. Comme les espèces de vecteurs (*Chrysops* sp.) qui transmettent les deux souches ne sont pas les mêmes, et que leurs rythmes d'activité, diurne ou nocturne, sont inversés (ils correspondant à la période de forte microfilarémie chez l'hôte définitif), il est probable que les deux souches circulent en parallèle et que la transmission de parasites de l'homme vers les PNH, et inversement, soit exceptionnelle. Les mansonelloses sont des filarioses considérées comme peu ou pas pathogènes pour l'homme. Les parasites responsables sont surtout, en Afrique, *Mansonella perstans*, dont les microfilaires sont sanguicoles. Les *Mansonella* sp. sont majoritairement transmis par des culicoïdes femelles lors du repas sanguin [18]. Un nouveau clade moléculaire de *M. perstans*, *M. perstans* "deux", a été signalé au Gabon [19]. Occasionnellement, des espèces zoonotiques telles que *M. rodhaini* et d'autres *Mansonella* sp. non identifiées sont retrouvées en infections humaines [18]. Orhiel *et al*. 1981 ont démontré par des infections expérimentales que les patas (*Erythrocebus patas*) étaient sensibles à l'infection par les souches de *M. ozzardi* de l'homme. Tous les singes patas ont développé des

microfilarémies modestes qui ont persisté jusqu'à un an. Des vers adultes ont été obtenus à l'autopsie de trois des quatre singes patas [20]. Il est prouvé que les *Mansonella* sp. font partie des filaires qui infectent les PNH, et *M. perstans* est très répandu en Afrique subsaharienne où vivent une forte population de PNH, mais aucune étude n'a été entreprise pour déterminer la prévalence et la diversité génétique de cette filaire chez les PNH au Cameroun et au Gabon.

Malgré les preuves de l'émergence et/ou de réémergence des agents infectieux, en 2008il avait été estimé que 10,7% de ces agents étaient des protozoaires, 6,3% des champignons et 3,3% des helminthes [21], très peu d'études ont été menées en Afrique centrale pour estimer la prévalence de ces infections chez les PNH. La majorité des données disponibles provient de l'Afrique de l'est [22–28].

La prévalence des infections causées par des parasites, des champignons, des bactéries et des virus en fonction du sexe montre que les mâles de nombreuses espèces animales sont plus souvent infectés que les femelles [29]. Plusieurs raisons sont avancées pour expliquer les différences d'infection en fonction du sexe. Elles seraient dues pour certains auteurs à des différences d'interactions endocriniennes et immunitaires, les androgènes chez les mâles et les œstrogènes chez les femelles, modulant le système immunitaire [29, 30]. En 2006, une étude a montré que les concentrations de testostérone et de cortisol dans les matières fécales des PNH étaient positivement associées à la richesse en parasites dans cet échantillon [24]. Cependant, la prévalence de Strongylidés chez des gorilles en République Centrafricaine était plus élévée chez les femelles (93,2% contre 90,3% chez les mâles) [31].

Aujourd'hui, la plupart des maladies infectieuses émergentes sont des zoonoses qui proviennent principalement d'animaux vertébrés sauvages. Des études ont démontré que le passage du SIV à l'homme s'est produit lors de la chasse, la consommation et la préparation de viande de brousse de primate en Afrique centrale et occidentale [32, 33]. Il a été démontré également que les PNH en contact étroit avec les humains ont une richesse parasitaire et une charge parasitaire plus élevées mais aussi une prévalence plus élevée de bactéries résistantes aux antibiotiques par rapport aux PNH ayant peu de contacts avec les hommes [34]. De nombreux GH sont partagés entre les humains et les PNH, notamment *Trichuris trichiura* [35], *Oesophagostomum* sp. [36], *Ascaris lumbricoides* [37, 38], *A. suum* [39] ou les ankylostomes [40]. Les résultats d'études épidémiologiques menées chez des PNH en captivité au Kenya et dans d'autre pays en Afrique rapportent des prévalences d'infection très élevées. Par exemple, une étude en Tanzanie relevait des prévalences de 100%, 72,9%, 58,3% et 52,1% pour, respectivement, *Oesophagostomum*, *Strongyloides*, *Trichuris* et *Trichostrongylus* [41]. Mais les données épidémiologiques

concernant la prévalence et la diversité génétique de ces GH chez des PNH sauvages font cependant défaut. L'objectif de la présente étude était de déterminer la prévalence et la diversité génétique des GH et des filaires du genre *Mansonella* sp. chez l'homme et les PNH vivant dans ou à proximité de parcs nationaux au Cameroun et au Gabon.

1.2 Les parasites etudiés

Les GH sont des vers nématodes intestinaux infectant principalement les populations qui habitent les régions tropicales et subtropicales. Les ascaris (*A. lumbricoides*), les trichocéphales (*T. trichiura*), les ankylostomes (*Necator americanus* et *Ancylostoma duodenale*) et, dans une moindre mesure, les vers nodulaires (*Oesophagostomum* sp.) sont répandus dans le monde entier. On estime que plus de 1,5 milliard de personnes sont infectées par au moins une espèce de GH au cours de leur vie, ce qui cause environ 135.000 décès par an [42]. Les enfants sont les plus touchés par l'ascaridiase et la trichocéphalose, qui provoquent chez eux une malnutrition, un retard de croissance et un retard intellectuel [43]. Les infections par les ankylostomes, également fréquentes chez les enfants mais pouvant aussi affecter massivement les adultes, sont responsables d'anémies, un problème grave particulièrement chez les plus jeunes et les femmes enceintes [44]. En prenant comme indice le coût par année de vie ajustée sur l'incapacité (indice DALY) comme mesure de l'impact de la maladie, les géohelminthiases causent une morbidité plus importante que toutes les autres maladies parasitaires sauf le paludisme [45]. En dépit de cette énorme morbidité, les géohelminthiases restent peu étudiées, malgré leur inclusion dans la liste des maladies tropicales négligées (MTN) de l'Organisation mondiale de la santé [46].

Les *Mansonella* sont des filaires humaines à transmission vectorielle. La transmission se fait par des culicoïdes femelles hématophages. Elles sont responsables de la mansonellose [47] dans de nombreuses régions d'Afrique subsaharienne. Des infections ont été signalées dans 33 pays africains et les prévalences sont souvent très élevées dans les zones d'endémie, même chez les enfants [47]. Au Cameroun, la prévalence de *M. perstans* était estimée à 70% dans les zones de forêt équatoriale [48]. Au Gabon, en 2014, la prévalence était de 4,7% chez des enfants de moins de 15 ans [19]. Les stades adultes de *M. perstans* se trouvent généralement dans les cavités mésentériques et les tissus péri-rénaux et rétropéritonéaux. Ceux de *M. streptocerca* vivent dans les tissus cutanés et sous-cutanés et ceux de *M. ozzardi* dans les cavités séreuses. Les microfilaires de *M. perstans* sont apériodiques et circulent dans le sang [49], celles de *M. streptocerca* vivent dans la peau, et celles de *M. ozzardi* à la fois dans le sang et la peau. La mansonellose peut se manifester par un prurit, des douleurs pectorales et thoraciques, des

étourdissements périodiques, des douleurs articulaires et dorsales et des symptômes oculaires [49]. La possibilité d'infection des humains par *M. rodhaini*, espèce trouvée dans les années 1940 chez des chimpanzés de la province de l'Equateur, en République Démocratique du Congo, a été évoquée au Gabon en 1982 [50, 51]. Des microfilaires très proches morphologiquement de celles de *M. rodhaini*, non encore décrites chez l'homme, ont été détectées dans les biopsies cutanées de sujets vivant à Fougamou et dans des campements reculés dans la forêt des Abeilles au Gabon [51]. De même, il a été démontré que des PNH peuvent héberger *M. perstans* et *M. streptocerca*, espèces considérées comme parasitant surtout les humains [52].

Au cours de la dernière décennie, les organisations gouvernementales et non gouvernementales ont intensifié leurs efforts pour lutter contre les MTN. En ce qui concerne les géohelminthiases, l'objectif initial de l'OMS était d'éliminer en 2020 la morbidité qui leur est associée en atteignant 75% de couverture chimiothérapique de masse pour les enfants d'âge préscolaire (2-4 ans) et d'âge scolaire (5-14 ans) chez les populations à risque. Des programmes de traitements de masse, associés au développement de l'éducation et de l'hygiène, ont permis de réduire l'impact des géohelminthiases [53]. Cependant, un potentiel obstacle majeur au contrôle global pourrait être l'existence d'un réservoir animal. Bien que des progrès significatifs aient été réalisés, le fardeau des MTN reste lourd pour la population qui en sont atteintes, qui sont par ailleurs parmi les personnes les plus vulnérables et marginalisées du monde. Une nouvelle feuille de route a été établie par l'OMS pour palier les insuffisances de celle de 2020. Des objectifs spécifiques pour 2030 et des objectifs intermédiaires pour 2023 et 2025 ont été fixés pour chacune des 20 MTN. Ansi, pour chaque MTN, on vise :

- l'éradication, définie comme la réduction permanente à zéro de l'incidence d'un agent pathogène spécifique, à la suite d'efforts délibérés, sans risque de réintroduction ;
- ou l'élimination (interruption de la transmission), définie comme la réduction à zéro de l'incidence de l'infection causée par un agent pathogène spécifique dans une zone géographique définie, avec un risque minimal de réintroduction, à la suite d'efforts délibérés ;
- ou l'élimination en tant que problème de santé publique, terme lié à la fois à l'infection et à la maladie, défini par la réalisation d'objectifs mesurables fixés par l'OMS pour une maladie spécifique ;
- ou la lutte, définie comme la réduction de l'incidence, de la prévalence, de la morbidité et/ou de la mortalité de la maladie à un niveau localement acceptable grâce à des efforts délibérés.

Les GH adultes vivent dans l'intestin et les vers femelles produisent chaque jour des milliers d'œufs qui sont évacués dans les selles. Les personnes s'infectent par l'ingestion ou le passage transcutané de stades infectieux du parasite présents dans l'environnement, notamment le sol chaud et humide et la végétation. Les stades infectieux d'*Ascaris* et de *Trichuris* sont les œufs évacués dans les selles. Pour les ankylostomes, il s'agit des larves qui, après éclosion des œufs, persistent dans le sol et se transforment en une forme qui peut pénétrer activement dans la peau. Les personnes sont infectées par l'ankylostome principalement en marchant pieds nus sur un sol contaminé [54].

Les mauvaises conditions sanitaires, en particulier en milieu rural, sont favorables à la création de foyers locaux d'infection. Certains vers intestinaux trouvés chez les humains infectent aussi d'autres mammifères, y compris les PNH, les porcs et les ruminants [55]. Les populations humaines vivant à la lisière des forêts risquent d'être infectées par des GH présents chez les animaux sauvages lorsqu'elles pénètrent dans les forêts environnantes et, inversement, les populations humaines pourraient également constituer une source d'infection pour la faune forestière. Le partage parasitaire de GH entre humains et PNH peut avoir des répercussions en termes de santé publique mais son importance est actuellement peu documentée.

Les scientifiques travaillant à l'évaluation des risques de maladies zoonotiques émergentes se sont particulièrement intéressés aux parasites multi-hôtes infectant les PNH, nos parents les plus proches. Il y a une dizaine d'années, on estimait que seulement 20% des helminthes infectant les PNH étaient capables de provoquer des infections chez l'homme et qu'environ la moitié d'entre eux étaient strictement spécifiques à l'espèce [56]. Cependant, des recherches plus récentes menées dans des zones d'interface entre populations humaines et de PNH ont remis en question le potentiel zoonotique réduit des GH. Par exemple, les trichocéphales *T. trichiura* ou *Trichuris* sp. ont été détectés chez 10 familles de primates sur trois continents [57–59] et sont présents chez de nombreuses espèces de primates en Afrique [60, 61]. La faible diversité d'espèces de *Trichuris* chez les primates contraste fortement avec le nombre élevé d'espèces trouvées chez d'autres mammifères (tableau I) [58, 62]. Cela pourait s'expliquer par le grand nombre de travaux de recherche menés sur les géohelminthes infectant les animaux domestiques et les animaux des élevages destinés au commerce, comparativement aux travaux menés chez les PNH sauvages.

Tableau I : les espèces de *Trichuris* avec leurs hôtes définitifs et leur répartition géographique

GH	Hôtes	Distribution géographique
Trichuris sp.	Homme, PNH, porc, chien	Afrique, Europe, Moyen-Orient, Asie, Océanie, Amérique du Nord et Centre, Amérique du Sud
T. trichiura	Homme, PNH, porc, chien	
T. suis	Homme, PNH, porc, chien	
T. vulpis	Homme, chien	
T. muris	Souris	
T. ovis	Chèvre	
T. discolor	Bovin	
T. arvicolae	Campagnol roussâtre	
T. skrjabini	Chèvre	
T. leporis	Lièvre d'Europe	Europe

Il est donc improbable que les primates soient infectés par une ou deux espèces de trichocéphales seulement [63, 64]. En effet, l'identification de lignées cryptiques de *Trichuris*, dont certaines infectent de multiples espèces de primates, y compris les humains, suggère leur potentiel zoonotique [65].

Cependant, l'échantillonnage et les données taxonomiques actuelles sont biaisés en faveur des parasites ayant un impact médical ou vétérinaire, et très peu d'information existe sur les *Ascaris* infectant les animaux sauvages, y compris de nombreux PNH. Il convient de noter que les quelques études qui ont été menées sur les PNH sauvages, tels que les chimpanzés [66], les babouins [67] et les gibbons, ont montré qu'ils peuvent être infectés par la même espèce (*A. lumbricoides*) que les humains. Il a été démontré récemment que les chimpanzés vivant en captivité peuvent également développer des infections à *A. suum* suite à une association étroite avec des porcs (tableau II) [68, 69]. Ces résultats laissent penser qu'une transmission à l'homme d*'Ascaris* provenant des chimpanzés et éventuellement d'autres PNH est possible.

Tableau II : les espèces d*'Ascaris* avec leurs hôtes définitifs et leur répartition géographique.

GH	Hôtes	Distribution géographique
Ascaris sp.	Homme, PNH, porc	Cosmopolite
A. lumbricoides	Homme, PNH, porc	
A. suum	Homme, PNH, porc	

L'ankylostomiase humaine est très répandue en Afrique subsaharienne [70]. Alors que l'homme est souvent considéré comme le seul hôte naturel de *N. americanus*, d'autres primates, notamment les gorilles, les chimpanzés, plusieurs espèces de singes de l'Ancien et du Nouveau Monde et d'autres mammifères ont été trouvés infectés par ce nématode (tableau III) [68].

Tableau III : les espèces d'ankylostomes avec leurs hôtes définitifs et leur répartition géographique

GH	Hôtes	Distribution géographique
Necator sp.	Homme, PNH	Cosmopolite
N. americanus	Homme, PNH	Prédomine au sud du Tropique du Cancer : Afrique tropicale, Asie méridionale, Inde et îles du Pacifique
Ancylostoma duodenale	Homme, PNH	Prédomine au nord du Tropique du Cancer : région méditerranéenne, Inde, Chine, sud-est asiatique, Japon, Amérique du Sud, îles du Pacifique, Australie
N. gorillae	PNH, Homme	RDC, République Centrafricaine
A. ceylanicum	Homme, chien, chat et hamster dorés	Cosmopolite
A. caninum	Chien	Cosmopolite
A. braziliense	Chien et chats	Cosmopolite

En République Centrafricaine, des infections humaines par *N. gorillae*, parasite des PNH, ont été décrites à partir des caractéristiques morphologiques des vers adultes [40]. Au Gabon également, des *Nector* sp. (Probablement des *N. gorillae*) ont été retrouvés chez des hommes et des chimpanzés [71]. Des travaux récents ont fourni les premières preuves moléculaires que les gorilles sauvages des plaines occidentales (*Gorilla gorilla gorilla*), coexistant avec les humains dans un environnement forestier commun, sont parasités par *N. americanus*, démontrant ainsi qu'il existe un potentiel de transmission bidirectionnelle des ankylostomes entre les humains et les singes dans les zones de contact [40, 72]. Ces études apportent les preuves que *N. gorillae* est capable d'infecter les hommes. Il est donc probable que le nombre d'espèces de *Necator* qui infectent les populations rurales africaines soit sous-estimé et que d'autres espèces de *Necator* d'origine zoonotique peuvent être plus fréquentes qu'on ne le pensait auparavant.

Enfin, plusieurs espèces d'*Oesophagostomum* ont été décrites chez des primates sauvages, dont trois sont capables d'infecter l'homme [73, 74]. Parmi ceux-ci, *O. bifurcum* semble être la seule espèce à parasiter régulièrement les humains, les infections par d'autres espèces étant considérées comme accidentelles. Le Togo et le Ghana sont les pays d'Afrique de l'ouest où des foyers endémiques d'oesophagostomose humaine ont été détectés, la prévalence étant la plus élevée dans les zones rurales [75]. La seule espèce connue à l'origine de l'infection dans ces pays est *O. bifurcum*, des variants spécifiques à certaines espèces d'hôtes infectant également les PNH de la région [75, 76]. Plus récemment, une étude menée en Ouganda a également révélé une prévalence de 25% d'*Oesophagostomum* dans la population humaine [65]. L'Ouganda se trouvant à plus de 3.000 km des foyers d'infection connus en Afrique de l'ouest, il est probable que ce parasite soit beaucoup plus répandu en Afrique subsaharienne qu'on ne le

pensait auparavant. Comme en Afrique de l'ouest, un certain nombre d'espèces de PNH ont été trouvés infectés par *Oesophagostomum* en Ouganda. Ceux-ci comprennent des membres des sous-familles de primates *Cercopithecinae* et *Colobinae*, ainsi que des chimpanzés (*Pan troglodytes*) [77, 78] (tableau IV).

Tableau IV : les espèces d'*Oesophagostomum* avec leurs hôtes définitifs et leur répartition géographique

GH	Hôtes	Distribution géographique
Oesophagostomum sp.	Homme, PNH, porcs	Afrique (Ghana, Togo, Ouganda, Gabon, Tanzanie, Afrique du Sud) Brésil, Chine, Indonésie, Philippines
O. bifurcum	Homme, PNH, porcs	
O. stephanostomum	Homme, PNH, porcs	
O. aculeatum	Homme, orang-outan de Bornéo, macaque à longue queue, singe nasique (Nasalis narvatus), langur argenté, macaque japonais	Asie : Japon, Malaisie, Indonésie
O. radiatum	Bovin	Afrique, Brésil, Chine, Indonésie, Philippines, USA
O. venulosum	Bison	Europe
O. dentatum	Porcs	Afrique, Brésil, Chine, Indonésie, Philippines, USA
O. quadrispinulatum	Porcs	Afrique, Brésil, Chine, Indonésie, Philippines, USA
O. columbianum	Moutons, chèvre, ruminants sauvages	Afrique, Brésil, Chine, Indonésie, Philippines

1.3 Justification de l'étude

Les données concernant les infections par GH et par les filaires du genre *Mansonella* chez les PNH au Cameroun et au Gabon sont très limitées. Les données existantes ne permettent pas d'avoir une bonne estimation du niveau d'infection des PNH sauvages ou de ceux ayant des contacts réduits avec les humains. Avec la diminution des espaces naturels, les PNH interagissent davantage avec les humains que les autres animaux sauvages (attaque des champs). Notre étude vise à mesurer la prévalence et à étudier les différences génétiques des GH potentiellement zoonotiques, et à rechercher l'ADN de *Mansonella* sp. dans les fèces des PNH. Nos échantillons ont été collectés à Somalomo, Djoum, Mambelé et Lobeke NP au Cameroun et à Makatamangoye au Gabon.

1.4 Questions de recherche

- Quelle est la prévalence et la diversité génétique des nématodes gastro-intestinaux potentiellement zoonotiques chez les PNH au Cameroun et au Gabon ?
- Quelle est la prévalence et la diversité génétique de *Mansonella* sp. chez les PNH au Cameroun et au Gabon ?

- Existe-t-il une différence au niveau génétique entre les GH et *Mansonella* sp. infectant les PNH et ceux retrouvés chez les humains ?

1.5 Hypothèses

Dans le cadre de l'étude sur la prévalence et la diversité génétique des GH chez les PNH au Cameroun et au Gabon nous émettons les hypothèses suivantes :

1. La prévalence des GH varie selon les espèces de PNH et les sites
2. Des GH infectant principalement les humains sont retrouvés chez les PNH
3. Le taux d'infection est fonction du sexe de l'hôte
4. La prévalence des co-infections est fonction des espèces de PNH

En ce qui concerne l'étude sur la détection de filaires chez les mêmes populations de PNH :

1. Les infections par des filaires à microfilaires sanguines peuvent être diagnostiquées à partir de l'ADN extrait d'échantillons fécaux
2. La présence d'ADN de filaires dans les fèces est associée à des co-infections avec des nématodes strongylides, y compris des ankylostomes

1.6 Objectifs

1.6.1 Objectif général

Déterminer la prévalence, la diversité génétique et la dynamique de transmission des GH et des filaires du genre *Mansonella* à l'interface Homme/PNH au Cameroun et au Gabon.

1.6.2 Objectifs spécifiques

- Déterminer la prévalence et la diversité génétique des GH (*Trichuris* sp., *Ascaris* sp., *Necator* sp. et *Oesophagostomum* sp.) infectant les PNH vivant dans les forêts fragmentées/perturbées du Cameroun et du Gabon
- Déterminer la relation entre la présence d'ADN de filaire et la co-infection avec des nématodes strongylidés, y compris les ankylostomes
- Rechercher des filaires à partir d'ADN extrait d'échantillons fécaux de différentes espèces de PNH vivant dans les régions forestières du Cameroun et du Gabon
- Caractériser et comparer les espèces de filaires trouvées dans les fèces des PNH, ainsi que chez l'homme

1.7 Importance de l'étude

L'augmentation rapide de la population humaine, de son bétail et le changement des pratiques agricoles conduit à des interactions nombreuses et fréquentes, avec les espèces animales sauvages et les agents pathogènes qu'elles transportent [79]. La fragmentation des habitats réduit la biodiversité de 13 à 75 % [80]. Ainsi, alors que la perte et la fragmentation des habitats peuvent réduire la diversité des espèces, l'empiètement des habitats par l'homme sur les zones riches en espèces peut accroître l'exposition de l'homme à de nouveaux agents infectieux provenant de la faune sauvage [79]. La biodiversité est une source d'agents pathogènes, mais aussi que la perte de biodiversité ou sa régulation, mesurée par la couverture forestière ou les espèces menacées, semble être associée à une augmentation des épidémies de zoonoses et de maladies à transmission vectorielle [81]. Il a été démontré avec la maladie à virus Ebola que la fragmentation des habitats conduit à l'émergence de maladies infectieuses [82]. La densité de la population humaine est fortement corrélée au risque d'émergence de toutes les principales classes de maladies infectieuses émergentes [83]. Notre étude va donc mettre à disposition des informations épidémiologiques sur les GH potentiellement zoonotiques infectant les PNH au Cameroun et au Gabon, dans des zones de forêt dégradée ou l'activité humaine entraine une perte de la biodiversité. L'autre intérêt de la recherche de filaires du genre *Mansonella* chez les PNH est de démontrer l'existence d'un réservoir de parasites pouvant être source de récontamination dans les zones d'endémie comme au Cameroun. Ces informations sont importantes car elles peuvent influer sur les stratégies de contrôle des infections. Elles serviront de base pour la planification des politiques sanitaires et pour les prises de décision. Nos résultats seront utilisés pour la sensibilisation des populations vivant autour des forêts sur les dangers (en termes de maladies zoonotiques) de la vie à proximité de la faune sauvage.

Chapitre II : Revue de la littérature

Chapitre II : Revue de la littérature

2.1. Revue de la prévalence des géohelminthes chez les gorilles et les chimpanzés en Afrique

Dans la littérature, 45 études ont rapporté des infections par les GH (*Ascaris* sp., *Trichuris* sp., *Oesophagostomum* sp. et ankylostomes) chez les chimpanzés [22–27, 31, 36, 61, 65, 66, 71, 72, 77, 84–107] et/ou chez les gorilles [31, 66, 71, 72, 90, 93, 94, 106, 108–111] dans les quatre grandes régions d'Afrique. La majorité des études a été menée en Ouganda (15 études) et en Tanzanie (10 études). Les données des infections des chimpanzés et gorilles par les GH sont rares au Cameroun et au Gabon. Seulement deux études au Cameroun [98, 106], et trois études au Gabon [66, 71, 111] ont étudié les infections des chimpanzés et des gorilles par les GH.

2.1.1 *Ascaris* sp. chez les chimpanzés et gorilles

Douze études ont rapporté des données de prévalence de l'infection par *Ascaris* sp. [22, 26, 31, 66, 77, 89, 91, 93, 95, 98, 108, 112] chez les PNH. En République Centrafricaine (RCA), Lilly *et al*. (2002) ont trouvé une prévalence de 21,8% chez les gorilles, et de 14% chez les chimpanzés. Pour les populations humaines vivant sur le site de l'étude (Mondika), la prévalence était de 10,3% chez les Ba'Aka et 15,4% chez les chercheurs [31]. Les Ba'Aka, sont des chasseurs-cueilleurs traditionnels. Ils sont semi-sédentaires, mais font souvent de longues incursions de chasse dans la forêt tropicale. Les chercheurs occidentaux font aussi, dans le cadre de leurs travaux de recherche, des incursions dans la forêt pour collecter les fèces de PNH. Les Bantous sont des agriculteurs ayant un style de vie sédentaire. Aucune infection par *Ascaris* sp. n'a été détectée dans cette population. A Lopé, au Gabon, Landsoud-Soukate *et al*. (1995) ont trouvé que les gorilles ne présentaient pas d*'Ascaris* sp. seuls les chimpanzés étaient infectés, avec une prévalence de 3% [66]. Au Cameroun, dans le cadre de leur étude sur les fèces de chimpanzés SIV-positifs, Drakulovski *et al*. (2014) ont rapporté une prévalence de l'infection par *A. lumbricoides* de 2,3% [98]. Des prévalences élevées ont été trouvées chez des chimpanzés en Tanzanie (23,38%) [26], au Nigéria (21,74%) [95], et en RDC (21,2%) [93]. Chez les gorilles, la prévalence la plus élevée était de 21,8% rapportée en RCA [31]

2.1.2 *Trichuris* sp. chez les chimpanzés et gorilles

Au total, 24 articles ont rapporté la présence de *Trichuris* sp. chez les chimpanzés [22, 26, 27, 31, 77, 85, 87–89, 91–93, 95–98, 100, 103, 105, 107, 110, 112, 113]. La prévalence la plus élevée était de 60% et a été rapportée par Dawet *et al*. au Nigéria chez des chimpanzés du jardin zoologique de Jos (Plateau State) [91]. Quatre articles mentionnent la présence de *Trichuris* sp.

chez des gorilles [31, 77, 93, 110]. Graber *et al*. (1981), en analysant le contenu gastrointestinal, après éclaircissement au lactophenol, de gorilles provenant de la République Démocratique du Congo (RDC), ont trouvé un taux d'infection de 23,5% [93]. Au Rwanda, Sleeman *et al*., en analysant les fèces de gorilles sauvages (non habitués) du Parc National des Volcans, par les méthodes de flotation au sucre et au sulfate de zinc de Sheather, la coloration au trichrome et la culture des larves, ont rapporté une prévalence d'infection par *T. trichiura* égale à 2,7% [110]. Lilly *et al*. (2002) ont déterminé la prévalence des helminthes et des protozoaires chez les gorilles, les chimpanzés, les mangabeys agiles, et chez les humains (les Ba'Aka, les Bantous autochtones, et les chercheurs occidentaux) à Mondika (RCA). Seuls les Ba'Aka et les Bantu étaient infectés par des *Trichuris*, et les Ba'Aka avaient à la fois la prévalence la plus élevée (75%) et la charge parasitaire la plus élevée. Cependant ces auteurs n'ont pas trouvé d'infection à *Trichuris* sp. chez les PNH [31].

2.1.3 Ankylostomes chez les chimpanzés et gorilles

Au total, 13 études ont rapporté des données de prévalence pour les *Necator* sp. Les données disponibles ont été pour la majorité obtenues en Afrique de l'est. L'Ouganda, avec deux études [22, 71], et la Tanzanie, où nous avons retrouvé trois études [26, 92, 107] sont les pays où la majorité des données concernant l'infection à *Necator* sp. chez les chimpanzés a été recueillie. Dans l'ensemble, les prévalences de l'infection par les ankylostomes étaient elevées. En utilisant des techniques de biologie moléculaire, Hasegawa *et al*. (2017) ont trouvé une prévalence de *Necator* de 100% chez des chimpanzés en Ouganda [71]. Des résultats similaires ont été rapportés par Pafco *et al*. (2019) qui, en utilisant des techniques de biologie moléculaire, ont trouvé 100% d'infection dans leur population de chimpanzés, et 96,8% chez les gorilles ayant des contacts avec les humains dans les aires protégées de Dzanga-Sangha en RCA. Les échantillons humains provenant de chasseurs-cueilleurs traditionnels Ba'Aka et des membres de leurs familles inclus dans l'étude étaient positifs à 100% pour *Necator*, et 21,3% pour *Ancylostoma* [114]. Une étude au Gabon [71], et une autre au Cameroun [106] donnent des prévalences d'infection par *Necator* chez des gorilles non habitués en contact avec les humains. En 2017, après mise en culture de fèces de gorilles habitués du parc Moukalaba-Doudou National au Gabon, suivie de techniques de diagnostic moléculaire, Hasegawa *et al*. ont trouvé 22,2% de gorilles infectés par des *Necator* [71]. Au Cameroun, Hamad *et al*. (2014), utilisant une approche moléculaire, ont trouvé une prévalence de 43% chez des gorilles [106].

2.1.4 *Oesophagostomum* sp. chez les chimpanzés et gorilles

Les cas d'infection par *Oesophagostomum* ont été rapportés par 26 études. Dix de ces études ont été menées sur des chimpanzés en Ouganda [22, 23, 25, 28, 36, 65, 77, 86, 94, 102], et 7 études sur des chimpanzés en Tanzanie [26, 27, 85, 92, 96, 97, 107]. Les prévalences les plus rélevées étaient de 100% et ont été rapportées par Pafco *et al*. en RCA et Ghai *et al*. [65, 90]. En Ouganda, en utilisant les techniques de volumétrie dilution et de la coloration de fèces de gorilles sauvages à l'iode, Ashford *et al*. (1990) ont trouvé *Oesophagostomum* sp. chez tous les gorilles inclus dans leur étude [115]. Au Cameroun, Hamad *et al*. (2014) ont trouvé à l'aide de la qPCR une prévalence de 86% chez des gorilles [106]. Au Gabon, Makoulouto *et al*. (2014) ont rapporté une prévalence de 44,1% chez les gorilles du parc national Moukalaba-Doudou [111]. Aucune des études menées au Cameroun et au Gabon n'a détecté la présence d*'Oesophagostomum* chez les chimpanzés.

Ces résultats montrent que des GH au potentiel zoonotique circulent encore dans les régions endémiques d'Afrique. On note également le peu de données en provenance du Cameroun et du Gabon. Les faibles prévalences rapportées pour certains GH (*Ascaris* et *Trichuris*) pourraient être dues au sous-diagnostic des helminthes car peu d'études ont eu recours aux techniques moléculaires pour le diagnostic des GH chez le PNH. Les techniques moléculaires utilisant des amorces sensibles et spécifiques peuvent être des outils efficaces pour détecter des infections de faible intensité, pour étudier la diversité génétique des GH et pour identifier les vers potentiellement pathogènes pour l'homme.

2.2. Helminthes du tractus gastro-intestinal des primates non-humains (PNH)

2.2.1 Morphologie et cycle évolutif de Trichuris sp.

Classification :

Règne	Animalia
Phylum	Nematoda
Classe	Adenophorea
Ordre	Trichurida
Famille	Trichuridae
Genre	*Trichuris*
Espèces principales	*T. trichiura, T. suis, T. vulpis*

Les *Trichuris* sp. sont des parasites à cycle monoxène long (un seul hôte, et maturation des stades infectants dans le milieu extérieur) infectant des mammifères. Les principales espèces sont *T. trichiura* (infectant homme et PNH), *T. suis* (hôte principal : porc), *T. vulpis* (chien et canidés sauvages) et *T. muris* (rongeurs). Ce sont des vers hématophages. L'infestation se fait exclusivement par ingestion des œufs embryonnés via la consommation d'eau ou d'aliments contaminés par des matières fécales. Lorsque les œufs sont ingérés, la coque est dissoute et les larves de premier stade (L1) sont libérées. Après quatre mues dans la paroi intestinale, les parasites atteignent le stade adulte. Ils sont retrouvés au niveau du cæcum un à trois mois après l'ingestion des œufs infectants. Leur partie antérieure est enfouie dans l'épithélium dans un canal sinueux qui soulève la surface de la muqueuse. Les mâles mesurent 30 à 45 mm et les femelles 35 à 50 mm de long [116]. Les vers comprennent une partie antérieure céphalique effilée, d'environ 100 µm de diamètre, renfermant l'œsophage, et une partie caudale plus large, d'environ 500 µm de diamètre, contenant l'intestin et l'appareil reproducteur [116]. Après accouplement avec des mâles, les femelles adultes vont produire des œufs non embryonnés mesurant 50 à 65 µm de long et 23 à 30 µm de diamètre, entourés d'une coque brune épaisse et présentant un bouchon muqueux à chaque extrémité (leur donnant une forme de citron) [116]. Les femelles commencent à pondre un mois après l'infestation. Une femelle pond entre 2000 et 30.000 œufs par jour.

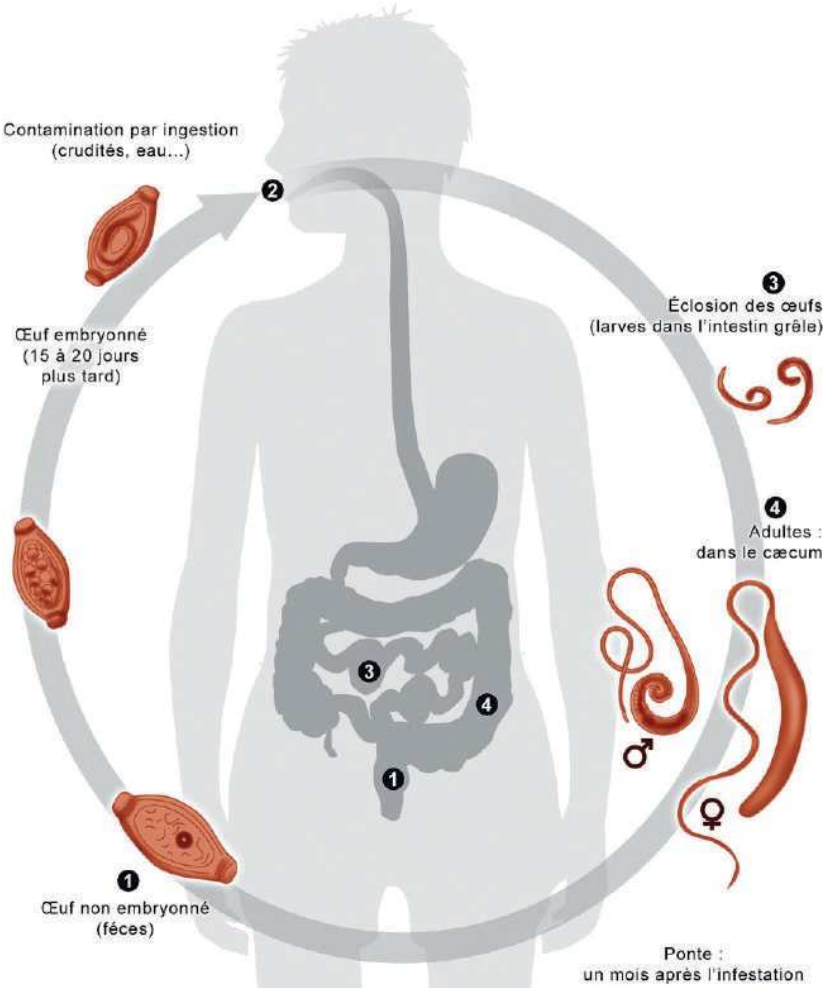


Figure 1 : Cycle évolutif de *Trichuris* sp.

Source : ANOFEL : Parasitoses et mycoses des régions tempérées et tropicales

2.2.2 Morphologie et cycle évolutif *d'Ascaris* sp.

Classification :

Règne	Animalia
Phylum	Nematoda
Classe	Secernentea
Ordre	Ascaridida
Famille	Ascarididae
Genre	*Ascaris*
Espèces principales	*A. lumbricoides, A. suum*

Les *Ascaris* sp. sont des nématodes de grande taille. *A. lumbricoides* est responsable de l'ascaridiose humaine. Elle est fréquente dans les pays tropicaux, où les structures de traitement des eaux usées sont insuffisantes, et de plus en plus rare dans les pays tempérés. La contamination se fait par voie orale, par ingestion d'eau ou d'aliments souillés par des œufs embryonnés. Les deux premières mues larvaires (L1-L2 et L2-L3) se produisent à l'intérieur de l'œuf, dans le tube digestif. Sous l'action du suc gastrique et d'enzymes (protéinases et chitinases) sécrétées par la L3, celle-ci est libérée au niveau de l'intestin grêle. La L3 migre ensuite jusqu'au cæcum ou au colon ; à ce niveau, elle traverse la paroi intestinale et gagne le foie par la veine porte ou en rampant sur le péritoine. Par les veines hépatiques, elle poursuit son trajet dans la circulation sanguine, atteint le cœur et la circulation jusqu'aux capillaires pulmonaires, où elle s'embolise. Elle franchit alors la paroi alvéolo-capillaire, passant ainsi de la voie sanguine à la voie aérienne. La L3 va quitter les alvéoles et remonter les bronchioles, les bronches et la trachée pour parvenir au carrefour aéro-digestif. Sa présence à ce niveau détermine une toux reflexe et, à la faveur d'un mouvement de déglutination, elle bascule dans le tube digestif : œsophage, estomac puis intestin grêle. A ce niveau, la L3 mue en L4, puis en adulte, 9 à 11 semaines après l'ingestion des œufs [54, 68]. Les adultes sont caractérisés par leur grande taille et leur mobilité. De couleur rosée, ronds, ils vivent de 6 à 18 mois dans le jéjunum où ils ingèrent les particules alimentaires [68]. Les mâles mesurent 15 à 25 cm de long et 2 à 4 mm de diamètre ; leur extrémité postérieure est recourbée en crosse. Les femelles mesurent 20 à 35 cm de long et 3 à 6 mm de diamètre et peuvent pondre jusqu'à 200.000 œufs par jour. Les œufs ovoïdes non embryonnés, mesurant 60 à 70 µm de long par 40 à 50 µm de large, sont évacués avec les fèces. Ils sont entourés d'une double coque brune, d'aspect

mamelonné très caractéristique, qui les rend très résistants au froid, à la chaleur, à la dessiccation et aux produits chimiques puissants. En fonction des conditions du milieu extérieur (température et humidité), ces œufs vont s'embryonner en deux à quatre semaines.

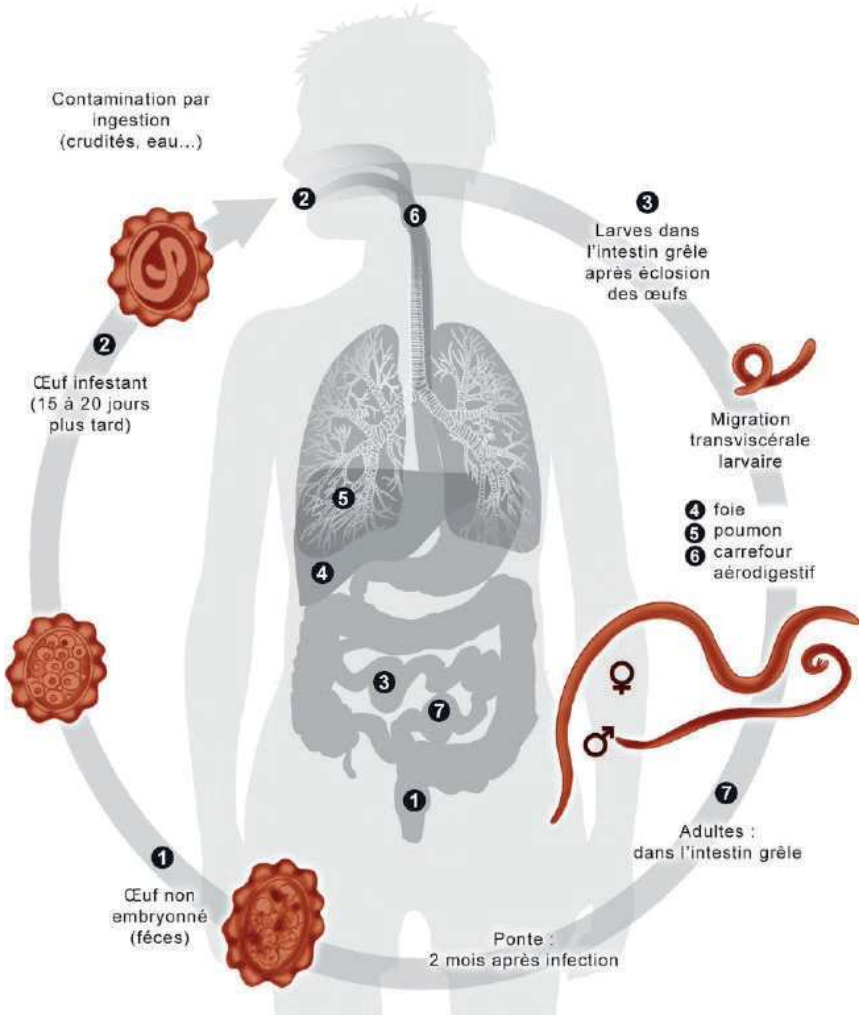


Figure 2 : Cycle évolutif *d'Ascaris* sp.

Source : ANOFEL : Parasitoses et mycoses des régions tempérées et tropicales

2.2.3 Morphologie et cycle évolutif des ankylostomes

Classification :

Règne	Animalia
Phylum	Nematoda
Classe	Secernentea
Ordre	Strongylida
Famille	Ancylostomidae
Genres	*Ancylostoma, Necator*
Espèces principales	*Ancylostoma duodenale, Necator americanus*

Les ankylostomes sont des parasites à cycle monoxène long. Les hôtes principaux d*'A. duodenale* et *N. americanus* sont l'homme et les PNH. La contamination par *N. americanus* se fait exclusivement par voie transcutanée. Les larves strongyloïdes (L3), longues de 600 µm, pénètrent dans la peau, en suivant les follicules pileux, au niveau des pieds (chez les personnes marchant pieds nus dans la terre, les boues et les eaux souillées) ou des mains. Pour A. duodenale, la contamination se fait par voie transcutanée mais aussi, de manière marginale, par voie buccale [117]. Lors de la pénétration cutanée, les larves infectieuses (L3) perdent leur gaine. Grâce à des mouvements de reptation et à la sécrétion de diverses molécules, dont des enzymes (protéases, hyaluronidases), elles progressent et pénètrent dans les vaisseaux capillaires et lymphatiques de la peau. Elles gagnent ensuite le cœur puis la circulation pulmonaire, traversent la paroi alvéolo-capillaire et remontent l'axe aérien jusqu'à la trachée, avant d'être dégluties dans le tube digestif. Arrivées dans le duodénum, les larves subissent, vers le 28ème jour, une nouvelle mue (L3-L4), puis se transforment définitivement en ver adulte. On estime qu'il s'écoule approximativement 49 jours (pour *A. duodenale*) à 56 jours (pour *N. americanus*) entre le moment où la larve L3 pénètre dans l'organisme de l'hôte et le moment où le ver adulte femelle libère ses œufs [54, 118]. Les adultes mesurent de 8 à 18 mm de long et 0,5 à 0,8 mm de diamètre selon l'espèce et le sexe. Après accouplement, les fmelles émettent dans les selles des œufs contenant quatre blastomères pour *A. duodenale* et huit blastomères pour *N. americanus*. Dans le milieu extérieur, l'embryon se forme en 24 à 48 heures. Après avoir percé la coque de l'œuf, une larve rhabditoïde L1, à double renflement œsophagien, est libérée. Celle-ci subit une première mue, devenant une larve strongyloïde L2 avec un seul renflement œsophagien terminal. Ce n'est cependant qu'au stade suivant L3 que la larve grandit et devient infectieuse.

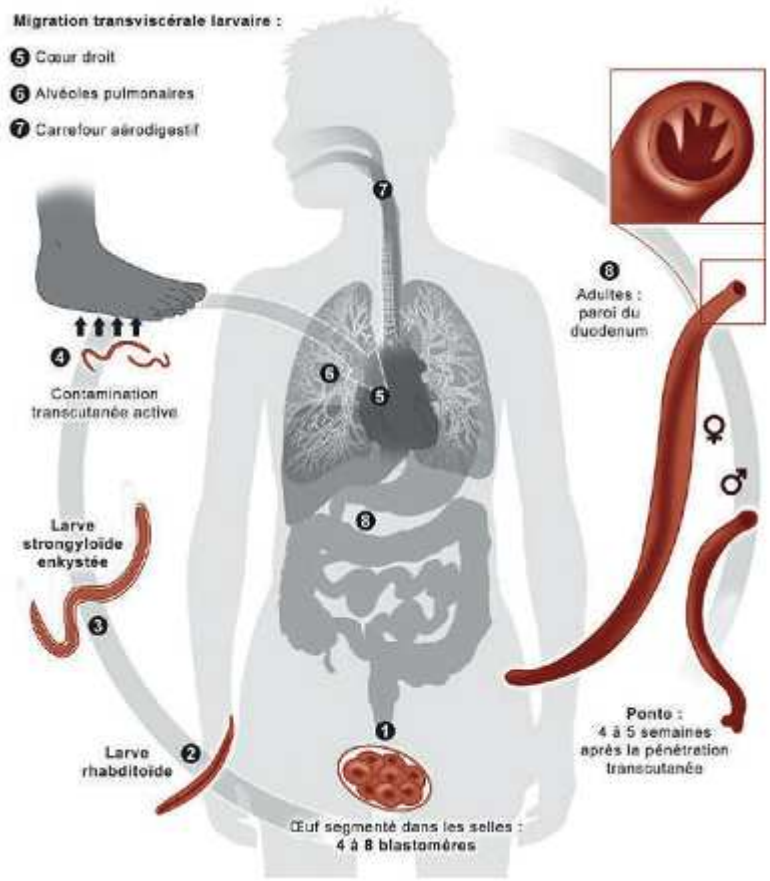


Figure 3 : Cycle évolutif des ankylostomes.

1à 4 : Maturation des œufs et larves dans le milieu extérieur. 5 à 7 : Phase de migration tissulaire.

8 : Installation des adultes dans le grêle initial (phase d'état).

Source : ANOFEL : Parasitoses et mycoses des régions tempérées et tropicales

2.2.4 Morphologie et cycle évolutif *d'Oesophagostomum* sp.

Classification :

Règne	Animalia
Phylum	Nematoda
Classe	Secernentea
Ordre	Stongylida
Super-famille	Strongyloidea
Sous famille	Oesophagostominae
Genre	*Oesophagostomum*
Espèces principales chez les primates	*O. bifurcum, O. stephanostomum, O. aculeatum*

Le cycle *d'Oesophagostomum* sp. est monoxène. Les hôtes de ces parasites sont l'homme et les PNH (*O. bifurcum, O. stephanostomum et O. aculeatum*), les porcs (*O. dentatum et O. quadrispinulatum*), les moutons et les chèvres (*O. columbianum et O. venulosum*) et les bovins (*O. radiatum*) [119]. La contamination se fait principalement par ingestion ou pénétration transcutanée de L3 infectieuses présentes dans l'environnement (sol, eau, aliments, poussière, etc.). Les L3, encore engaînées par la cuticule de la L2 quand elles sont ingérées, se débarrassent de cette dernière dans l'intestin grêle. Une fois parvenues au niveau de l'iléon, et surtout du cæcum et du colon, elles pénètrent dans la muqueuse jusqu'au chorion sous-épithélial (lamina propria) où elles subissent une mue pour donner des larves L4 qui vont rester sur place pendant deux semaines. Ce processus (migration et mue) entraîne la formation de nodules composés de neutrophiles et d'éosinophiles, généralement de petite taille (2 mm de diamètre) mais parfois beaucoup plus gros (jusqu'à 10 cm chez des patients au Ghana). Les *Oesophagostomum* sont ainsi parfois appelés « vers nodulaires » [120, 121]. Les L4 réémergent ensuite dans la lumière intestinale où, après une dernière mue, elles se transforment en stades adultes. Ceux-ci mesurent de 1 à 2 cm de long avec les extrémités antérieures courbées en spirale. Après accouplement, les femelles commencent à pondre des œufs qui sont éliminés dans le milieu extérieur avec les selles. Dans l'environnement, les œufs se transforment en larves L1, L2 puis L3. L'ensemble du cycle dure environ 6 à 7 semaines [122, 123].

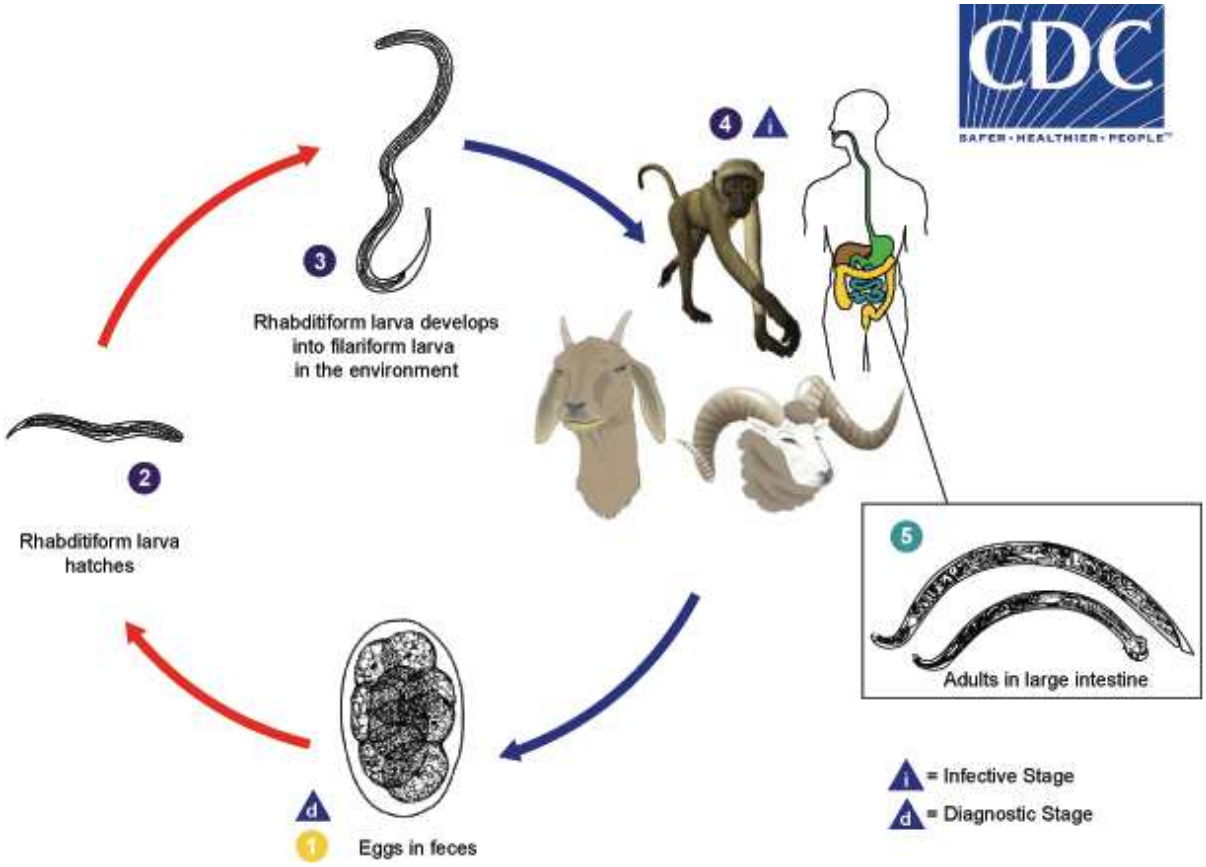


Figure 4 : Cycle évolutif *d'Oesophagostomum* sp.

Source : https://www.cdc.gov/dpdx/oesophagostomiasis/index.html

2.3 Filaire : *Mansonella* sp.

Morphologie et cycle évolutif de *Mansonella* sp.

Classification :

Règne	Animalia
Phylum	Nematoda
Classe	Secernentea
Ordre	Spirurida
Super-famille	Filarioidea
Famille	Onchocercidae
Sous-famille	Onchocercinae
Genre	*Mansonella*
Espèces principales	*M. perstans, M. streptocerca, M. ozzardi*

Les *Mansonella* sp. sont des parasites hétéroxènes dont le cycle se déroule chez un hôte intermédiaire (un moucheron vecteur hématophage du genre *Culicoides*, qui appartient à la famille des Ceratopogonidae) et un hôte définitif (HD) qui peut être soit l'homme soit des animaux (notamment des PNH et des rongeurs). Lors du repas sanguin, la femelle culicoïde infectée injecte dans l'organisme de l'HD des larves infectantes (L3) qui, après deux mues, se développent en adultes mâles et femelles. Les adultes de *M. perstans*, principale espèce de *Mansonella*, vivent dans la cavité péritonéale ou la cavité pleurale. Ils sont filiformes et de couleur blanc-crémeux. La femelle mesure 5 à 8 cm de long. Le vers mâle, plus petit, est long de 3,5 à 4,5 cm [124]. Les femelles émettent des larves, appelées microfilaires, qui ne possèdent pas de gaine (contrairement à celles d'autres filaires, comme *Loa loa*). Les microfilaires, qui mesurent 200 µm sur 4,5 µm, rejoignent la circulation sanguine. Elles sont prélevées par les vecteurs lors d'un repas sanguin et se développent, après deux mues (L1-L2 et L2-L3) en larves infectantes. Une fois parvenues dans la tête du vecteur, celles-ci peuvent infecter un nouvel HD lors d'un second repas sanguin, assurant ainsi la transmission [18]. Les filarioses à *Mansonella* sp. sont considérées comme « mineures » car peu pathogènes mais leur prévalence est parfois très importante, dépassant celles des filarioses « majeures » (onchocercose et filariose lymphatique). En Afrique, trois espèces de *Mansonella* infectent l'homme : *M. perstans*, dont les microfilaires sanguicoles sont à différencier de celles de la *Loa loa*, *M. streptocerca* dont les adultes vivent dans la peau et dont les microfilaires dermiques doivent être distinguées de

celles d'*O. volvulus* (leurs tailles respectives sont de 180-240 x 3-5 µm et 250-330 x 5-8 µm), et *M. rodhaini*. En Amérique du sud, outre *M. perstans*, on peut rencontrer *M. ozzardi* dont les microfilaires sont sanguicoles et dermiques. *M. ozzardi* est aussi présente dans les Caraïbes, notamment en Haïti.

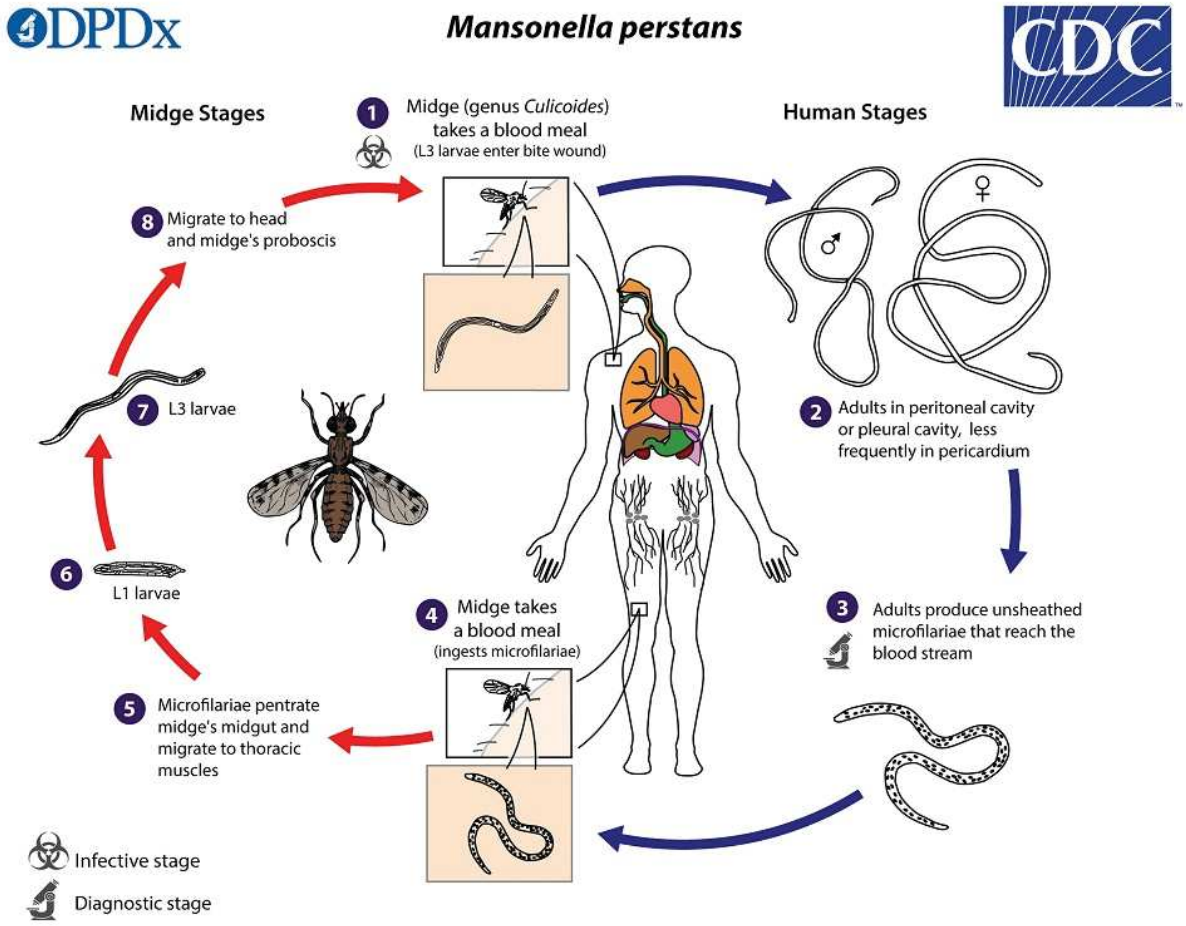


Figure 5 : Cycle évolutif de *M. perstans*

Source : https://www.cdc.gov/dpdx/mansonellosis/index.html

2.4 Manifestations cliniques des géohelminthiases chez les PNH

Chez les PNH, certains de ces nématodes ont un impact clinique peu clair, mais d'autres peuvent avoir un fort potentiel pathogène à des intensités élevées. Par exemple, de fortes infections par *Oesophagostomum* sp. peuvent provoquer une morbidité significative et même une surmortalité dans certaines populations de chimpanzés (par exemple à Mahale [97] et à Gombe [125] en Tanzanie).

En milieu captif, les PNH sont aussi hôtes de différentes espèces de parasites gastro-intestinaux qui affectent leur survie et leur activité de reproduction. Les principales manifestations cliniques rapportées sont des gastro-entérites, des hémorragies, des infections extra-intestinales, des avortements spontanés et la mort [126].

Avec les exceptions mentionnées ci-dessus, la rareté des signes cliniques manifestes de maladie liés à des parasites intestinaux spécifiques chez les grands singes sauvages suggère que les infections sont généralement bien tolérées et/ou contrôlées par des comportements d'automédication comme l'ingestion de feuilles de certaines plantes [102, 127, 128]. Néanmoins, ces parasites pourraient causer des infections chroniques de faible intensité ayant un effet à bas bruit sur la condition physique (« fitness ») de l'hôte, en l'absence de symptômes cliniques manifestes [129]. Une surveillance plus étroite et un diagnostic plus facile chez les PNH vivant dans des sanctuaires pourraient expliquer pourquoi la morbidité est plus souvent signalée dans ces derniers que dans un milieu sauvage. Mais, d'un autre côté, le niveau de stress, l'espace limité, la promiscuité des individus, les procédures de vermifugation altérant la composition de la flore intestinale, ou encore l'infection par des souches humaines, pourraient favoriser l'infection parasitaire dans ces populations (semi-) captives.

2.4.1 Ascaridiase chez les PNH

Comme chez les humains, la période pré-patente est d'environ 9 semaines. L'ascaridiase est généralement une infection relativement bénigne chez les singes [130]. Des cas d'infection massive avec migration des vers dans les organes vitaux conduisant à des décès ont été signalés chez les chimpanzés [129].

2.4.2 Ankylostomose chez les PNH

Les infections par *Necator* sp., comme pour tous les Ancylostomatidae, provoquent une forte anémie, particulièrement marquée au cours de la phase prépatente de la maladie [93]. En effet lors d'études expérimentales, Orihel *et al*. (1971) ont réussi à transmettre de façon expérimentale *N. americanus* de l'homme au chimpanzé et par la suite de chimpanzé à

chimpanzé. Il a été observé au cours de cette étude qu'une infection avec présence de nombreux vers adultes peut produire une anémie sévère au cours des premiers stades de l'infection [131].

2.4.3 Oesophagostomose chez les PNH

Comme indiqué plus haut, les œsophagostomes sont couramment retrouvés chez les PNH [106, 108]. L'infection présente une phase aigüe marquée par des douleurs abdominales, des vomissements et une anorexie, comme cela a été observé chez des gorilles âgés de deux ans au Gabon [129]. Elle peut se manifester par des périodes de faiblesse, de diarrhée et de perte de poids. Ces symptômes sont similaires à ceux observés dans plus de 60% des cas humains d'oesophagostomose chez des patients gravement malades. Les signes cliniques peuvent être sévères avec l'apparition d'une occlusion intestinale, la rupture de nodules entraînant une péritonite, une hernie inguinale incarcérée, un volvulus de l'intestin ou des complications hépatiques conduisant à la mort du PNH, comme cela a été rapporté chez l'homme [132].

2.4.4 Trichurose chez les PNH

Les manifestations cliniques de la trichurose chez les chimpanzés peuvent être sévères. Elles se caractérisent par une anorexie, une perte d'appétit et une diarrhée sévère avec abondance de mucus [133].

2.5. Diagnostic biologique

2.5.1 Diagnostic biologique des GH

2.5.1.1 Examen macroscopique

C'est l'observation à l'œil nu ou l'aide d'une loupe des prélèvements de selle à la recherche de parasites ou de parties de parasites adulte. L'identification est alors basée sur les caractères morphologiques des parasites. Cette méthode ne permet pas l'identification précise des espèces de GH morphologiquement proches.

2.5.1.2 Examen microscopique

- **Examen microscopique direct à l'état frais :**

Il s'agit de l'observation au microscope optique d'une préparation de selle montée entre lame et lamelle avec une goutte d'eau physiologique. L'identification des œufs se fait sur la base de leur forme, de leur taille et de leur coloration. C'est une technique facile à mettre en œuvre, qui ne nécessite pas d'équipement sophistiqué et qui est donc peu coûteuse. La limite de l'examen à l'état frais se trouve dans son manque de spécificité (identification non précise des espèces de

parasites morphologiquement identiques exemple : les œufs des ankylostomes, les kystes d'amibes).

- **Méthodes de concentration fécale**.

En cas de faible infestation, on a recours à des techniques permettant la concentration des éléments parasitaires trop rares pour être décelés à l'examen direct. Ces méthodes ont des indications différentes et il n'existe pas de technique idéale qui concentrerait tous les parasites. Il convient donc d'utiliser au moins deux types de techniques de concentration laissées au choix du biologiste [134].

- ✓ **Méthodes physiques**

Leur principe est basé sur la différence de densité entre les éléments parasitaires et les débris alimentaires. On distingue deux principes :

Concentration par sédimentation :

Elle utilise un liquide dont la densité est inférieure à celle des éléments parasitaires, elles sont actuellement abandonnées en raison de leur manque de fiabilité.

Sédimentation simple : Méthode de Faust et Ingalls.

Sédimentation-centrifugation : l'enrichissement se fait par sédimentation accélérée par centrifugation. Ex. Méthode de Baroody et Most.

Concentration par flottation :

Le principe est basé sur l'emploi d'un liquide très dense qui provoque la flottation des éléments parasitaires à la surface. C'est une technique simple, utilisant un matériel rudimentaire avec la possibilité d'examens en série. Les techniques de flottation (flottation au sulfate de zinc, flottation au chlorure de sodium saturé) ne sont pas largement utilisées car les œufs d'Ascaris et les larves de Strongyloides ne flottent pas et ne peuvent donc pas être facilement diagnostiqués par cette méthode. La technique de Willis (Willis 1921) est une méthode de flottation basée sur la capacité des œufs d'helminthes à flotter à la surface d'une solution saturée de chlorure de sodium d'une densité de 1,20 g / mL et à adhérer au verre [135].

- ✓ **Méthodes physico-chimiques**

Elles consistent à mettre les selles en présence de deux phases non miscibles, une aqueuse et l'autre organique. En plus de son action dissolvante, la mise en jeu de deux phases non

miscibles, l'une hydrophile et l'autre lipophile réalise pour chaque élément fécal (parasite ou non) un coefficient de partage dont la valeur dépend de sa balance hydrophile-lipophile et conditionne sa position dans les phases obtenues après émulsion. Ce sont des techniques simples et rapides. La méthode la plus recommandée est la méthode de concentration de Ritchie simplifiée [134, 136, 137].

- **Les méthodes de quantification**

✓ **Méthode de Kato-Katz (KK)**

C'est la méthode recommandée par l'OMS pour la quantification des œufs d'helminthes avec confection de deux lames par échantillon de selle [117]. La lecture des lames doit se faire rapidement (40 à 60 mn) afin d'éviter l'éclosion des œufs d'ankylostomes. Le résultat est exprimé en nombre d'œufs par gramme de selles (EPG), qui traduit l'intensité de l'infection [138]. La méthode de KK est une bonne technique pour le diagnostic quantitatif des infections à *A. lumbricoides* et *T. trichiura*. Mais le manque de sensibilité, en particulier dans les infections de faible intensité, constitue une de ses limites [139, 140]. De plus, la technique n'est pas adaptée pour la recherche des œufs d'ankylostomes qui éclosent rapidement après l'émission de selles. Il faut donc une rapidité d'exécution de la technique KK avant la lyse des œufs [141] Actuellement, c'est la technique utilisée lors des enquêtes épidémiologiques sur le terrain en raison de son faible coût de réalisation [142].

✓ **Méthode de McMaster**

Cette deuxième technique de quantification des œufs est plus facile à mettre en œuvre que le KK et a des performances diagnostiques comparables [142]. Elle consiste à remplir une cellule de comptage avec un volume connu de suspension fécale. Avec le McMaster, les œufs flottent sans débris, ce qui facilite leur comptage. La technique nécessite une cellule de comptage spéciale ce qui peut constituer un inconvénient dans les conditions de ressources limitées.

✓ **Techniques FLOTAC et mini-FLOTAC**

Ce sont de techniques quantitatives mises au point récemment. Il s'agit de la dilution de 1 g de selle dans une solution de conservation, suivie de la filtration et de l'ajout d'une solution pour la flottation dans une centrifugeuse. Le FLOTAC présente l'avantage de détecter simultanément différentes espèces d'helminthes ainsi que de protozoaires intestinaux [143]. Son coût élevé constitue un obstacle à son utilisation. Le principal facteur limitant de la technique du FLOTAC est qu'elle nécessite la centrifugation de l'échantillon avec un dispositif spécifique ; souvent, cet

équipement n'est pas disponible dans les pays en développement La réalisation des examens demande un temps assez long, ce qui empêche son utilisation comme méthode de diagnostic en routine [143]. La méthode Mini-FLOTAC, une forme simplifiée de FLOTAC, ne nécessite pas l'utilisation d'une centrifugeuse, elle est donc pratique pour les zones à ressources limitées. Les performances diagnostiques du mini-FLOTAC sont comparables à celle du KK mais inférieures à celles du FLOTAC [142].

2.5.2 Diagnostic biologique de *M. perstans*

2.5.2.1 Recherche microscopique de *Mansonella* sp.

Le diagnostic d'infection par *Mansonella* sp. est fait par la découverte de microfilaires dans une préparation de sang examinée à l'état frais entre lame et lamelle ou après coloration (frottis sanguin ou goutte épaisse) ou dans un prélèvement cutané (biopsie cutanée exsangue). En raison des faibles parasitémies, des méthodes de concentration reposant sur une leucoconcentration (lyse des hématies avec de la saponine) et une centrifugation de prélèvement sanguin sont parfois utilisées. Le diagnostic d'espèce des microfilaires sanguicoles (*Wuchereria bancrofti Loa loa*, *M. perstans* ou *M. ozzardi*) se fait sur des critères morphologiques. A cet égard, des techniques de coloration permettant de mettre en évidence les gaines et les structures internes des microfilaires sont associées aux méthodes diagnostiques.

2.5.2.2 Techniques immunologiques

Des tests sérologiques de détection d'anticorps et des tests copro-antigéniques ont été développés pour certains GH, mais leurs performances sont variables [144]. Ces tests ne sont disponibles que pour un nombre limité de parasites et leur coût empêche leur mise en œuvre dans des contextes à ressources limitées. La faible spécificité des tests immunologiques (existence de réactions croisées) et l'impossibilité de faire la distinction entre les infections passées et actuelles constituent des limites de nombreux tests d'immuno-diagnostic. Les méthodes d'immuno-diagnostic les plus couramment utilisées pour la détection des GH sont les tests immuno-enzymatiques (enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)) et les western blots. Ces techniques sont principalement utilisées pour la détection de *Strongyloides stercoralis*, pour lequel des kits ELISA sont commercialisés [145, 146]. Les techniques ELISA utilisées pour la détection de *S. stercoralis* ont démontré une sensibilité élevée et une spécificité acceptable par rapport à l'examen coprologique [147].

À l'heure actuelle, il n'existe pas de test ELISA utilisé en routine pour la détection des *Mansonella*. Le kit commercial ELISA (Bordier Affinity Products, Crissier, Suisse) n'est pas spécifique d'une seule espèce de filaires, et détecte les immunoglobulines dirigées contre plusieurs filaires affectant l'homme, dont les *Mansonella* [148].

2.5.3 Diagnostic moléculaire

Plusieurs techniques de biologie moléculaire basées sur la PCR conventionnelle ont été développées, à savoir : la PCR quantitative (qPCR), la PCR multiplex, la technique Loop-Mediated isothermal Amplification **(**LAMP) [149, 150]. Ces techniques ne sont pas disponibles pour un diagnostic de routine.

2.5.3.1 PCR conventionnelle

Le développement de la technique PCR (Polymerase Chain Reaction ou réaction de polymérase en chaine) a amélioré le diagnostic dans les laboratoires. Elle permet la détection des agents pathogènes par l'amplification spécifique d'un ou plusieurs marqueurs moléculaires (ADN/ ARN). La PCR repose sur l'amplification spécifique d'une séquence d'ADN *in vitro.* Divers marqueurs ont été utilisés pour l'identification des parasites à savoir : l'ADN ribosomique nucléaire (ADNr), l'ADN mitochondrial (ADNmt) et les microsatellites, [151–153]. Les marqueurs *Internal Transcribed Spacer* I et II (*ITS*-1 et *ITS*-2) de l'ADN ribosomique nucléaire se sont révélés être des marqueurs génétiques fiables pour l'identification des nématodes de l'ordre des Strongylida [151, 153]. Cependant, la principale limite de la PCR conventionnelle est qu'elle n'est pas quantitative. Elle nécessite une bonne qualité des échantillons (pureté, quantité et intégrité de l'ADN) [154]. Malgré ses limites, cette méthode s'est montrée plus sensible que les méthodes basées sur la microscopie, surtout quand l'échantillon est faiblement parasité [154].

2.5.3.2 La PCR quantitative ou qPCR ou PCR en temps réel

C'est une méthode particulière de PCR permettant de mesurer la quantité initiale d'ADN. La PCR quantitative mesure le nombre d'amplicons. Elle permet de suivre en continu (« en temps réel ») le processus d'amplification en détectant la fluorescence émise par les produits de PCR néoformés. Cette technique trouve tout son intérêt dans le diagnostic des infections, ou dans les études d'évaluation de l'impact des campagnes de distribution de masse de médicaments [155]. La technique a déjà été développée pour plusieurs parasites gastro-intestinaux, y compris les GH (*N. americanus*, *A. duodenale*, *A. lumbricoides*, *T. trichiura*, *S. stercoralis*) [156]. La qPCR permet la quantification de la matrice et élimine le besoin de visualiser les amplicons par électrophorèse sur gel, réduisant ainsi le risque de contamination.

2.5.3.3 La PCR multiplex

La RT-PCR multiplex permet la détection simultanée de plusieurs ADN dans la même réaction [157], réduisant le coût par test et permettant une détection rapide. Le développement d'une qPCR multiplex augmente le taux de détection et augmente considérablement la spécificité pour *A. lumbricoides*, *T. trichiura*, *N. americanus* et *S. stercoralis* [156]. Une technique de PCR multiplex pour la recherche de l'ADN d'œsophagostomes (*O. bifurcum*) et d'ankylostomes (*A. duodenale* et *N. americanus*) directement à partir d'échantillons de selles a été mise au point en 2007 [155]. La qPCR multiplex peut être appliquée dans des contextes à ressources limitées pour la détection de GH car un équipement plus standard peut être utilisé [156].

2.5.3.4 La technique LAMP

La technique LAMP est une méthode d'amplification de l'ADN et les résultats obtenus en l'utilisant ont une sensibilité et une spécificité élevées [158]. La réaction d'amplification isothermique est faite sur un bloc chauffant ou dans un bain-marie, donc sans que l'on ait besoin d'un thermocycleur. Le succès de l'amplification de l'ADN par le LAMP se traduit par une turbidité du milieu réactionnel qui est proportionnelle à la quantité d'ADN synthétisée. Les résultats de la réaction peuvent être obtenus en temps réel en mesurant la turbidité ou, par l'observation à l'œil nu. LAMP est une méthode simple qui ne nécessite pas d'équipements sophistiqués. Elle est donc une alternative moins chère aux autres techniques PCR. C'est une technique idéale pour les régions en développement où les ressources sont rares. Cette méthode LAMP a été utilisée dans la détection des ADN de GH : elle a été appliquée pour le diagnostic d'infections par *N. americanus* dans des échantillons fécaux [159].

2.5.3.5 Séquençage de nouvelle génération

Le séquençage de nouvelle génération (NGS : *Next Generation Sequencing*), également connu sous le nom de séquençage à haut débit, est la révolution biotechnologique de ces dernières années, en permettant de séquencer de grandes quantités d'ADN en des temps records. C'est un terme commun utilisé pour décrire différentes technologies de séquençage moderne comme : Illumina® (Solexa), Roche 454, Ion torrent: Proton / PGM, SOLiD. Ces technologies récentes permettent de séquencer l'ADN et l'ARN beaucoup plus rapidement que les méthodes précédentes comme le séquençage de Sanger, et comme telles elles ont révolutionné l'étude de la génomique et de la biologie moléculaire. La technologie NGS peut être utilisée pour séquencer l'ADN de n'importe quel organisme, fournissant des informations précieuses en réponse à presque n'importe quelle question biologique. Elle est aujourd'hui utilisée pour les études sur la diversité génétique des GH et des protozoaires infectant les PNH [109, 114, 160].

2.6 Lutte contre les zoonoses

2.6.1 Programmes de contrôle des GH

On estime que 1,45 milliard d'individus sont infectés par des GH dans le monde [117]. En 2014, on considérait que le fardeau global des GH (ankylostomes, *A. lumbricoides* et *T. trichiura* considérés ensemble) correspondait à plus de 3,3 millions d'années de vie corrigées de l'incapacité perdues par an [42]. Les GH sont responsable d'anémie [42], de malnutrition [161] et de retard psychomoteur des enfants [162]. Pour contrôler la morbidité causée par les GH, l'OMS recommande de traiter de façon répétée et sans diagnostic préalable (traitement de masse), avec un anthelminthique sûr et à large spectre (albendazole, ABZ ou mébendazole, MBZ), tous les groupes à risque vivant dans des zones d'endémie [163]. Au cours de la décennie 2001-2010, cette chimiothérapie préventive (CP) ciblait les enfants d'âge scolaire (6-15 ans), l'objectif étant d'atteindre en 2010 une couverture médicamenteuse d'au moins 75% dans cette catégorie de population. Bien que cet objectif 2001-2010 n'ait pas été atteint [164], la communauté internationale a adopté en 2011 de nouvelles résolutions pour lutter contre 10 maladies tropicales négligées (MTN) d'ici 2020. Le nouvel objectif est de réduire la morbidité due aux GH chez les enfants d'âge préscolaire (1-5 ans) et les enfants d'âge scolaire à un niveau tel qu'elle ne constituerait plus un problème de santé publique. Selon ces résolutions, 75 à 100% des enfants (d'âge préscolaire et scolaire) nécessitant une CP dans le monde devaient être traités avant 2020, et tous les pays (100%) appliquant la CP contre les GH devaient atteindre une couverture nationale de 75% des enfants d'âge préscolaire et scolaire d'ici 2020 [165]. Mais en 2015, l'OMS a estimé à 369 millions le nombre d'enfants ayant reçu des anthelminthiques. Dans les pays endémiques, la couverture médicamenteuse était de 44,7% pour les enfants d'âge scolaire et de 51,4% pour les enfants d'âge préscolaire [166].

Pour l'horizon 2030, six objectifs mondiaux ont été fixés en ce qui concerne les géohelminthiases : (1) atteindre et maintenir l'élimination de la morbidité due aux GH chez les enfants d'âge préscolaire et scolaire ; (2) réduire le nombre de doses nécessaires à la chimiothérapie préventive contre les GH ; (3) augmenter le soutien financier national à la chimiothérapie préventive contre les GH ; (4) mettre en place un programme efficace de contrôle des GH chez les adolescents, les femmes enceintes et allaitantes ; (5) mettre en place un programme efficace de contrôle de la strongyloïdose chez les enfants d'âge scolaire et (6) garantir l'accès universel à l'assainissement et à l'hygiène de base d'ici 2030 dans les zones d'endémie de GH.

Au Cameroun, le programme national de lutte contre la schistosomiase et les géohelminthiases a été officiellement lancé le 25 mars 2004. Avant cette date, les programmes de lutte étaient pilotés par des organisations non-gouvernementales (ONG) ou des organismes de développement tels que l'USAID (1985-1987) [167]. La comparaison de la prévalence des GH de 1985–1987 à la prévalence en 2011 montre qu'il y a eu une réduction notable dans quatre régions du pays. En effet, dans les régions du Littoral, du Nord-Ouest, du Sud et du Sud-Ouest, la prévalence globale des GH est passée de 92,7%, 72,3%, 97,9% et 91,1%, respectivement, en 1985-1987, à 13%, 35,9%, 52,8% et 46,2% en 2011 [168]. Ce programme de lutte a donc réussi à réduire la prévalence globale au moins dans certaines régions, bien que la couverture thérapeutique puisse varier. Ainsi entre 2015 et 2016 le taux de couverture a baissé dans le pays, passant de 67% en 2015 à 61% en 2016 [169]. Au Gabon, le taux de couverture a augmenté, passant de 0 % en 2015 à 14% en 2016 [170].

Cette variation du taux de couverture peut s'expliquer par la faible participation des populations, mais aussi par la crainte des effets secondaires dus aux médicaments. Par ailleurs, pendant les vacances scolaires, le taux de couverture de la population-cible des programmes de lutte baisse significativement. Un facteur expliquant la baisse progressive des prévalences est la grande résistance des œufs/larves de GH qui peuvent rester viables dans l'environnement pendant plusieurs semaines à plusieurs mois, ce qui favorise les réinfections même après une bonne campagne de distribution de médicaments. Un autre problème est l'efficacité des médicaments qui nécessite d'être évaluée continuellement.

2.6.2 Médicaments anthelminthiques

La chimio-prévention collective constitue un pilier de la lutte contre les infections par les GH mais elle doit être associée à l'amélioration des conditions d'hygiène, à l'assainissement du milieu et à l'éducation sanitaire [117]. Pour la prise en charge des cas de géohelminthiase, quatre médicaments sont couramment utilisés (Tableau V) [171]

Pour le traitement de la mansonellose à *M. perstans*, la diéthylcarbamazine, le melbendazole et l'ivermectine n'ont pas montré d'efficacité suffisante. En Afrique de l'Ouest, *M. perstans* héberge une bactérie symbiotique intracellulaire appartenant au genre *Wolbachia*. Dans cette région du continent, la doxycycline est le médicament de choix pour le traitement des cas de mansonellose [172, 173]. Le fait que des *Wolbachia* n'aient pas été trouvées dans des *M. perstans* d'autres régions africaines est peut-être dû à un manque de sensibilité des tests PCR utilisés [124].

Tableau V: Protocoles de traitement des helminthiases

Helminthes	Médicaments	Posologie	
		Adultes	Enfants
Ascaris sp.	Albendazole	400 mg prise unique	400 mg prise unique
	Mebendazole	100 mg 2 fois/jour pendant 3 jours 500mg prise unique	100 mg 2 fois/jour pendant 3 jours 500mg prise unique
	Pyrantel pamoate	11 mg/kg (maximum 1 g) une fois/jour pendant 3 jours	11 mg/kg (maximum 1g) une fois/jour pendant 3 jours
	Levamisole	2,5 mg/kg prise unique	2,5 mg/kg prise unique
	Ivermectine	150-200 µg/kg prise unique	150-200 µg/kg prise unique
Ankylostomes	Albendazole	400 mg prise unique	400 mg prise unique
	Mebendazole	100 mg 2 fois/jour pendant 3 jours ou 500mg en prise unique	100 mg 2 fois/jour pendant 3 jours ou 500mg en prise unique
	Pyrantel pamoate	11 mg/kg (maximum 1 g) pendant 3 jours	11 mg/kg (maximum 1g) pendant 3 jours
	Levamisole	2,5 mg/kg prise unique ; répéter 7 jours après en cas d'infestation massive	2,5 mg/kg prise unique ; répéter 7 jours après en cas d'infestation massive
Trichuris sp.	Albendazole	400 mg pendant 3 jours	400 mg pendant 3 jours
	Mebendazole	100 mg 2 fois/jour pendant 3 jours 500mg prise unique	100 mg 2 fois/jour pendant 3 jours 500mg prise unique
Oesophagostomun bifurcum	Albendazole	400 mg prise unique	15 mg/kg prise unique (max 400 mg)
	Pyrantel pamoate	11 mg/kg (max 1 g) une fois/jour pendant 3 jours	11 mg/kg (max 1 g) une fois/jour pendant 3 jours
M. perstans	Doxycycline	200 mg par jour pendant six semaines	200 mg par jour pendant six semaines

CHAPITRE III : Matériel et Méthodes

CHAPITRE III : Matériel et Méthodes

3.1 Sites et populations d'étude

3.1.1 Somalomo

Somalomo (3° 23′ 00″ nord, 12° 44′ 00″ est) est un village du département du Haut-Nyong, situé dans la région de l'Est du Cameroun. Il se trouve à la lisière nord de la Réserve de Faune du Dja, créée en 1950 et dont la superficie est de 526.004 hectares (ha). Cette réserve de faune constitue le cœur de la réserve de biosphère, créée en 1981, qui s'étend sur 1.500.000 ha. La réserve était peuplée par 4000 habitants en 2015, tandis que 40.000 personnes habitaient sa périphérie. Différentes communautés ethniques constituent cette population : les Badjoué, les Boulou, les Fang et les Nzimé. A ceux-là s'ajoutent deux groupes ethniques semi-nomades : les Kaka et les Pygmées Baka. La densité de gorilles de plaine dans la Réserve de Faune du Dja est de 1,257 individus par kilomètre carré (km^2) soit un effectif total de 6613 individus. La densité de chimpanzés est de 0,690 individus par km^2 soit 3630 individus pour toute la zone. Le climat de la réserve est de type équatorial, avec quatre saisons peu marquées. La grande saison sèche va de novembre à mars tandis que la petite saison sèche va de juin à juillet. La grande saison des pluies va d'août à novembre alors que la petite saison des pluies s'étend de mars à mai. La moyenne des températures est comprise entre 23,5°C et 24,5°C avec un maximum en février et un minimum au mois de juillet. La pluviométrie moyenne annuelle est toujours au-delà de 1500 millimètres (mm) [174, 175].

3.1.2 Lobéké/Mambélé

Le Parc National de Lobéké (PNL) est situé entre les latitudes Nord de 2°05' à 2°30' et les longitudes Est de 15°33' à 16°11'. Sa superficie est d'environ 217.854 ha. Les grands mammifères tels que les éléphants, les buffles, les bongos, les gorilles, les chimpanzés, les panthères, etc. sont assez bien représentés. En 2010, les densités des éléphants et des gorilles, respectivement de 0,96 [0,81-1,14] individus au km^2, et de 1,59 [1,13-2,24] individus au km^2 seraient parmi les plus élevées d'Afrique centrale. La densité des chimpanzés est également importante (0,51 [0,34-0,76] individus au km^2) [176].

Avec une population d'environ 12.000 habitants, les villages "rattachés" au PNL, présentent une configuration ethnique composée de 50 % de Baka et de 50 % de "Bantou". Dans les trois sites industriels de transformation du bois (Kika, Libongo, Lokomo) il y a environ 14.000 habitants. La ville de Mouloundou à elle seule compte environ 6000 habitants. Soit, au total 32.000 personnes dans les environs (la zone périphérique) du PNL. Les populations riveraines

du site de Lobéké utilisent de longue date la diversité des ressources naturelles à des fins de subsistance et de plus en plus de commerce. L'agriculture, la chasse, la pêche et la cueillette occupent la quasi-totalité de la population active. On peut distinguer globalement deux modes de chasse par les populations riveraines de Lobéké : la chasse de subsistance et la chasse commerciale. La chasse de subsistance peut être définie comme celle dont le produit est essentiellement destiné à l'autoconsommation bien qu'un faible surplus soit régulièrement dégagé et vendu dans les villages. Quant à la chasse commerciale, elle peut être considérée comme celle qui est pratiquée essentiellement dans un but de commercialisation du gibier et des trophées ; elle s'apparente au braconnage, car s'effectuant dans la plupart des cas dans les zones protégées [176].

3.1.3 Djoum

Située dans la Région du Sud, le Département du Dja et Lobo, l'Arrondissement de Djoum et à 2°39'50'' de latitude Nord et 12°40'02'' de longitude Est, la Commune de Djoum couvre une superficie de 5.423,9 km^2, soit 542.390 ha. La Forêt Communale de Djoum est située à 30 km à vol d'oiseau au sud-ouest de la réserve du Dja et à 15 km au nord-est du Parc National de Kom anciennement connu sous le nom de Sanctuaire à gorille de Mengamé. La superficie de la forêt communale de Djoum est évaluée à 15.270 hectares.

Les grands mammifères ont disparu de cette forêt à cause de l'intensité du braconnage. On note malgré cela, la présence de certains d'entre eux à plus de 60 km des villages : c'est le cas de l'éléphant de forêt (*Loxodonta africana cyclotis*), des gorilles et des chimpanzés. L'arrondissement de Djoum est subdivisé en trois cantons (Zaman, Bulu et Fang) répartis sur 44 villages avec au total 21.769 habitants en 2007. Les populations qui vivent dans les villages riverains de la forêt communale de Djoum étaient estimées à 7133 habitants en 2007 [177].

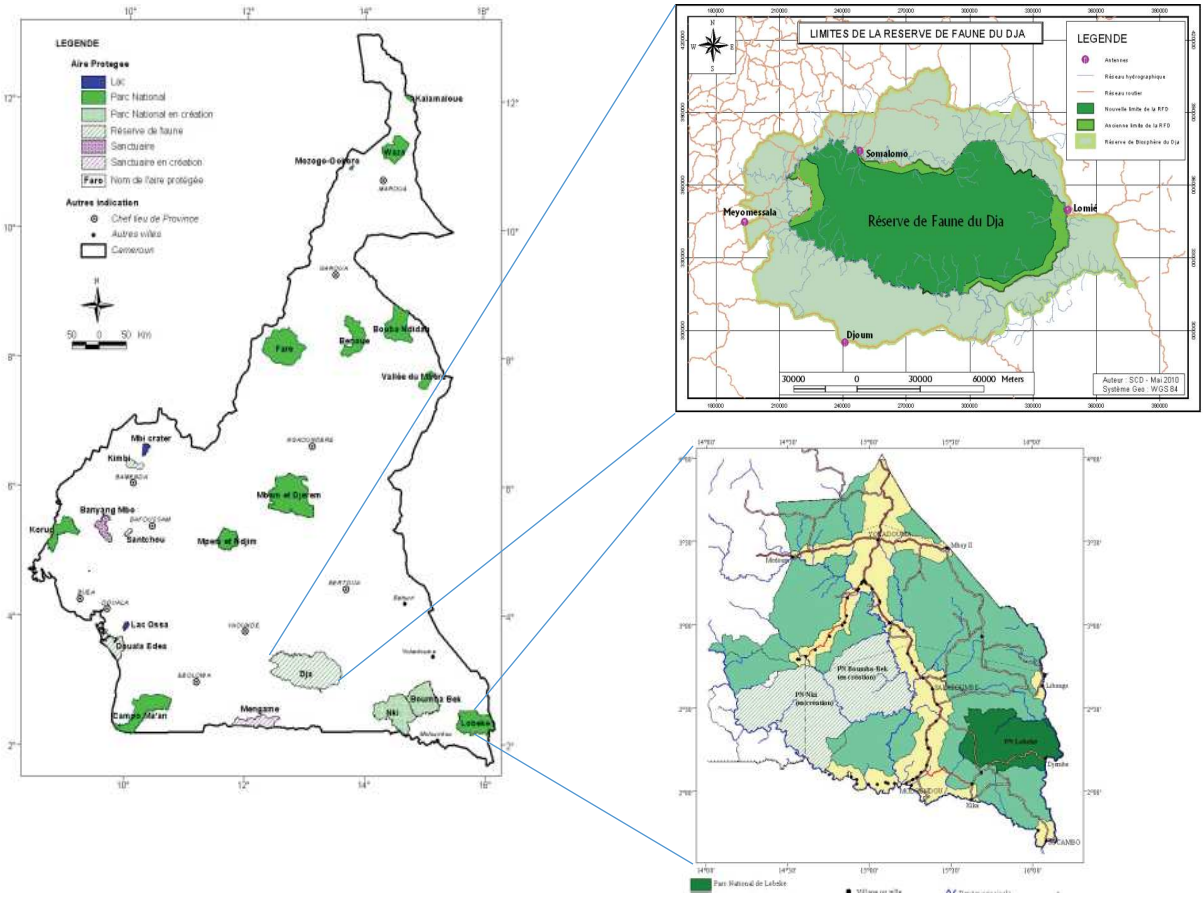


Figure 6 : Carte du Cameroun avec localisation de la Reserve de faunique du Dja (Somalomo, Djoum), et du Parc National de Lobéké.

Adapté des rapports 2010 et 2016 du Ministere des Forets et de la Faune (Cameroun)

3.1.4 Makatamangoye

Makatamangoye I, Matamangoye II sont situés dans la province du Haut Ogooue le Département de Sebe Brikolo, sur l'axe routie Okondja-Makokou.

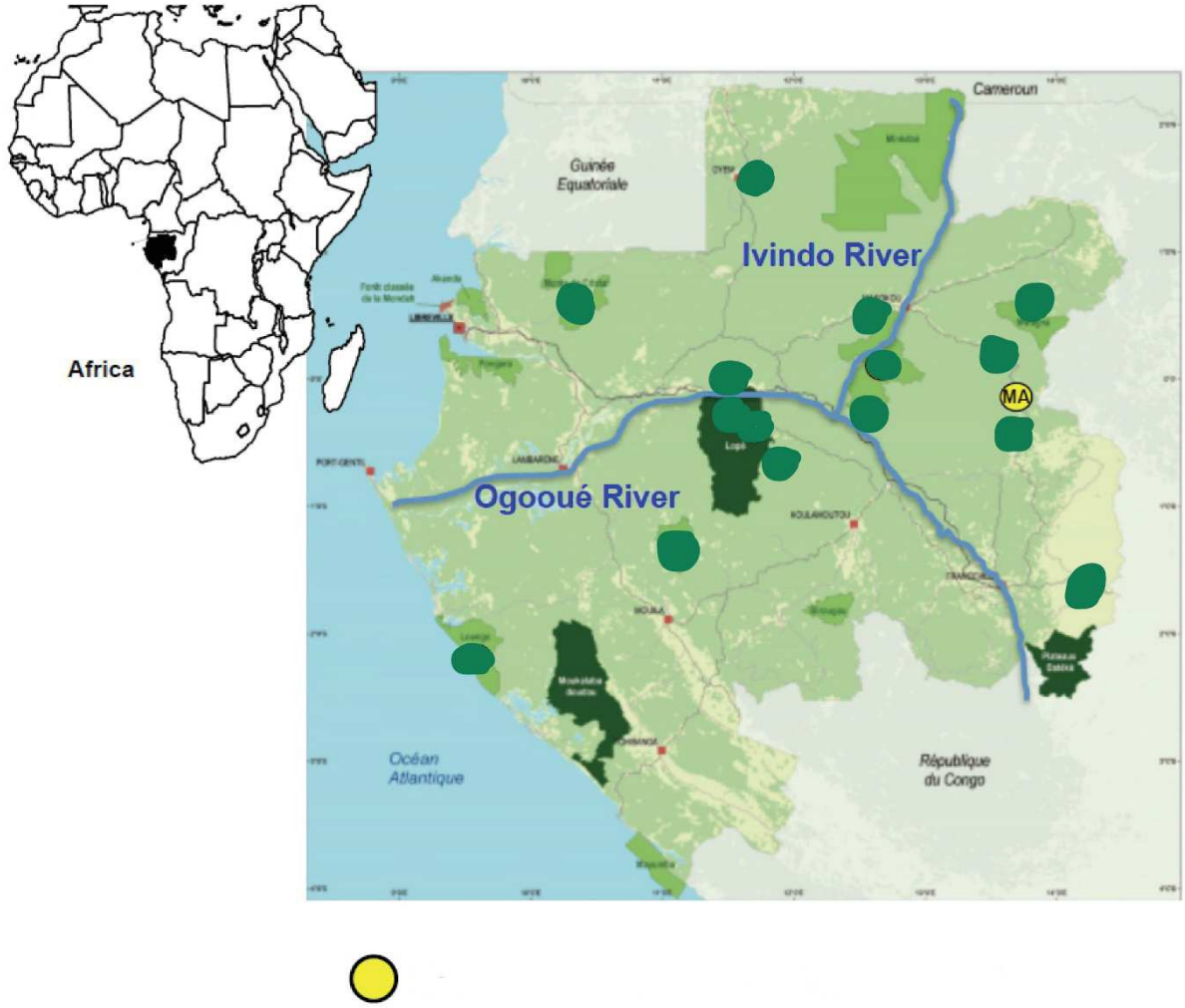


Figure 7: Carte avec localisation du village de Matakamangoye (Gabon)

Source : Boué *et al*., 2015.

3.2 Prélèvements de sang chez l'homme et extraction d'ADN de filaires

Des gouttes de sang ont été collectées sur du papier-filtre chez 20 personnes ayant une infection connue à *M. perstans* et vivant dans le district de santé d'Okola (Cameroun). Les prélèvements ont été expédiés à Montpellier pour obtenir des séquences de filaires infectant l'homme pouvant servir de références pour les analyses phylogénétiques [178]. L'extraction d'ADN à partir de DBS a été réalisée à l'aide du kit NucliSENS® (bioMérieux, Craponne, France) selon les instructions du fabricant. L'ADN a été élué dans 60 µl de tampon. Les réactions PCR sur les

échantillons de sang humain positifs à *M. perstans* mf ont été effectuées une fois que tous les autres échantillons, provenant des PNH, ont été testés.

3.3 Collecte de fèces provenant de PNH

Les échantillons ont été recueillis au Gabon entre septembre 2009 et juin 2013, et au Cameroun entre 2008 et 2010, autour des nids des primates, des sites de nourriture ou autour des traces. Environ 20 g de fèces ont été placés dans un tube de 50 ml contenant 20 ml de RNAlater® (Ambion, Austin, TX) et maintenus à température ambiante au campement, pendant au maximum trois semaines. La date de prélèvement, le lieu de collecte et les coordonnées GPS, la fraîcheur estimée, l'espèce supposée ainsi que des remarques ont été notés pour chaque échantillon. Les échantillons ont ensuite été stockés à -20°C à Yaoundé (échantillons du Cameroun) et à Franceville (échantillons du Gabon) puis expédiés au laboratoire de l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) de Montpellier où ils ont été stockés à -80°C.

Tableau VI: Résumé des caractéristiques des sites d'étude

Pays	Localités	Espèces de PNH	N	Densité de PNH	Statut de protection du site	Modalités des interactions Humain/PNH
Cameroun	Djoum	Mandrill	12	Non disponible	Forêt communale	L'agriculture, la chasse, la pêche et la cueillette
		Mangabey à collier blanc	7	Non disponible		
		Cercopithèque hocheur	1	Non disponible		
	Somalomo	Chimpanzé	23	0,690 individus au km²	Reserve de faune	L'agriculture, la chasse, la pêche et la cueillette.
		Gorille	38	1,257 individus au km²		
		Mangabey à collier blanc	2	Non disponible		
		Cercopithèque hocheur	2	Non disponible		
	Mambelé/Lobeke NP	Chimpanzé	59	0,51 individus au km²	Parc National	La chasse de subsistance et la chasse commerciale
		Gorille	27	1,59 individus au km²		
		Mangabey agile	3	Non disponible		
		Cercopithèque hocheur	1	Non disponible		
Gabon	Makatamangoye	Chimpanzé	140	Non disponible	Forêts primaires, et forêts secondaires entourant des villages au Gabon	

3.4 Analyses en laboratoire

3.4.1 Extraction d'ADN et détermination des espèces de PNH

L'ADN fécal a été extrait à l'aide des kits QIAamp Stool DNA Mini (Qiagen, Valencia, CA) en suivant les instructions du fabricant. Environ 1,5 ml de mélange fécal contenu dans le RNAlater® a été remis en suspension dans du tampon de lyse. Après centrifugation, les surnageants ont été traités avec un comprimé d'InhibitEx, soumis à une digestion par protéinase K et passés à travers une colonne de fixation de l'ADN. L'ADN lié a été élué dans 100 µL de tampon d'élution. Pour la recherche de parasites gastro-intestinaux, un protocole d'extraction d'ADN modifié a été adopté. Cette étape consistait en une homogénéisation supplémentaire dans des tubes contenant des billes de silice de taille différente (matrice de lyse E) dans un broyeur FastPrep-24 (MP Biomedical, Eschwege, Allemagne) et une incubation d'une nuit à 56°C pour mieux casser les parois des œufs et exposer l'ADN du parasite. Les espèces hôtes ont été confirmées dans des etudes precedentes (refs) par amplification par PCR et analyse de séquence d'un fragment d'ADN mitochondrial de 460–500 pb couvrant la région *12S* de l'ADNr. Cette région permet de déterminer l'espèce d'animale, ainsi que les sous-espèces de chimpanzés et de gorilles. Pour l'amplification par PCR, les amorces utilisées étaient *12S*-L1091 et *12S*-H1478 (tableau VI). Les réactions PCR ont été effectuées dans un volume total de 50 µl composé de 10 µl d'échantillon d'ADN, 2,5 µM de la paire d'amorces *12S*-L/*12S*-H, 25 mM de dNTP, $MgCl_2$ 1mM et 0,05 U/L de Taq. Les amorces et les programmes de PCR sont présentés dans le tableau VI. Les produits PCR ont été migrés par électrophorèse sur gel d'agarose 1%. Cinq µl de chaque produit de la PCR mélangés à du bleu de méthylène ont été déposés dans les puits du gel d'agarose. L'électrophorèse a été réalisée sous une tension de 90 volts pendant 45 min [179]. L'ADN extrait a aussi été génotypés à sept loci dans deux PCR multiplex (amplifiant D18s536, D4s243, D10s676 et D9s922 ou D2s1326, D2s1333 et D4s1627), et pour la détermination du sexe, une région du gène de l'amélogénine qui contient une délétion sur le chromosome X mais pas sur le chromosome Y a été amplifiée en utilisant un kit de base Taq DNA polymerase (MP Biomedical, Irvine, CA, USA) avec 2 à 10 µl d'ADN fécal [180, 181]. Les mandrills (*Mandrillus sphinx*), les mangabeys à collier blanc (*Cercocebus torquatus*), les mangabeys agiles (*Cercocebus agilis*) et les cercopithèques hocheurs (*Cercopithecus nictitans*) n'ont pas été génotypés mais, pour limiter les chances d'analyser des échantillons provenant d'un même individu, les échantillons ont été sélectionnés en fonction de

critères discriminants, en excluant les sites où les territoires de dispersion des primates se chevauchaient, et en tenant compte des coordonnées GPS des lieux de collecte.

Tableau VII : Amorces et programme d'amplification de la région *12S* de l'ADNr

	Gène	Amorce	Séquences des amorces (5'-3')	Taille du fragment	Dénaturation		Hybridation		Elongation		Nombre de cycle
				Taille (bp)	T (°C)		T (°C)		T (°C)		
PNH	*12S* ADNr	*12S*-L	5'-AAAAAGCTTCAAACTGGGATTAGATACCCCACTAT-3'	460-500	92	20	50	45	72	30	40
		12S-H	5'- TGACTGCAGAGGGTGACGGGCGGTGTGT -3'								

3.4.2 Recherche d'ADN de filaires

La recherche d'ADN de filaire a été faite par l'amplification de l'ADN ribosomique *12S* (l'ADNr *12S*) (environ 450 pb) et des fragments du gène de la sous-unité 1 du cytochrome c oxidase (*cox1*) (environ 600 pb), comme décrit par Casiraghi *et al.* [182]. Les amorces et les programmes de PCR sont présentés dans le tableau VII. Les PCR ont été conduites sur un volume final de 50 µl. L'amplification des fragments cibles a été réalisée par PCR nichée. De l'albumine de sérum bovin (BSA) à 0,2 µg/ml a été ajoutée au premier round, pour améliorer l'amplification. Toutes les réactions de PCR ont été réalisées en utilisant le kit PCR Expand Long Template (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA), selon les instructions du fabricant. Les réactions de PCR ont été réalisées sur le thermocycleur Bio-Rad T100 ™ (Hercules, CA, USA) en présence d'un témoin négatif.

3.4.3 Amplification des fragments *ITS*

Une technique de PCR semi-nichée générale a été appliquée à chacun des quatre genres de nématode (*Ascaris* sp*., Trichuris* sp., *Oesophagostomum* sp. et *Trichostrongylus* sp.). Toutes les réactions ont été effectuées avec un témoin négatif, dans un volume de 50 µl contenant 10 µl d'ADN, 2,5 µl de chaque amorce (10 mM), 1 µl de BSA, 25 µl de Hot Start MasterMix contenant Hot Start Taq DNA Polymerase, dNTPs et $MgCl_2$. Les réactions de 2ème Round ont été réalisées dans un volume total de 50 µl contenant 5 µl d'ADN du 1er Round, 2,5 µl de chaque amorce (10 mM), 25 µl de Hot Start MasterMix. Les réactions d'amplification ont été effectuées sur un thermocycler (BIOMETRA Tadvanced) sous le programme ci-dessous (Tableau VIII).

3.4.4 Détection moléculaire d'*Oesophagostomum* sp. et *Necator* sp.

Nous avons réussi à identifier *Oesophagostomum* sp. par un protocole de PCR semi-nichée ciblant un fragment d'environ 300 pb du gène *ITS2*. La PCR semi-nichée a été réalisée à l'aide

de l'amorce sens du round 1 NC1, et l'amorce sens de round 2 OesoITS2 avec une amorce anti-sens commune NC2. L'amplification a été effectuée selon les conditions du tableau VIII.

3.4.5 Détection moléculaire de *Trichuris* sp.

Trichuris sp. a été identifié suivant un protocole de PCR semi-nichée ciblant un fragment d'environ 700 pb du gène *ITS2*. La PCR semi-nichée *Trichuris* sp. a été réalisée à l'aide de l'amorce sens du round 1 ExtITS2 et l'amorce sens de round 2 IntITS2 avec une amorce anti-sens commune NC2. L'amplification a été effectuée selon les conditions du tableau VIII. Chaque réaction PCR a été effectuée en présence d'un témoin négatif et d'un témoin positif (ADN de *Trichuris* extrait d'échantillons collectés chez un chimpanzé dans le cadre d'une étude de master précédente).

3.4.6 Détection moléculaire d'*Ascaris* sp.

Un protocole de PCR semi-nichée ciblant un fragment d'environ 437 pb du gène *ITS1* de l'ADNr nucléaire a été utilisé pour identifier *Ascaris* sp. La PCR semi-nichée a été réalisée à l'aide d'une amorce sens commune AscaITS1F, une amorce anti-sens de 1er Round DasITSR1, et d'une amorce anti-sens de 2ème Round DasITS1R2. L'amplification a été effectuée selon les conditions du tableau VIII. Les réactions PCR ont été effectuées en présence d'un témoin négatif et un témoin positif (fourni par le Dr. Johnny Vlaminck, Université de Ghent, Belgique).

Tableau VIII : Programmes d'amplification des produits PCR pour la détection des filaires

					Thermal profile*						
Helminthe	**Gène**	**Amorces**	**Séquence (5'-3')**		**Dénaturation**		**Hybridation**		**Élongation**		**Nombre de cycle**
				Taille (bp)	**T (°C)**	**D(s)**	**T (°C)**	**D(s)**	**T (°C)**	**D(s)**	
Filariae	***12S rDNA***	*12SdegF2/*	ATTACYTATTYTTAGTTTA	~600	94	30	45	30	68	45	45**
		*12SnemR2**	CTACCATACTACAACTTACGC								
		12SF/	GTTCCAGAATAATCGGCTA	~450	94	30	54	30	68	30	35
		12SdegR	ATTGACGGATGRTTTGTACC								
	coxI	FCo1extdF1	TATAATTCTGTTYTDACTA	~970	94	30	45	30	68	60	45**
		FCo1extdR1*	ATGAAAATGAGCYACWACATAA								
		COIintF/	TGA TTG GTG GTT TTG GTA A	~650	94	30	54	30	68	45	35
		COIintR	ATA AGT ACG AGT ATC AAT ATC								

Tableau IX : Programmes d'amplification des produits PCR

Helminthe	Gène	Amorce	Séquences (5'-3')	Taille du fragment	Dénaturation		Hybridation		Elongation		Nombre de cycle
				Taille (bp)	T (°C)		T (°C)		T (°C)		
Necator sp./ *Oesophagostomum* sp.	Round1 *ITS2*	NC1	ACGTCTGGTTCAGGGTTGTT	350-400	94	30	50	30	72	45	45
		NC2	TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT								
	Round2 *ITS2*	OesophITS2	TGTRACACTGTTTGTCGAAC	250-300	94	30	55	30	72	30	35
		NC2	TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT								
Ascaris sp.	Round1 *ITS1*	AscaITS1F	CGAGCAGAAAAAAAAAAGTCTCC	437 pb	94	30	54	30	72	30	40
		DasITSR1	GGAATGAACCCGATGGCGCAAT								
	Round2 *ITS1*	AscaITS1F	CGAGCAGAAAAAAAAAAGTCTCC		95	30	56	30	72	45	35
		DasITS1R2	GCTGCGTTCTTCATCGAT								
Trichuris sp.	Round1 *ITS2*	ExtITS2	GGATCACTTGGCTGGTAG	700 pb	94	30	54	30	72	30	40
		NC2	TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT								
	Round2 *ITS2*	IntITS2	CTTGAATACTTTGAACGCACATTG		95	30	56	30	72	45	35
		NC2	TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT								
Trichostrongylus sp.	Round1 *ITS2*	NC2	TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT		94	30	56	45	72	90	40
		NC5	GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATT								
	Round2 *ITS2*	JhTsp	TTATGTGCCACAAATGAAGA	482 bp	94	30	52	30	72	50	35
		NC2	TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT								

3.4.7 Séquençage et analyse de séquences

Les produits PCR ont été purifiés en les faisant migrer premièrement sur du gel d'agarose à 2% mélangés à 7,5 µL de bromure d'éthidium. La deuxième étape de la purification a été faite à partir des gels de purification en utilisant le kit de récupération d'ADN sur gel GeneClean Turbo Kit conformément aux instructions du fabricant. Après la purification (sur gel d'agarose à 2%) avec GeneClean Turbo Kit (Qbiogene, Inc., Carlsbad, CA, USA), les produits PCR ont été séquencés avec les amorces du round 2 de la PCR semi-nichée. Les réactions de séquençage ont été effectuées avec le Kit ABI PRISM BigDye Terminators (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). L'ADN a ensuite été précipité et séquencé selon la méthode de Sanger (3500 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

3.5 Analyses

3.5.1 Analyses statistiques

La différence de prévalence des infections parasitaires en fonction du sexe a été estimée sur les échantillons collectés au Gabon pour lesquels le sexe des PNH a été déterminé. Le test exact de Fisher a été utilisé pour évaluer l'association entre le sexe et l'infection par les géohelminthes et pour tester l'association entre infection par des vers intestinaux et détection d'ADN de filaire. Les tests étaient considérés comme significatifs pour les valeurs de p-value inférieures à 0,05.

3.5.2 Analyses phylogénétiques

Les séquences obtenues ont été assemblées, alignées et corrigées manuellement à l'aide du logiciel SeqMan DNASTAR (Lasergene, DNASTAR Inc., Madison, WI, USA) puis comparées à des séquences de référence déposées dans GenBank à l'aide du Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn) [183]. Les séquences obtenues au cours de notre étude et les séquences publiées dans la GenBank ont été alignées à l'aide de MUSCLE 16 dans MEGA 6.06, avec des corrections manuelles mineures [184]. Le maximum de vraisemblance (MV) a été utilisé pour déduire les arbres phylogénétiques d'ADNr *cox1* et *12S*, et ont été exécutés avec 1000 réplicats bootstrap dans MEGA 6.06. Un modèle partitionné a été mis en œuvre pour estimer les paramètres d'évolution séparément pour chaque gène. En utilisant la version corrigée du critère d'information d'Akaike (AIC), l'analyse JModelTest [185] a été réalisée pour déterminer le modèle évolutif le mieux adapté à l'alignement des séquences pour chaque gène. Le modèle General Time-Reversible avec sites invariants et distribution gamma (GTR + I + Γ) offrait le meilleur ajustement pour l'ARNr *cox1* et *12S*. Pour enraciner les arbres, l'espèce *Filaria latala* (Spirurida: Filariidae) a été incluse comme groupe externe. La distance

moléculaire entre les espèces a été évaluée à l'aide de méthodes des distances. La distance moyenne entre les groupes a été calculée à l'aide de MEGA 6.06.

Les séquences des GH (*Ascaris*, *Necator, Oesophagostomum* et *Trichuris*) ont été alignées dans Geneious Prime 2020.1.2 (https://www.geneious.com) à l'aide de CLUSTALW implémenté dans Geneious. Des séquences représentant différents haplotypes et/ou haplogroupes ont ensuite été utilisées dans des analyses phylogénétiques. Pour les quatre genres analysés, les séquences GenBank des espèces connues pour infecter les hommes et les PNH et les espèces étroitement apparentées ont été réduites aux haplogroupes. Chaque haplogroupe était représenté par une séquence dans l'alignement final. Une analyse du maximum de vraisemblance a été réalisée dans IQ-TREE 1.6.11 [186]. Le modèle le plus approprié a été choisi par ModelFinder [187] mis en œuvre dans IQ-TREE sur la base des scores et pondérations des critères d'information bayésiens les plus élevés (BIC). La topologie de l'arbre a été testée par 1000 répliques de bootstrap ultra-rapide [188] et par un test de rapport de vraisemblance approximatif de type SH (Shimodaira-Hasegawa) [189].

Tableau X : Résumé des analyses éffectuées au laboratoire

Pays	Localités	Espèces de PNH	Nombre	Type de prélèvement	Recherches faites		
					Détermination des Hôtes	Détermination du Sexe	Parasites recherchés
Cameroun	Djoum	Mandrill	12	Fèces	Oui	Non	*A. lumbricoides*, *Trichuris* sp., *Necator* sp., *Oesophagostomum* sp. *Mansonella* sp.
		Mangabey à collier blanc	7	Fèces	Oui	Non	*A. lumbricoides*, *Trichuris* sp., *Necator* sp., *Oesophagostomum* sp. *Mansonella* sp.
		Cercopithèque hocheur	1	Fèces	Oui	Non	*A. lumbricoides*, *Trichuris* sp., *Necator* sp., *Oesophagostomum* sp. *Mansonella* sp.
	Somalomo	Chimpanzé	23	Fèces	Oui	Non	*A. lumbricoides*, *Trichuris* sp., *Necator* sp., *Oesophagostomum* sp. *Mansonella* sp.
		Gorille	38	Fèces	Oui	Non	*A. lumbricoides*, *Trichuris* sp., *Necator* sp., *Oesophagostomum* sp. *Mansonella* sp.
		Mangabey à collier blanc	2	Fèces	Oui	Non	*A. lumbricoides*, *Trichuris* sp., *Necator* sp., *Oesophagostomum* sp. *Mansonella* sp.
		Cercopithèque hocheur	2	Fèces	Oui	Non	*A. lumbricoides*, *Trichuris* sp., *Necator* sp., *Oesophagostomum* sp. *Mansonella* sp.
	Mambelé/Lobeke NP	Chimpanzé	59	Fèces	Oui	Non	*A. lumbricoides*, *Trichuris* sp., *Necator* sp., *Oesophagostomum* sp. *Mansonella* sp.
		Gorille	27	Fèces	Oui	Non	*A. lumbricoides*, *Trichuris* sp., *Necator* sp., *Oesophagostomum* sp. *Mansonella* sp.
		Mangabey agile	3	Fèces	Oui	Non	*A. lumbricoides*, *Trichuris* sp., *Necator* sp., *Oesophagostomum* sp. *Mansonella* sp.
		Cercopithèque hocheur	1	Fèces	Oui	Non	*A. lumbricoides*, *Trichuris* sp., *Necator* sp., *Oesophagostomum* sp. *Mansonella* sp.
	Okala	Patients humains	20	Gouttes de sang sur papier filtre	Non	Non	*Mansonella* sp.
Gabon	Makatamangoye	Chimpanzé	140	Fèces	Oui	Oui (114)	*A. lumbricoides*, *Trichuris* sp., *Necator* sp., *Oesophagostomum* sp. *Mansonella* sp.

Chapitre IV : Résultats

Chapitre IV : Résultats

4.1 Article 1 : Infection des PNH sauvages par des GH au Cameroun et au Gabon

4.1.1 Espèces hôtes et génotypes des individus

Les 315 échantillons analysés dans notre étude provenaient de six espèces : 65 provenaient de gorilles (*Gorilla gorilla gorilla*), 222 de chimpanzés (*Pan troglodytes troglodytes*), 12 de mandrills (*Mandrillus sphinx*), neuf de mangabey à collier blanc (*Cercocebus torquatus torquatus*), trois de mangabeys agiles (*Cercocebus agilis*) et quatre de cercopithèques hocheurs (*Cercopithecus nictitans*). Sur l'ensemble de ces 315 échantillons, nous n'avons obtenu des informations sur le sexe que pour 114 chimpanzés de Matakamangoye. Les résultats des analyses du gène de l'amélogénine ont indiqué que 40 échantillons provenaient de femelles et 74 de mâles. Aucune analyse statistique n'a pu être effectuée avec les échantillons de primates de la famille des Cercopithecidae à cause du faible nombre de ces PNH, et parce que les hôtes n'étaient pas génotypés. Cependant, nous avons inclus ces échantillons dans les analyses des infections par les GH, afin de démontrer le rôle de ces espèces de PNH en tant que réservoirs potentiels de GH. Le nombre d'échantillons collectés et la répartition des espèces de PNH de ces échantillons entre les sites sont détaillés dans le tableau XIII.

4.1.2 Prévalence des infections par les GH

La prévalence de l'infection par toutes les espèces de GH analysées chez les gorilles et les chimpanzés, et le nombre de prélèvements provenant de mandrills, de mangabeys et de cercopithèques hocheurs présentant ces GH sont résumés dans le tableau XI. Pour ce qui est de la prévalence des GH, *Oesophagostomum* était le parasite le plus fréquent, présent chez la plupart des espèces de PNH étudiées, avec une prévalence de 78,5 % (51/65) chez les gorilles et de 70,7 % (157/222) chez les chimpanzés. L'ADN d*'Oesophagostomum* a également été détecté chez les autres espèces de PNH, à l'exception des cercopithèques hocheurs, où les quatre échantillons testés étaient négatifs.

Les GH du genre *Necator* ont été détectés dans presque la moitié des échantillons de gorilles et de chimpanzés, avec des prévalences de 53,8% (35/65) et 45,0% (100/222) respectivement, et dans un échantillon provenant de cercopithèques hocheurs sur quatre.

Trichuris a été très rarement détecté : ce genre n'a été trouvé que chez deux chimpanzés sur 222 (0,9 %), chez un gorille sur 65 (1,5 %) et dans un échantillon provenant de cercopithèques hocheurs sur quatre.

Aucun GH du genre *Ascaris* n'a été détecté dans les échantillons analysés. En outre, pour un échantillon provenant d'un chimpanzé et trois échantillons provenant de cercopithèques hocheurs, les amplicons de PCR ciblant *Necator* et *Oesophagostomum* ont été identifiés, après des analyses de séquence BLAST, comme correspondant à *Ternidens deminutus*, un nématode de la famille des Strongylidae parfois appelé « faux ankylostome » (tableau XII).

Tableau XI : Résumé des résultats de la PCR pour les GH et des séquences *ITS2* disponibles pour les analyses phylogénétiques

Localité	Espèces de PNH	n	PCR+ *Necator* sp.	Sq *Necator sp.* Pour analyses phylogénétiques	PCR+ *Oesoph.* sp.	Sq *Oesoph.* sp. Pour analyses phylogénétiques	PCR+ *Trichuris* sp.	Sq *Trichuris* sp. Pour analyses phylogénétiques
Djoum (CAM)	**Mandrill**	12	0	-	8 (66,7%)	3	0	-
	Mangabey à collier blanc	7	0	-	3	2	0	-
	Cercopithèque hocheur	1	0	-	0	-	0	-
Somalomo (CAM)	**Chimpanzé**	23	20 (87,0%)	9	22 (95,7%)	17	0	-
	Gorille	38	24 (63,2%)	1	38 (100%)	26	0	-
	Mangabey à collier blanc	2	2	0	2	1	0	-
	Cercopithèque hocheur	2	1	0	2*	2*	1	1
Mambélé (CAM)	**Chimpanzé**	59	17 (28,8%)	10	34 (+1*) (57,6%)	22 (+1*)	2 (3,4%)	1
	Gorille	12	2 (16,7%)	1	8 (66,7%)	8	1 (3,7%)	1
	Mangabey agile	3	1	1	2	2	0	-
	Cercopithèque hocheur	1	0	-	1*	1*	0	-
Lobéké PN (CAM)	**Gorille**	15	9 (60,0%)	2	5 (33,3%)	1		
Matakamangoye (GAB)	**Chimpanzé**	140	63 (45,0%)	50	101 (72,1%)	90	0	-
Total gorilles		55	35	11	51	35	1	1
Total chimpanzés		222	100	69	157	129	2	1
Total		315	139 (44,1%)	75	223 (+4*) (70,8%)	172 (+4*)	4 (1,3%)	3

*séquences de *Ternidens deminutus* non incluses dans la reconstruction phylogénétique

Pour ce qui est de la prévalence *d'Oesophagostomum* et de *Necator* en fonction du site d'étude, la même tendance a été observée chez les gorilles et les chimpanzés. La prévalence la plus élevée pour ces deux parasites a été observée à Somalomo, au Cameroun, suivie de Matakamangoye, au Gabon, et la prévalence la plus faible a été observée chez les PNH de Mambélé. Seuls des échantillons de gorilles ont été analysés dans le PN de Lobéké, où la prévalence de *Necator* et d'*Oesophagostomum* était de 60,0% et 33,3% respectivement.

Parmi les PNH étudiés, les gorilles étaient l'espèce la plus infectée soit par *Necator*, soit par *Oesophagostomum*, soit par les deux GH (86,2%), suivis des chimpanzés (81,5%). Les mandrills n'étaient positifs que pour *Oesophagostomum*, les cercopithèques hocheurs n'étaient positifs que pour *Necator*, tandis que les deux GH ont été détectés chez les mangabeys à collier blanc et les mangabeys agiles. Des co-infections *Necator*/*Oesophagostomum* ont été détectées chez 30 gorilles (46,1%), 76 chimpanzés (34,2%), deux mangabeys à collier blanc et un mangabey agile sur trois (Tableau XII).

Tableau XII : Echantillons positifs à la PCR pour *Necator* et *Oesophagostomum*.

hôte	n	PCR *Necator* positif sans co-infection	PCR *Oesophagostomum* positif sans co-infection	Co-infections par *Necator* et *Oesophagostomum*	*Necator* ou *Oesophagostomum* ou les deux parasites
Chimpanzee	222	100 (45,0%)	157 (70,7%)	76 (34,2%)	181 (81,5%)
Gorille	65	35 (53,8%)	51 (78,5%)	30 (46,1%)	56 (86,2%)
Mandrill	12	0	8	0	8
Mangabey à collier blanc	9	2	5	2	5
Mangabey agile	3	1	2	1	2
Cercopithèque hocheur	4	1	0	0	1
Total	315	139 (44,1%)	223 (70,8%)	109 (34,6%)	253 (80,3%)

4.1.3 Prévalence des co-infections par *Oesophagostomum* et *Necator* chez les chimpanzés et les gorilles

Nous avons d'abord analysé les chimpanzés et les gorilles séparément et nous avons observé que la co-infection par *Oesophagostomum* et *Necator* se produisait fréquemment, mais que ces associations n'étaient pas statistiquement significatives. Lorsque les deux espèces de PNH ont été combinées et analysées ensemble, l'association était statistiquement significative ($p = 0,023$) (tableau XIII).

Tableau XIII : Nombre de chimpanzés, de gorilles ou des deux espèces combinées, positifs ou négatifs pour *Oesophagostomum* sp., co-infectés ou non avec *Necator* sp. (les valeurs sous l'hypothèse nulle de co-infections, sont indiquées entre parenthèses)

Chimpanzés		*Necator* sp.			
		Positif	Négatif	Total	Résultat du test bilatéral
Oesophagostomum sp.	Positif	76 (70,7)	81 (86,3)	157	0,139
	Negative	24 (29,3)	41 (35,7)	65	
	Total	100	122	222	
Gorille		*Necator* sp.			
		Positif	Negatif	Total	Résultat du test bilatéral
Oesophagostomum sp.	Positif	30 (27,5)	21 (23,5)	51	0,143
	Negatif	5 (7,5)	9 (6,5)	14	
	Total	35	30	65	
Chimpanzés et Gorilles		*Necator* sp.			
		Positif	Negatif	Total	Résultat du test bilatéral
Oesophagostomum sp.	Positif	107 (98,3)	102 (110,7)	209	0,023
	Negatif	28 (36,7)	50 (41,3)	78	
	Total	135	152	287	

4.1.4 Prévalence des infections parasitaires selon le sexe des PNH étudiés

Le sexe a été déterminé pour 114 des 140 échantillons de chimpanzés du Gabon : 40 femelles et 74 mâles. La prévalence d'*Oesophagostomum* ou de *Necator* ne différait pas de manière significative entre les mâles et les femelles (p = 0,645 et 0,326, respectivement) (tableau XIV).

Tableau XIV : Nombre de chimpanzés femelles et mâles positifs ou négatifs pour *Oesophagostomum* sp. et pour *Necator* sp. et comparaison de la prévalence entre les sexes

Parasite species	Sex	Nombre de positifs (%)	Nombre de négatifs	Total	Test exacte de Fisher
Oesophagostomum sp.	Femelles	32 (80,0)	8	40	0,645
	Mâles	55 (74,3)	19	74	
	Total	87 (73,3)	27	114	
Necator sp.	Femelles	16 (40,0)	24	40	0,326
	Mâles	38 (51,4)	36	74	
	Total	54 (47,4)	60	114	

4.1.5 Analyses phylogénétiques

Au total, nous avons obtenu 254 séquences de *Necator*, *Oesophagostomum*, *Ternidens deminutus* et/ou *Trichuris* à partir de 204 échantillons fécaux. Le taux de réussite de séquençage à partir des produits PCR était de 53,9% pour *Necator*, 77,1% pour *Oesophagostomum* et *Ternidens deminutus*, et 75% pour *Trichuris*. Le tableau XV montre les différentes espèces de GH détectées chez les PNH, selon le site d'étude, avec les haplotypes, et le nombre d'individus pour lesquels des séquences ont été obtenues.

Tableau XV : Les espèces de GH, selon le site d'étude, les haplotypes, et le nombre de PNH chez lesquels des séquences ont été obtenues.

Localité	Espèces de PNH	*Necator* Type II	*Necator* Type III	*O. stephanostomum*	*O. bifurcum*	*Oesophagostomum* sp.	*Trichuris* sp.	*Ternidens deminutus*
Djoum (CAM)	Mandrill N=3	-	-	-	-	3 OH15	-	-
	Mangabey à collier blanc N=2	-	-	-	1 OH9,12	1 OH13	-	-
Somalomo (CAM)	Chimpanzé N=17	9 NH2, 1/2, 1/2/4	-	14 OH1,2,4,5	3 OH9,10,11	-	-	-
	Gorille N=26	1 NH2/4	-	26 OH1,2,3,5,7,8	-	-	-	-
	Mangabey à collier blanc N=1	-	-	-	-	1 OH13,14	-	-
	Cercopithèque hocheur N=2	-	-	-	-	-	1	2
Mambélé (CAM)	Chimpanzé N=30	10 NH1,2,3,4	-	21 OH1,2,3,4,5	1 OH9	-	1	1
	Gorille N=8	1 NH1/2	-	8 OH1,2,3	-	-	-	-
	Mangabey agile N=2	1 NH1/2	-	2 OH1,3	-	-	-	-
	Cercopithèque hocheur N=1	-	-	-	-	-	-	1
Lobéké NP (CAM)	Gorille N=4	3 NH1,1/2	-	1 OH1	-	-	1	-
Matakamangoye (GAB)	Chimpanzé N=108	49 NH1,2	1 NH5	90 OH1,2,3,4,5,6,16	-	-	-	-
Total		74	1	162	5	5	3	4

Les haplotypes sont indiqués le cas échéant. N : nombre d'individus (gorilles, chimpanzés) ou d'échantillons (autres PNH) à partir desquels nous avons obtenu des séquences.

4.1.5.1 *Necator* sp.

Sur 139 échantillons positifs pour *Necator* à la PCR, nous avons obtenu 75 séquences partielles de haute qualité de la région *ITS2* (138 à 273 pb). Ces séquences provenaient de 19 chimpanzés, de cinq gorilles et d'un mangabey agile du Cameroun, et de 50 chimpanzés du Gabon. Un total de cinq variants différents (NH1–NH5) d'*ITS2* a été détecté. Quatre d'entre eux présentaient un polymorphisme sur trois nucléotides (3 SNP), tandis que l'haplotype NH5 différait des autres de 3,7 à 5,6%. Deux génotypes (NH3, NH4) présentaient chacun un nucléotide ambigu « Y » différant dans sa position dans l'alignement. Des différences minimes ont été observées entre les variants NH1-NH4; par conséquent, ils seront appelés haplogroupe NH1-4. L'haplotype NH1 (n = 14) a été détecté chez des gorilles et des chimpanzés du Gabon et du Cameroun (Lobéké et Mambélé), tandis que le NH2, haplotype le plus fréquent (n = 32), n'a été détecté que chez des chimpanzés des deux pays. Les variants NH3 et NH4 étaient tous deux représentés par une seule séquence et les deux ont été détectés dans des échantillons de chimpanzés de Mambélé, au Cameroun. L'haplotype NH5 a été trouvé dans un seul échantillon de chimpanzé de Matakamangoye, au Gabon. Malheureusement, 26 séquences étaient trop courtes pour être attribuées à un haplotype particulier : 23 de ces séquences étaient identiques à NH1 et NH2 (comprenant des séquences de deux gorilles de Mambélé et Lobéké, un échantillon de mangabey agile de Mambélé et 21 chimpanzés de différents sites d'étude), et trois séquences de NH1, NH2 ou NH4 (deux chimpanzés et un gorille de Somalomo).

Neuf séquences de *Necator* sp. représentant les cinq variants ont été combinées dans un alignement final de 310 pb comprenant un total de 40 séquences (31 références de la GenBank) de *Necator* sp. et deux séquences supplémentaires de *Bunostomum trigonocephalum* (numéros d'accession GenBank AY439022, MG182023) ajoutées comme groupe externe. L'arbre phylogénétique a été construit selon la méthode du MV avec le modèle d'évolution de HKY+F. L'arbre résultant a montré deux clades distincts, le premier comprenant uniquement des séquences de *N. americanus,* provenant principalement de l'homme, et le second clade comprenant uniquement des séquences identifiées comme *Necator* sp., provenant principalement de PNH, qui ont ensuite été divisés en deux sous-clades (fig. 8). Notre séquence d'haplotype NH5 s'est regroupée avec une séquence de *Necator* sp. Type III (AB793535), publiée par Hasegawa *et al*. (2014) provenant d'un humain de la RCA. Toutes les séquences représentant l'autre haplogroupe (NH1-NH4) se sont regroupées dans un sous-clade différent, bien que le nœud ne soit pas robuste. Ce sous-clade comprenait également des séquences de

Necator sp. provenant de chimpanzés (Ouganda), de gorilles (Gabon, RCA) et d'un humain de RCA [72, 190]. Hasegawa *et al*. (2014) ont identifié ce taxon comme *Necator* sp. Type II.

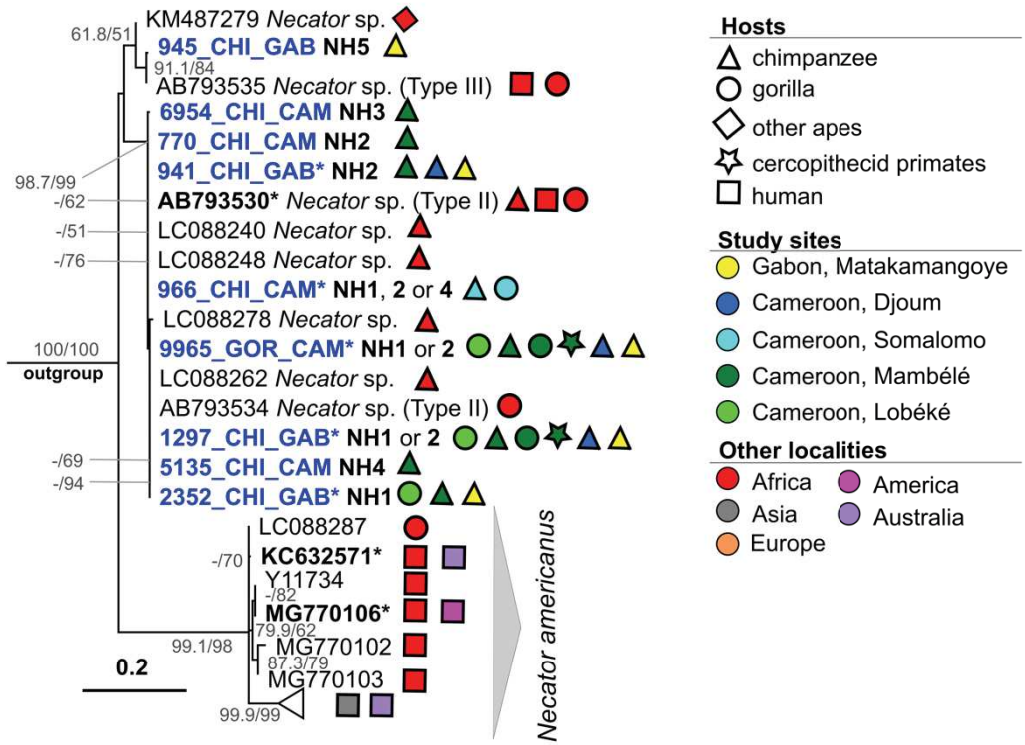


Figure 8 : Arbre phylogénétique construit selon la méthode du MV de la région ITS2 des espèces *Necator* inférées par le modèle HKY+F.

La phylogénie a été testée par SH-aLRT (à gauche) et bootstrap ultrarapide (à droite) dans 1000 répétitions. Seules les valeurs de boostrap supérieures à 50 (en %) sont affichées. Les séquences provenant de notre étude sont en bleu. Les lettres en gras et l'astérisque indiquent les haplogroupes comprenant plusieurs séquences. La barre d'échelle indique le nombre de substitutions de nucléotides.

4.1.5.2 *Oesophagostomum* sp.

Sur 227 échantillons positifs pour *Oesophagostomum* à la PCR, nous avons obtenu 176 séquences partielles de haute qualité de la région ITS2 (171–174 pb). Ces séquences ont ensuite été assemblées en 214 séquences appartenant à 17 haplotypes nommés OH1-17. Treize séquences étaient trop courtes pour être distinguées comme appartenant à l'haplotype OH1 ou OH2. L'haplotype OH17 (4 séquences) a eu une homologie de 100% avec une séquence de

Ternidens deminutus (AJ888729). Cet haplotype comprenait des séquences provenant d'un chimpanzé et d'un cercopithèque hocheur de Mambélé et de deux échantillons de cercopithèque hocheur de Somalomo au Cameroun. Les 16 haplotypes restants d'*Oesophagostomum,* ainsi que d'autres séquences d'*Oesophagostomum* disponibles (n = 45), ont été utilisés pour créer un alignement (175 pb) pour une reconstruction phylogénétique selon la méthode du MV suivant le modèle evolutif K2P + G4. Cinq séquences d'*O. dentatum* ont servi de groupe externe.

Dans l'arbre phylogénétique, les haplotypes OH9–12 provenant de quatre chimpanzés et d'un mangabey se sont regroupés dans un clade fortement soutenu avec toutes les séquences d'*O. bifurcum* (Fig. 9). Nos quatre haplotypes différaient les uns des autres de 0,6 à 1,1%, la distance génétique (p-distance) observée dans l'ensemble du clade *O. bifurcum* variait entre 0,6 et 4,6%. Nos quatre haplotypes provenaient uniquement du Cameroun. Les haplotypes OH10 et OH11 provenaient de trois chimpanzés de Somalomo, l'haplotype OH12 d'un mangabey à tête rouge de Djoum, et l'haplotype OH9 a été détecté chez deux chimpanzés de Somalomo et un de Mambélé, et le dernier chez un mangabey à tête rouge de Djoum.

Les haplotypes OH1–8 et OH16 se sont regroupés dans un clade robuste comprenant des séquences d'*O. stephanostomum* (Fig. 9). Nos haplotypes provenaient de toutes nos localités d'étude à l'exception de Djoum et ont été détectés chez des gorilles, des chimpanzés et deux mangabeys agiles (Mambélé au Cameroun). Ces haplotypes différaient de 0,6 à 2,9%, et la distance génétique (p-distance) globale dans l'ensemble du clade atteignait 6%.

Enfin, les haplotypes OH13–15 se regroupant avec des séquences d'*Oesophagostomum* sp. provenant de différents singes cercopithécidés et d'humains d'Ouganda ont formé un clade séparé et assez éloigné d'*O. stephanostomum* (Fig. 9). Nos haplotypes provenaient de deux échantillons de mangabey à collier blanc de Somalomo et Djoum, et de trois échantillons de mandrills de Djoum. Nos trois haplotypes différaient de 0,6 à 2,9%, ce qui est également l'intervalle de la distance génétique (p-distance) pour l'ensemble du clade.

Nos haplotypes du clade *O. bifurcum* (OH9–12) différaient des haplotypes OH1–8 et OH16 d'*O. stephanostomum* de 1,7–4,6 % et des haplotypes d'*Oesophagostomum* sp. de 5,2–8 %. Une différence similaire a été observée entre nos haplotypes *O. stephanostomum* et *Oesophagostomum* sp., variant entre 4,6 et 8%.

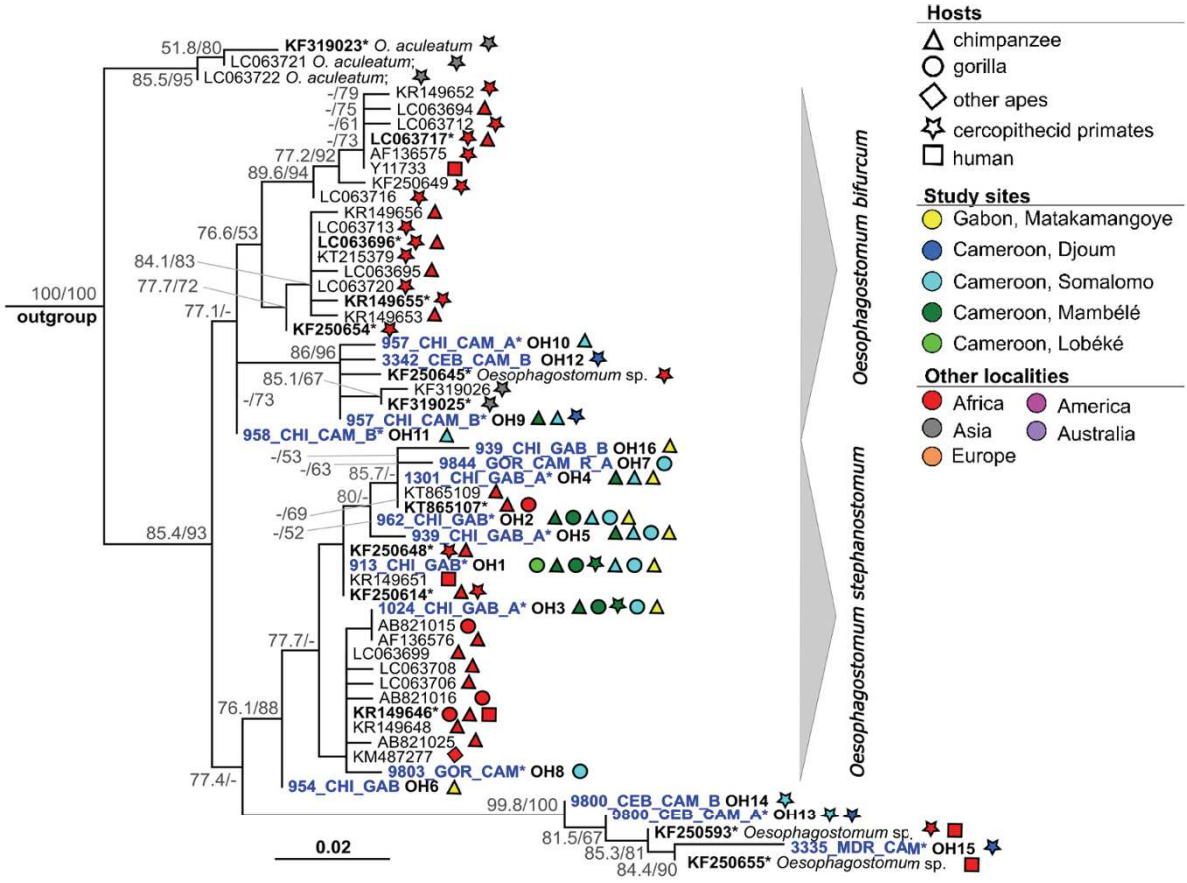


Figure 9 : Arbre phylogénétique construit selon la méthode du MV de la région ITS2 d'*Oesophagostomum* sp. inféré à l'aide du modèle K2P+G4.

La phylogénie a été testée par SH-aLRT (à gauche) et bootstrap ultrarapide (à droite) avec 1000 répétitions. Seules les valeurs supérieures à 50 (en %) sont affichées. Les séquences provenant de notre étude sont en bleu. Les lettres en gras et l'astérisque marquent les haplogroupes comprenant plusieurs séquences.

4.1.5.3 *Trichuris* sp.

Un échantillon positif pour *Trichuris* à la PCR n'a pas pu être séquencé. La région couvrant l'ITS1, 5.8S et l'ITS2 (467-703 pb) a été amplifiée à partir de trois échantillons provenant d'un gorille, d'un chimpanzé et d'un cercopithèque hocheur de Lobéké, Mambélé et Somalomo, respectivement. Toutes les trois séquences étaient identiques pour les 416pb de la région ITS2. L'alignement final de 625 pb de la région ITS utilisée pour l'analyse phylogénétique comprenait 113 séquences de *Trichuris* sp. Une séquence de *T. vulpis* (numéro d'accession GenBank AM234616) a été utilisée comme groupe externe. Dans l'arbre phylogénétique construit selon le modèle TN+F+R2, nos séquences se sont regroupées dans un clade fortement soutenu contenant des séquences de *T. trichiura* et de *Trichuris* sp. provenant d'humains et de

PNH tels que *Pan troglodytes, Cercopithecus* sp., *Colobus* sp., *Papio* sp., *Chlorocebus aethiops* et *Procolobus rufonitratus* d'Ouganda, du Cameroun, d'Afrique du Sud et de certains zoos européens.

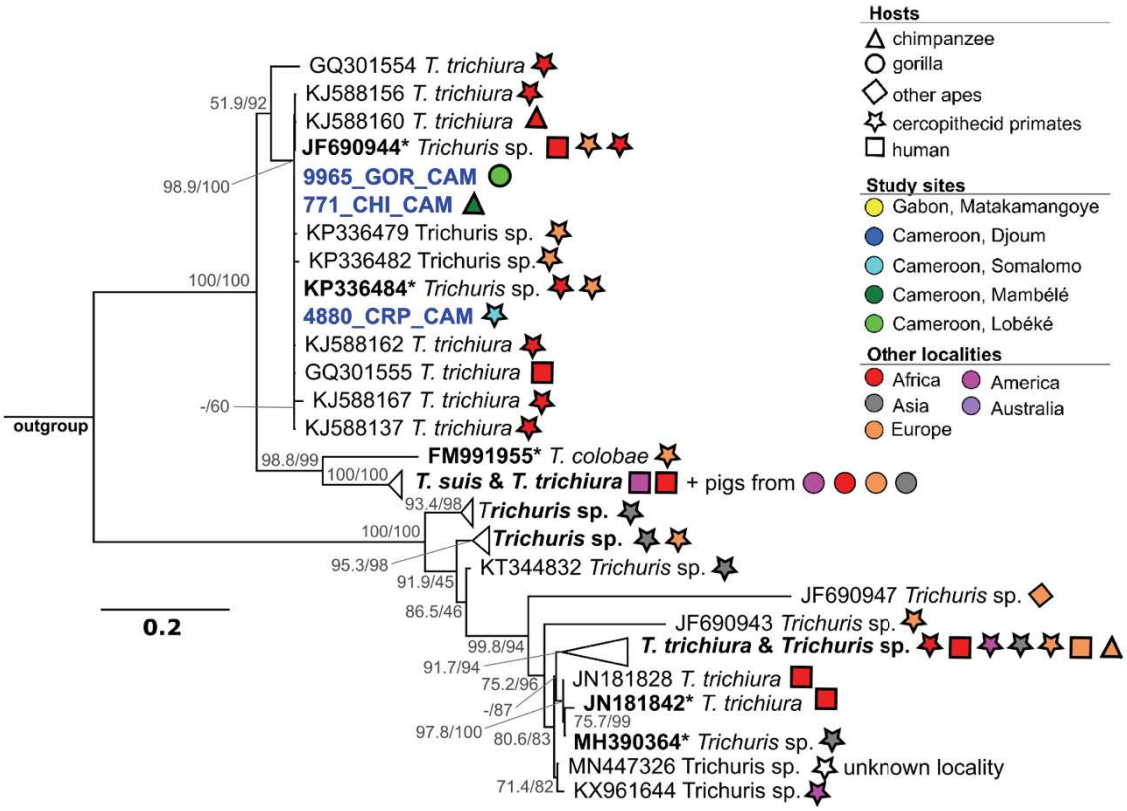


Figure 10 : Arbre phylogénétique construit selon la méthode du MV de la région ITS2 de *Trichuris* sp. inféré à l'aide du modèle TN+F+R2.

La phylogénie a été testée par SH-aLRT (à gauche) et bootstrap ultrarapide (à droite) avec 1000 répétitions. Seules les valeurs supérieures à 50 (en %) sont affichées. Les séquences provenant de cette étude sont en bleu. Les lettres en gras et l'astérisque marquent les haplogroupes comprenant plusieurs séquences.

4.2.5.4 Co-infections confirmées par les résultats du séquençage

Sur les 76 chimpanzés chez lesquels la co-infection par *Oesophagostomum* et *Necator* a été détectée par nos analyses PCR, nous avons obtenu 43 séquences exploitables pour des analyses phylogénétiques, soit un taux de réussite de 56,6%. Pour les gorilles, nous n'avons obtenu que deux séquences de bonne qualité sur 30 échantillons positifs à la PCR *Oesophagostomum* et *Necator*. Les séquences restantes n'ont pas été incluses dans les alignements utilisés dans les analyses phylogénétiques, parce qu'elles étaient courtes (moins de 138 pb) ou présentaient beaucoup de nucléotides dégénérés. Cependant, les résultats de la PCR ont montré clairement

deux bandes distinctes correspondant à la taille d'amplicon attendue pour *Necator* et *Oesophagostomum.*

La co-infection par *O. stephanostomum* et *Necator* sp. Type II était assez courante, détectée chez 33 chimpanzés de Matakamangoye, sept chimpanzés et un gorille de Somalomo, et chez un chimpanzé et un gorille de Mambelé. La co-infection par *O. bifurcum* et *Necator* sp. Type II s'est produite chez un chimpanzé de Matakamangoye, et un chimpanzé de Mambelé. Nous avons détecté la co-infection *Trichuris* sp. et *Ternidens deminutus* chez un cercopithèque hocheur de Somalomo. Enfin, un gorille du parc national de Lobéké, au Cameroun, a donné un résultat positif à la recherche de *Trichuris* sp. et de *Necator* sp. Type II.

4.2. Article 2 : Détection de l'ADN de filaires étroitement apparentées à *Mansonella perstans* dans des échantillons fécaux de primates non humains sauvages au Cameroun et au Gabon

4.2.1 Résultats PCR et homologie des filaires dans les fragments d'ADNr *cox1* et *12S* des six espèces de PNH

Les 315 échantillons de matières fécales de PNH comprenaient 65 échantillons de gorilles (*Gorilla gorilla*), 12 de mandrills (*Mandrillus sphinx*), 222 de chimpanzés (*Pan troglodytes*), neuf de mangabeys à collier blanc (*Cercocebus torquatus*), trois de mangabeys agiles (*Cercocebus agilis*) et quatre de cercopithèque hocheur (*Cercopithecus nictitans*). Des PCR ciblant l'ADNr *12S* et les gènes mitochondriaux *cox1* des filaires ont été réalisées pour tous les échantillons sélectionnés. Des séquences d'ADNr *12S* et de *cox1* ont également été obtenues à partir de 20 patients humains, et sept d'entre elles ont été ajoutées à l'alignement pour la reconstruction des arbres phylogénétiques. Parmi les 315 échantillons de fèces de PNH analysés, 121 étaient positifs par PCR (38%) : 31 échantillons étaient positifs pour l'ADNr *12S* uniquement, 59 échantillons étaient positifs pour *cox1* uniquement et 31 pour les deux marqueurs (tableau IX). En comparant par BLASTn les séquences obtenues avec les séquences de référence de filaires de la famille des Onchocercidae disponibles dans GenBank, des homologies supérieures à 90% ont été trouvées dans 30 échantillons de gorilles sur 65 (46%), deux échantillons de mandrills sur 12, 85 échantillons de chimpanzés sur 222 (38%), seulement un échantillon de mangabey agile sur 12 et trois échantillons de cercopithèques hocheur sur quatre.

Tableau XVI : Résumé des résultats de la PCR pour les filaires et du BLASTn selon les espèces de PNH et le site de prélèvement

Pays	Localité	Espèces de PNH	N	Positif *12s* rDNA	Positif *cox1*	Positif *12s* rDNA et *cox1*	Nombre de PNH positifs
Cameroun	Djoum	Chimpanzé	0	0	0	0	0
		Gorille	0	0	0	0	0
		Mandrill	12	2	0	0	2
		Mangabey à collier blanc	7	0	0	0	0
		Cercopithèque hocheur	1	0	0	0	0
	Somalomo	Chimpanzé	23	4	9	2	11
		Gorille	38	12	13	7	18
		Mandrill	0	0	0	0	0
		Mangabey à collier blanc	2	0	0	0	0
		Cercopithèque hocheur	2	0	2	0	2
	Mambelé/Lobeke PN	Chimpanzé	59	26	20	15	31
		Gorille	27	4	8	0	12
		Mandrill	0	0	0	0	0
		Mangabey agile	3	1	1	1	1
		Cercopithèque hocheur	1	1	1	1	1
Gabon	Makatamangoye	Chimpanzé	140	12	36	5	43
Total			315	62	90	31	121

N : nombre d'échantillons analysés; PN : Parc National

4.2.2 Analyses phylogénétiques des fragments des gènes *cox1* et *12S* ADNr

Parmi ces 121 échantillons, 39 séquences sur 62 étaient exploitables pour des analyses phylogénétiques pour le gène de l'ADNr *12S* (correspondant à 63% des séquences obtenues) et 70 sur 90 pour le gène *cox1* (correspondant à 78% des séquences obtenues) (Tableau X). Les séquences restantes n'ont pas été incluses dans les alignements car elles étaient de faible qualité (moins de 250 pb) ou affichaient un bruit de fond avec trop de nucléotides dégénérés non résolus.

Les analyses phylogénétiques des 70 séquences du gène *cox1* ont permis de construire un arbre composé de cinq groupes monophylétiques (Fig. 11). En bas (groupe 5), un groupe de trois échantillons de gorilles regroupés avec *Protospirura muricula* (Nematoda : Spiruridae, un parasite des rongeurs de la famille des muridés) et trois autres échantillons de *Cercopithecus nictitans* se sont ramifiés à partir du même nœud.

Le groupe juste au-dessus, représenté exclusivement par des échantillons de chimpanzés du Gabon (groupe 4) n'était pas très robuste (boostrap <70). Il reste donc difficile d'associer ces séquences à une espèce parasitaire donnée.

Ensuite, trois groupes (1, 2 et 3) se sont regroupés au sein du genre *Mansonella* avec une robustesse supérieure à 70%. Ils appartiennent tous au clade ONC5 tel que décrit par Lefoulon *et al.* (2).

Les séquences provenant de cinq chimpanzés de Matakamangoye (Gabon) et de deux chimpanzés de Somalomo (Cameroun) se sont regroupées avec *M. perstans* infectant des humains de la région d'Okola (Cameroun) et avec deux séquences de référence de *M. perstans* infectant des humains, extraites de la GenBank (groupe 2). Ces séquences avaient une homologie superieure à 98% avec les séquences de réference.

Les groupes 1 et 3 étaient composés de nématodes du genre *Mansonella* infectant des gorilles, des chimpanzés et des mangabeys de différentes régions (Matakamangoye-Gabon, Somalomo et PN Mambele/Lobeke Cameroun).

Dans la reconstruction phylogénétique du *cox1*, les séquences du groupe 1 et du groupe 2 étaient génétiquement plus proches que les groupes 2 et 3, avec une divergence interspécifique moyenne de 4,2% et 6,8% respectivement. L'identification des espèces de filaire en utilisant le *cox1* comme marqueur moléculaire était précise, comme rapporté dans des études précédentes pour d'autres espèces de filaires (2, 8, 22). La valeur du seuil de divergence du marqueur *cox1* pour différencier les espèces d'Onchocercidae a été précédemment établie à 4,8% (22). Cependant, en fonction de l'ensemble des données et du nombre de séquences analysées, les distances intraspécifiques entre la plupart des espèces d'Onchocercidae étudiées étaient inférieures à 2% et les distances interspécifiques supérieures à 4,5%.

Les analyses phylogénétiques de l'ADNr *12S* ont été moins discriminantes que les analyses du fragment *cox1* et moins de séquences étaient disponibles pour l'analyse (Fig.12, Tableau XVII). L'identification précise des espèces de filaires n'a pas été possible. Cependant, six échantillons (CAM_5149, CAM_9803, CAM_9838, CAM_5158, CAM_5160 et CAM_4874) dans le groupe 1 de l'arbre phylogénétique du *cox1*, ont été amplifiés avec succès pour le fragment d'ADNr *12S*. Cinq de ces six échantillons amplifiés dans les deux gènes, se sont regroupés avec des échantillons de *M. perstans* infectant des humains, bien que le nœud ne soit pas robuste (boostrap faible) ; seul l'échantillon CAM_9838, provenant d'un gorille, s'est fixé en dehors de ce groupe de *M. perstans* dans l'arbre phylogénétique *12S*.

Enfin, deux échantillons de Djoum au Cameroun (CAM_3337 d'un mandrill et CAM_3338 d'un mangabey) se sont fixés ensemble mais en dehors des références d'ADN connues pour les filaires et *Protospirura muricola*.

Tableau XVII : Résumé des résultats d'individus positifs dans les arbres phylogénétiques selon les espèces de PNH et le site de prélèvement.

Pays	Localités	Epèces de PNH	N	*12s* rDNA pour analyses phylogénétiques	*cox1* pour analyses phylogénétiques	*12s* rDNA et *cox1* analyses phylogénétiques	PNH positif
Cameroun	Djoum	Chimpanzé	0	0	0	0	0
		Gorille	0	0	0	0	0
		Mandrill	12	1	0	0	1
		Mangabey à collier blanc	7	1	0	0	1
		Cercopithèque hocheur	1	0	0	0	0
	Somalomo	Chimpanzé	23	4	7	1	10
		Gorille	38	11	15	2	24
		Mandrill	0	0	0	0	0
		Mangabey à collier blanc	2	0	0	0	0
		Cercopithèque hocheur	2	0	2	0	2
	Mambelé/Lobeke NP	Chimpanzé	59	11	14	2	23
		Gorille	27	1	9	0	10
		Mandrill	0	0	0	0	0
		Mangabey agile	3	1	1	1	1
		Cercopithèque hocheur	1	0	1	0	1
Gabon	Makatamangoye	Chimpanzé	140	9	21	0	30
Total			315	39	70	6	103

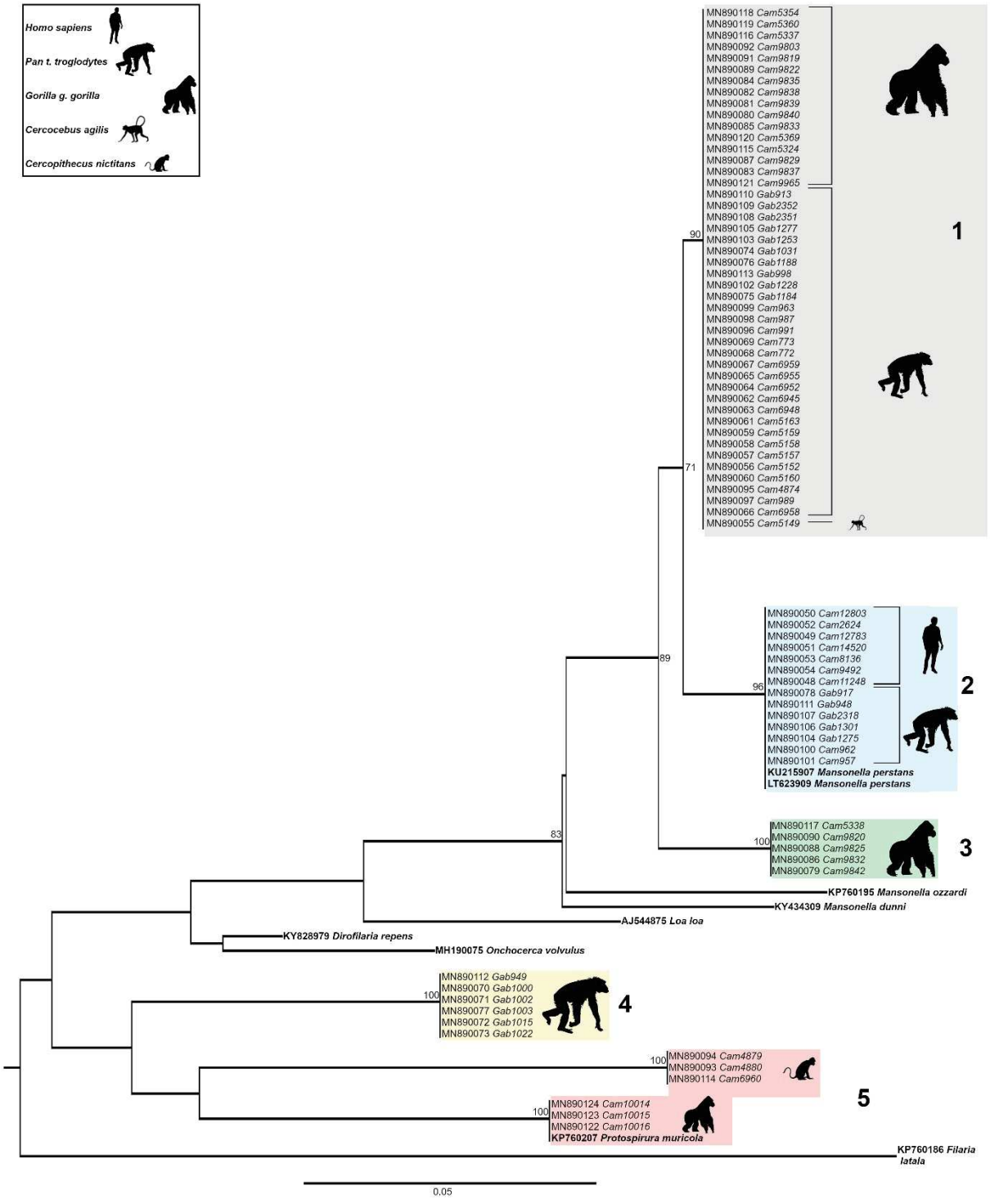


Figure 11: Arbre phylogénétique basé sur les séquences du gène de la sous-unité 1 du cytochrome c oxydase (*cox1*) provenant de 85 spécimens d'Onchocercidae.

La longueur totale de l'alignement est de 474 pb. *Filaria latala* a été inclus comme groupe externe. La topologie a été déduite à l'aide du maximum de vraisemblance. Les nœuds sont associés à des valeurs de bootstrap basées sur 1000 répliques. Les valeurs de prise en charge Bootstrap <70 ne sont pas affichées. La barre d'échelle indique le nombre de substitutions de nucléotides. Les échantillons de référence sont indiqués en gras.

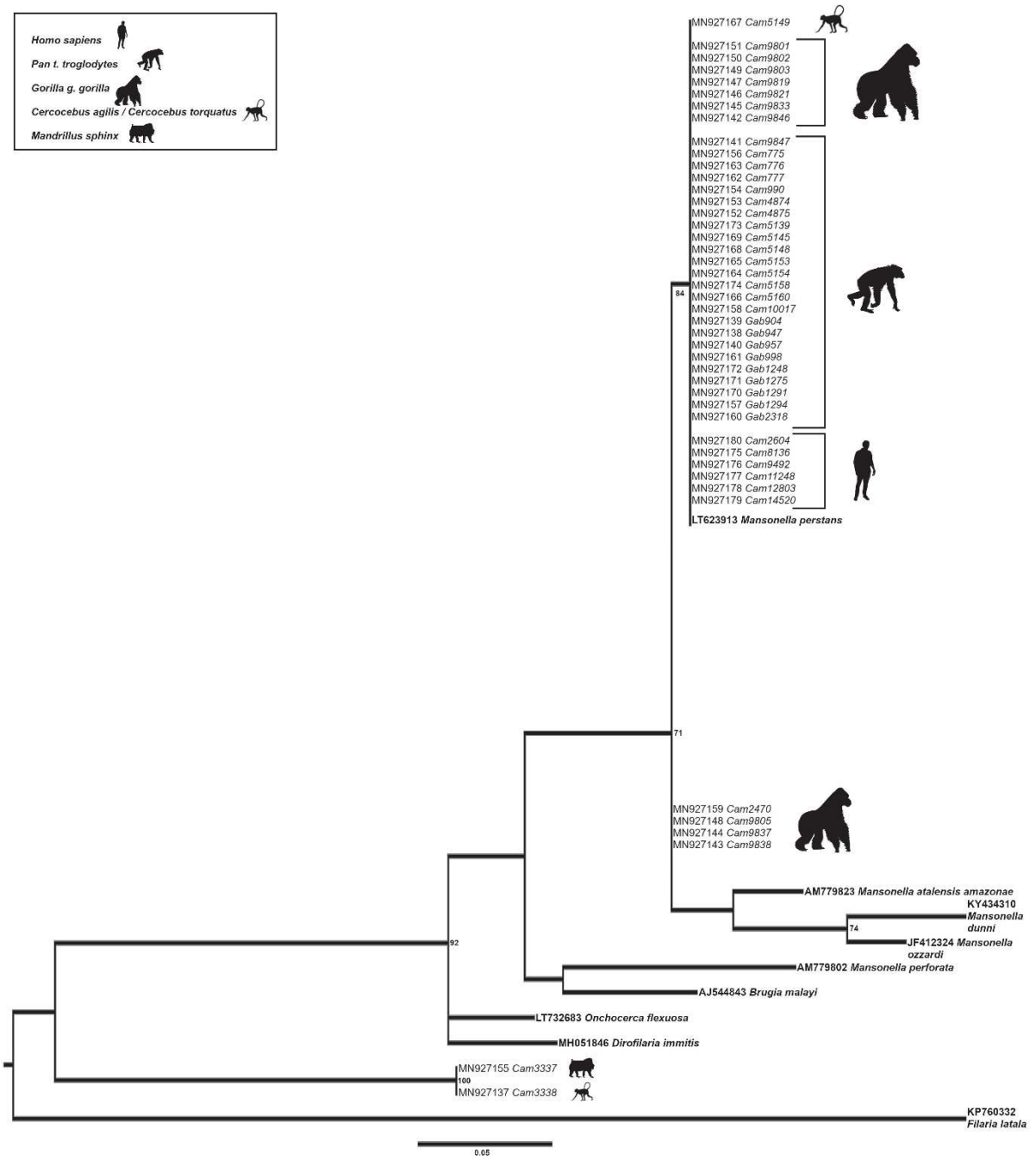


Figure 12: Arbre phylogénétique basé sur des séquences génétiques d'ADNr *12S* provenant de 52 spécimens d'Onchocercidae.

La longueur totale de l'alignement est de 266 pb. *Filaria latala* a été inclus comme groupe externe. La topologie a été déduite à l'aide du maximum de vraisemblance. Les nœuds sont associés à des valeurs de bootstrap basées sur 1000 répliques. Les valeurs de prise en charge Bootstrap <70 ne sont pas affichées. La barre d'échelle indique le nombre de substitutions de nucléotides. Les échantillons de référence sont indiqués en gras.

4.2.3 Relation entre la détection d'ADN de filaires dans les selles et présence d'une co-infection avec des nématodes gastro-intestinaux

Cent-six des 121 PNH (87,6%) dont les fèces contenaient de l'ADN de filaire étaient également infectés soit par *Oesophagostomum* sp., soit par *Necator* sp., ou par les deux GH. Parmi les 194 PNH sans ADN de filaire dans les fèces, 151 (77,8%) étaient infectés par un ou deux de ces GH. Il n'y avait pas d'association statistiquement significative entre la présence d'une infection par ces nématodes intestinaux et la détection de l'ADN de filaire lorsque toutes les espèces de PNH étaient analysées ensemble. Il en était de même quand on considérait séparément les *Cercopithecus* sp. et *Cercocebus* sp., les mandrills et les chimpanzés. En revanche, pour les gorilles, nous avons détecté significativement plus d'infections à *Mansonella* sp. lorsqu'ils étaient également infectés par des GH (Test exact de Fisher ; probabilité bilatérale = 0,0125 ; tableaux XVI, XVIII, XIX).

Tableau XVIII : Association entre la détection d'ADN de filaires (ADNr *12S* et *cox1*) et l'infection par les nématodes gastro-intestinaux (*ITS2*)

Espèces de PNH	N. d'échantillion analysé	*12S*/*cox1* pos/*ITS2neg*	*12S*/*cox1* pos/*ITS2pos*	*12S*/*cox1* neg/*ITS2neg*	*12S*/*cox1* neg/*ITS2pos*
Cercopithecus nictitans	4	0	3	1	0
Cercocebus torquatus/agilis	12	0	1	5	6
Pan troglodytes	222	15	70	26	111
Gorilla gorilla	65	0	30	7	28
Mandrillus sphinx	12	0	2	4	6
Total	315	15	106	43	151

Abbréviations : neg. Negatif ; pos. Positif

Tableau XIX : Tableau de contingence des coinfections et résultat du test exact de Fisher (test bilatéral)

Espèces de PNH	A B	C D	*P*
***Cercopithecus* sp./*Cercocebus* sp.**	0	4	0,233
	6	6	
Pan troglodytes	15	70	0,860
	26	111	
Gorilla gorilla	0	30	0,0125
	7	28	
Mandrillus sphinx	0	2	0,515
	4	6	
Total	15	106	0,036
	43	151	

Abréviations : A, positif pour les filaires et négatif pour les GH ; B, négatif pour les filaires et négatif pour les GH ; C, positif pour les filaires et positif pour les GH ; D, négatif pour les filaires et positif pour les GH.

Chapitre V : Discussion

Chapitre V : Discussion

Les zoonoses constituent une menace sérieuse pour la santé publique et la conservation des animaux. Le risque de transmission zoonotique de maladies virales, bactériennes, fongiques et parasitaires est élevé entre les humains et les PNH, et en particulier avec les grands singes avec lesquels l'étroite relation phylogénétique avec l'homme entraîne un potentiel élevé d'échange de microorganismes [5, 33].

5.1 Prévalence des infections par *Trichuris* sp., *Ascaris lumbricoides, Necator* sp. et *Oesophagostomum sp.*

La première partie de cette thèse à consisté à déterminer la prévalence et la diversité génétique des GH *(Trichuris, Ascaris, Necator* et *Oesophagostomum)* chez les PNH vivant dans les forêts entourant des villages au Cameroun et au Gabon. Outre les chimpanzés et les gorilles, nous avons recherché la présence de ces GH chez quatre autres espèces de PNH : les mangabeys agiles, les mangabeys à collier blanc, les mandrills, et les cercopithèques hocheurs.

Nous avons observé des prévalences élevées pour *Oesophagostomum* et *Necator* chez les gorilles et les chimpanzés. Le taux d'infection par *Trichuris* était faible et nous n'avons pas détecté d'*Ascaris* dans nos échantillons. Des prévalences similaires pour *Necator* et *Oesophagostomum* ont été obtenues chez des gorilles en liberté dans les aires protégées de Dzanga Sangha, en RCA et au PN de Moukalaba-Doudou au Gabon [90, 111]. Au Gabon et au Rwanda, *Trichuris* et *Ascaris* ont été détectés chez des gorilles, mais à de très faibles prévalences [110, 111]. Des prévalences relativement élevées d'infection par *Necator* et *Oesophagostomum* ont été rapportées chez des chimpanzés vivant dans des forêts primaires et secondaires des régions de la Lopé au Gabon [66], de Dzanga-Ndoki en RCA [31], de Budongo [191], Sebitoli [36], Kibale [61, 77, 101] et Bulindi [23, 28] en Ouganda, et de Gombe [26, 27] et Mahale [192] en Tanzanie. Tel n'est pas le cas chez des chimpanzés vivant dans des habitats de savane sèche, où les conditions de survie et de transmission des parasites à stades libres sont plus difficiles [31, 193]. Des infections par *Trichuris* et *Ascaris* ont été détectées à de faibles prévalences (moins de 10%) dans plusieurs études [26, 31, 66, 77, 89, 98, 112], à l'exception de chimpanzés à Mahale en Tanzanie [191] et de chimpanzés du PN de Cantanhez en République de Guinée Bissau [100]. Cependant, les approches diagnostiques (microscopie et analyses moléculaires) utilisées étant différentes, les études ne sont pas tout à fait comparables, et il est difficile d'interpréter les différences significatives de prévalence observées entre les études et entre les espèces de PNH.

Nous avons détecté *Oesophagostomum* chez toutes les autres espèces de PNH, à l'exception des cercopithèques hocheurs, tandis que *Necator* a été détecté chez les cercopithèques hocheurs et les deux espèces de mangabey, mais pas chez les mandrills. Comme nous n'avons analysé qu'un nombre limité d'échantillons provenant de ces espèces de PNH, nous n'avons pas été en mesure de comparer nos résultats avec ceux d'études publiées précédemment, et nous n'avons donc pas pu déterminer si les singes arboricoles sont moins exposés aux larves ou aux œufs infectieux que les PNH plus terrestres. Parmi les espèces de PNH que nous avons étudiées, seuls les cercopithèques hocheurs sont presque exclusivement arboricoles. Tous les autres sont semi-terrestres, à des degrés différents [194, 195], les gorilles étant principalement terrestres. Des études antérieures ont rapporté une prévalence d'*Oesophagostomum* de 41% chez les singes colobes rouges (*Piliocolobus*) arboricoles et de 100% chez les chimpanzés vivant en sympatrie avec les premiers dans le PN de Kibale, en Ouganda [65]. Mais d'autres facteurs (proximité phylogénétique, structure sociale et interactions, co-infection avec d'autres parasites, etc.) peuvent concourir à déterminer la susceptibilité à l'infection, comme l'indique l'étude menée dans le PN des montagnes Mahale, en Tanzanie, où *Oesophagostomum* était présent chez toutes les espèces de PNH examinées, mais où la prévalence était plus élevée chez les singes à queue rouge (*Cercopithecus ascanius*) et les colobes rouges arboricoles que chez les babouins [96].

5.2 Prévalence des infections par *Oesophagostomum* sp. et *Necator* sp. en fonction du sexe des PNH

Pour ce qui est de l'influence du sexe sur le risque d'infection, nous n'avons pas observé de différence entre les sexes dans la prévalence d'*Oesophagostomum* sp. et de *Necator* sp. chez les chimpanzés. Nos résultats corroborent ceux d'autres études épidémiologiques menées sur des PNH sauvages [2, 26, 77, 90, 101]. Cependant, les différences entre les sexes en matière d'infection parasitaire sont couramment observées chez de nombreux animaux [196] et peuvent fluctuer en fonction des saisons. La reproduction, la saison de chasse et la défense du territoire, par exemple peuvent augmenter le stress et avoir un impact sur le niveau d'immunité et sur la susceptibilité aux infections parasitaires [196–198].

5.3 Prévalence des infections par les géohelminthes en fonction des sites d'études

Dans nos sites d'étude au Cameroun et au Gabon, les PNH vivent dans des forêts dégradées à proximité de plantations ou d'exploitations agricoles, et des habitations. Même les parcs nationaux luttent pour limiter les activités humaines telles que l'extraction du bois, l'exploitation des ressources non ligneuses et la chasse. Dans le PN de Lobéké, par exemple, 443.825 hectares sont réservés à la chasse sportive, 271.945 hectares à la chasse gérée par la communauté [199]

et le peuple BaAka est autorisé à aller dans le parc pour pêcher et récolter des produits forestiers non ligneux. Somalomo, une petite ville (1000 habitants) située dans la région de l'Est du Cameroun, près de la frontière avec les régions du Centre et du Sud, à la limite de la réserve de faune du Dja, était le site présentant le taux d'infection le plus élevé pour *Oesophagostomum* et *Necator* chez les chimpanzés et les gorilles. Malgré la pression anthropique exercée sur tous les territoires, nous n'avons pas trouvé un seul PNH infecté par *N. americanus*, un parasite humain typique. Cependant, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que *N. americanus* soit présent dans notre population d'étude. Une approche NGS pourrait permettre de détecter les co-infections avec différentes espèces de *Necator* mais aussi améliorer la qualité des séquences obtenues. Des cas possibles de transmission zoonotique de *N. americanus* ont été précédemment rapportés chez des gorilles, des chimpanzés et d'autres PNH [131, 200–202]. Hasegawa *et al.* [72] ont fourni la première preuve moléculaire que *N. americanus* parasite les gorilles sauvages des plaines, mais à une prévalence beaucoup plus faible que celle rapportée chez l'homme ; c'est également la première étude à rapporter de cas d'infections humaines par des espèces de *Necator* autres que *N. americanus*. Ils ont proposé que les vers identifiés avec le *cox1* des groupes B ou C (et *ITS* types II ou III) sont des espèces distinctes de *N. americanus* et ont conclu que les larves infectieuses examinées correspondaient à d'autres ankylostomes précédemment décrits chez les grands singes, tels *N. congolensis*, *N. exilidens* ou *N. gorillae* [203, 204]. Les *Necator* que nous avons détectés appartiennent clairement au type II et un spécimen appartient aussi probablement à l'espèce de type III. Le *Necator* de type II a été détecté dans un échantillon de mangabey agile à Mambélé, ce qui élargit le spectre des hôtes aux singes cercopithèques.

5.4 Analyses phylogénétiques des séquences d'ADN d'*Oesophagostomum* sp.

Les analyses phylogénétiques des séquences d'*Oesophagostomum* nous ont permis d'obtenir un arbre avec trois clades différents représentant probablement trois espèces distinctes infectant les PNH étudiés. La majorité de nos séquences appartenaient à neuf haplotypes (OH1-OH8, plus OH16), regroupés avec *O. stephanostomum*. *O. stephanostomum* a été détecté chez les gorilles et les chimpanzés sur tous les sites d'étude dans la plupart des échantillons testés. Il a en outre été detecté dans deux échantillons de mangabey agile de Mambélé. Au sein des sites d'étude, nous avons constaté un partage apparent de certains haplotypes entre les PNH, en particulier OH1, qui a été détecté chez toutes les espèces de PNH et dans tous les sites d'étude. D'autre part, certains haplotypes pourraient être spécifiques à un site ou à un hôte (par exemple,

OH16 a été trouvé uniquement au Gabon, OH7 et OH8 uniquement chez les gorilles, et OH5 uniquement chez les chimpanzés).

Nos résultats confirment qu'*O. stephanostomum* prédomine chez les grands singes [28, 36, 65, 101, 205]. Cette espèce semble être spécifique aux PNH, car des études menées au Gabon, en RDC et en RCA n'ont pas trouvé d'infections par *O. stephanostomum* chez les humains vivant en sympatrie avec des populations infectées de chimpanzés ou de gorilles [90, 111, 206], bien qu'une certaine transmission zoonotique soit possible, comme le montre une étude réalisée en Ouganda [36].

Un deuxième clade se regroupant avec *O. bifurcum* comprenait quatre haplotypes (OH9-12) détectés chez des chimpanzés et un mangabey à collier blanc sur trois sites d'étude au Cameroun. L'haplotype OH9 a été trouvé sur les trois sites chez les deux espèces hôtes. Contrairement à *O. stephanostomum*, l'infection humaine par *O. bifurcum* est bien documentée, mais les cas notifiés sont principalement limités au nord du Togo et du Ghana [74]. Ce parasite a un potentiel zoonotique, comme le prouve la sensibilité des singes rhésus à l'infection par *O. bifurcum* isolée chez l'homme, bien qu'à des niveaux faibles [207]. Il est intéressant de noter que des études menées dans le PN de Kibale en Ouganda [36, 65] montrent la transmission d'*O. stephanostomum* et d'une espèce indéterminée d'*Oesophagostomum* entre des PNH et des humains vivant en sympatrie, alors qu'aucun *O. bifurcum* n'a été trouvé chez les humains. Nous n'avons pas détecté *O. bifurcum* dans nos échantillons provenant de gorilles, ce qui corrobore une étude antérieure du Gabon, où une seule population d'*O. stephanostomum*, avec des variations moléculaires notables, était prévalente chez les gorilles des plaines [111]. Des études antérieures montrent qu'*O. bifurcum* est rarement trouvé chez les grands singes, mais commun chez d'autres espèces de PNH [28]. Une étude menée en RCA a rapporté une forte prévalence de ce strongylidé chez les mangabeys mais une faible abondance chez les gorilles et les chimpanzés [90]. Des infections mixtes par *O. stephanostomum* et *O. bifurcum* ont été rapportées chez des chimpanzés dans le PN de Bulindi et dans le PN de Kibale [28, 36, 101]. Dans nos échantillons, nous n'avons pas détecté une telle co-infection.

Enfin, nos haplotypes OH13-OH15, trouvés chez des mandrills de Djoum et chez un mangabey à tête rouge de Somalomo, au Cameroun, se sont regroupés avec des *Oesophagostomum* sp. Ces haplotypes représentent probablement une espèce distincte, et se regroupent avec des séquences échantillonnées dans une étude de Kibale, en Ouganda, où cette souche d'*Oesophagostomum* sp., partagée par différents singes cercopithèques et des humains, a été signalée pour la première fois [65]. Des études supplémentaires sont nécessaires pour clarifier

la relation phylogénétique entre les espèces d'*Oesophagostomum* infectant les humains et les PNH africains.

Quatre séquences, provenant d'un chimpanzé et d'un cercopithèque hocheur de Mambélé, et deux échantillons de cercopithèque hocheur de Somalomo, au Cameroun, correspondaient à une séquence de *Ternidens deminutus*. Des infections par *Ternidens* ont été signalées chez des petits singes, des chimpanzés, des gorilles et des babouins dans toute l'Afrique subsaharienne et en Asie [90, 208]. Des cas d'infection chez l'homme ont été rapportés de RDC, de Tanzanie, et de plusieurs pays d'Afrique australe (276). On pense que *T. deminutus* est un parasite acquis à partir de PNH, bien qu'une transmission de l'homme vers les populations de singes puisse également se produire dans certaines régions [209]. La présence possible de plusieurs espèces cryptiques a été suggérée, avec un haplotype du parasite spécifique à l'homme existant à côté de plusieurs génotypes spécifiques aux PNH. Cette théorie est soutenue par le fait que chez *O. bifurcum*, une espèce génétiquement proche de *T. deminutus*, il existe des haplotypes spécifiques de deux espèces de primates, ainsi qu'un haplotype spécifique à l'homme [210]. L'infection par *T. deminutus* entraîne le plus souvent un tableau clinique similaire à celui de l'oesophagostomiase, avec présence d'abcès intestinaux au niveau des nodules ou des helminthomes du gros intestin [209].

5.5 Coinfection *Oesophagostomum* et *Necator*

Enfin, nous avons trouvé des preuves d'une surabondance significative de co-infections par *Oesophagostomum* et *Necator*, ce qui corrobore les observations précédentes de co-infections chez les chimpanzés en Ouganda [23, 90]. De fait, cette coinfection parasitaire semble être commune à de nombreuses espèces d'hôtes [211, 212]. Par ailleurs, nos résultats pourraient avoir sous-estimé le nombre réel de coinfections parce que la PCR conventionnelle suivie du séquençage Sanger comporte des limites si l'on veut distinguer plusieurs espèces ou lignées de strongles présentes dans un échantillon donné. Le faible taux de séquences de haute qualité que nous avons obtenu peut également s'expliquer par la présence de co-infections dans les échantillons analysés.

Parmi les 315 échantillons testés, seuls quatre (un gorille, deux chimpanzés et un cercopithèque hocheur) étaient positifs pour *Trichuris* sp. Trois séquences étaient exploitables et se sont regroupées avec *T. trichiura* et *Trichuris* sp. provenant d'humains et d'autres PNH. La faible prévalence de *Trichuris* est comparable à celle detectée chez les chimpanzés dans de nombreuses autres localités [25, 66, 98, 213]. Cependant, quelques études ont rapporté des

prévalences élevées chez des chimpanzés du Parc National de Cantanhez en Guinée-Bissau (prévalence de 15%) et du Mont Assirik au Sénégal (prévalence de 50%) [88, 100]. D'autres études avaient pour principal objectif d'investiguer la diversité génétique de ce nématode, le plus souvent chez des PNH maintenus en captivité et quelques autres ont rapporté une faible prévalence dans les populations de PNH sauvages [35, 103, 214, 215]. Pendant longtemps, *T. trichiura* a été décrit comme une espèce à faible spécificité d'hôte, infectant aussi bien les humains que les PNH. Des études récentes ont mis en évidence l'existence de multiples lignées, probablement des espèces cryptiques, de *Trichuris* qui semblent être plus spécifiques à l'hôte qu'attendu [216]. De plus, deux espèces de *Trichuris* ont été récemment décrites chez les PNH, à savoir *T. colobae* de *Colobus guereza kikuyensis* [63] et *T. ursinus* de *Papio ursinus* [217].

Nous n'avons détecté aucune infection par *Ascaris* sp. dans les échantillons de PNH sauvages analysés, ce qui corrobore les résultats de travaux antérieurs. Les nématodes du genre *Ascaris* sont fréquemment trouvés chez les chimpanzés maintenus en captivité mais sont rarement observés chez leurs homologues sauvages [38, 69]. Dans l'ensemble, les parasites tels que *Trichuris* et *Ascaris* semblent être absents (ou présents à de faibles prévalences) dans la nature, contrairement à ce qui a été observé chez les gorilles en captivité, tant dans les zoos que dans les sanctuaires [218].

5.6 Détection de l'ADN de filaires du genre *Mansonella* dans les matières fécales

Nous nous sommes intéressés dans la deuxième partie de cette thèse à évaluer la possibilité de détecter de l'ADN de filaires du genre *Mansonella* dans les extraits fécaux de gorilles, de chimpanzés, de mandrills, de mangabeys à collier blanc, de mangabeys agiles et de cercopithèques hocheurs du Cameroun et du Gabon. Pour cela, nous avons analysé 315 échantillons, dont 121 (38,4%) présentaient des séquences ayant une homologie supérieure à 90% avec les séquences de référence d'Onchocercidae. Nous pensons que notre prévalence est inférieure aux taux d'infection réels, car la détection des filaires dans les échantillons fécaux est probablement moins sensible que la détection dans le sang. Nous avons ensuite réalisé des PCR en ciblant des fragments de l'ADN ribosomal *12S* et de la *cox1*, suivi d'un séquençage de Sanger pour l'identification précise des espèces de filaire. Les séquences obtenues nous ont permis de reconstruire l'histoire évolutive des filaires trouvées dans les fèces de ces PNH, et de comparer leur proximité phylogénétique avec des séquences d'ADN de *M. perstans* identifiées chez des patients.

5.7 Analyses phylogénétiques des séquences d'ADN de filaires du genre *Mansonella* détecté chez les PNH

Les analyses phylogénétiques des séquences *cox1* obtenues à partir de cinq échantillons fécaux d'ADN de chimpanzés du Gabon et deux du Cameroun montrent que ces échantillons se regroupent avec *M. perstans* avec une grande robustesse. La plupart des séquences restantes se sont regroupées avec des filaires du genre *Mansonella*, mais l'espèce n'a pas pu être identifiée. Nos résultats constituent une avancée dans la description de ces filaires, parce que la majorité des études sur les filaires infectant les PNH se limitent à des descriptions morphologiques et les analyses taxonomiques au niveau moléculaire font défaut. Chez les PNH sauvages, des filaires adultes ont été retrouvées dans les vaisseaux lymphatiques lors d'autopsies, mais ces découvertes restent rares [219]. En raison de leur localisation dans les tissus de l'hôte, les stades adultes de *Mansonella* sont difficiles à collecter et la diversité dans ce genre est loin d'être bien étudiée chez l'animal. Jusqu'à présent, sept espèces de *Mansonella* (*M. perstans*, *M. streptocerca*, *M. leopoldi*, *M. lopeensis*, *M. rodhaini*, *M. gorillae* et *M. vanhoofi*) ont été décrites chez les PNH et les hommes en Afrique, sur la base de caractéristiques morphologiques uniquement. Compte tenu de la difficulté à récupérer les filaires adultes chez les PNH, des approches indirectes ciblant l'ADN des mcricrofilaires pourraient être utiles pour leur identification [220, 221].

Nos analyses phylogénétiques du *cox1* étaient plus informatives que celles avec l'ADNr *12S*, avec des fragments de séquences de 480 et 280 pb, respectivement. Nous avons trouvé *M. perstans* dans sept échantillons de chimpanzés, un chez l'homme, tandis que 29 échantillons de chimpanzés et 21 de gorilles étaient infectés par une *Mansonella* sp. formant un groupe séparé dans l'arbre phylogénétique obtenu avec le *cox1*. La méthode de séquençage de Sanger que nous avons adoptée ne nous a pas permis de déterminer si plusieurs espèces de *Mansonella* coexistaient chez un individu donné. Dans une étude antérieure, quatre espèces de *Mansonella* ont été identifiées, sur des critères morphologiques, chez un gorille mâle trouvé mort dans la réserve de la Lopé, au Gabon [219]. Chez cet animal, des vers femelles de deux espèces de *Mansonella* (*M. lopeensis* et *Mansonella* sp.) ont été extraits des tissus de la cuisse blessée, une microfilaire de *M. leopoldi* a été trouvée dans les vaisseaux sanguins du foie, et un adulte mâle de *Mansonella* sp. a été trouvé dans un vaisseau lymphatique afférent d'un ganglion lymphatique axillaire. Les études futures utilisant le séquençage à haut débit (NGS) pourraient augmenter la sensibilité de détection des *Mansonella* sp., mais aussi permettre une identification précise des variants dans ce genre.

Nous avons effectué des analyses phylogénétiques avec 41 génomes de filaires. L'arbre phylogénétique obtenu comprenait 11 des 14 séquences assemblées. Cependant, aucun alignement de genomes de *Mansonella* sp. est encore disponible [222]. Des arbres phylogénétiques ont été construits à partir de séquences du génome mitochondrial de filaires [223, 224], corroborant les clades décrits par Lefoulon *et al*. [225] et la présence de *Mansonella* sp. dans le clade ONC5, qui inclut aussi, entre autres, les filaires des genres *Wuchereria*, *Brugia* et *Loa*. Il est donc crucial, dans les études à venir, d'adopter l'approche NGS pour identifier toutes les espèces de *Mansonella* sp. et détecter des infections mixtes avec plusieurs espèces de filaires. Ces nouvelles approches moléculaires permettront de corriger les erreurs d'identification commises par les méthodes traditionnelles de diagnostic [224].

5.8 Détection d'ADN de filaires du genre *Mansonella* et co-infection avec *Oesophagostomum* sp., *Necator* sp

Le dernier point de cette partie de ma thèse a été de chercher à savoir si la présence d'ADN de filaire dans les fèces était associée à une co-infection avec des nématodes intestinaux, notamment des ankylostomes, étant donné que ces GH peuvent causer d'importantes lésions lorsque les adultes se fixent sur la muqueuse intestinale et lorsqu'ils se nourrissent [226]. Bien qu'aucune association n'ait été trouvée entre les infections par des strongles et la détection de *Plasmodium* sp. dans les fèces des gorilles et de chimpanzés [65], nous avons pensé que leur présence, et les saignements qu'ils provoquent dans l'intestin, seraient une explication plausible de la détection d'ADN filarien dans les fèces des PNH. Nous avons donc effectué des PCR nichées ciblant l'*ITS2* afin de rechercher la présence d'infections par *Oesophagostomum* sp. et *Necator* sp. afin de déduire s'il y a une association positive entre ces GH et la présence d'ADN de *Mansonella* dans les fèces. Les adultes de *M. perstans* se trouvent principalement dans les cavités séreuses, le tissu adipeux viscéral ou le tissu sous-cutané et les microfilaires circulent dans le sang et le système lymphatique [124]. La détection de fragments d'ADN filarien dans des échantillons fécaux peut donc sembler surprenante. Cependant, des etudes precedentes ont montré que les parasites adultes se trouvent souvent dans les mésentères et les tissus conjonctifs des organes abdominaux des humains, des gorilles et des chimpanzés [221, 227–230].

Dans notre étude, la détection d'ADN de *Mansonella* sp. dans les échantillons fécaux ne semble pas être associée à la présence de GH tels qu'*Oesophagostomum* sp. ou *Necator* sp., sauf peut-être chez les gorilles que nous avons analysés. La pathogénie et la perte de sang associées à *Necator* sp. dépend fortement du nombre de vers adultes, de l'immunité de l'hôte et des infections concomitantes avec d'autres nématodes [231]. Pour estimer correctement l'intensité

de l'infection avec une espèce de parasite gastro-intestinal particulière, il est nécessaire de collecter les parasites adultes dans les intestins des hôtes infectés. Pour ce faire, des techniques relativement invasives doivent être utilisées, ce qui est impossible chez les animaux sauvages menacés comme les singes, à moins de pouvoir effectuer des autopsies d'animaux morts. Notons que les infections par *Oesophagostomum* ne sont généralement pas associées à des saignements intestinaux, bien qu'une étude rapporte des saignements rectaux dus à *O. brumpti* chez un individu humain [232] et qu'une autre étude a rapporté des perforations intestinales dans des cas sévères d'oesophagostomiase chez les gorilles [233]. Malheureusement, les données sur les manifestations cliniques et la pathogénie des infections par les strongles chez les PNH sauvages sont rares [129]. Il reste donc difficile de tirer des conclusions quant à l'association observée entre infection par GH et présence d'ADN de filaires dans les fèces des gorilles. Des études portant sur les propriétés phytochimiques et mécaniques des plantes consommées par les PNH suggèrent l'existence de propriétés abrasives de certains feuillages [129], qui pourraient favoriser le saignement de la paroi intestinale et le passage de microfilaires dans la lumière intestinale [213]. Enfin, nous ne pouvons pas exclure que la détection de l'ADN de filaires dans les échantillons fécaux puisse s'expliquer par la présence d'ADN libre circulant (cell-free DNA, cfDNA). Les cfDNA sont des fragments d'ADN extracellulaires trouvés dans la circulation sanguine mais également dans différents fluides corporels et tissus. Bien que différentes hypothèses aient été présentées, l'origine précise du cfDNA et son mode de distribution doivent être clarifiés [234, 235].

Pendant l'analyse de nos séquences, nous avons également détecté le nématode spiruridé *Protospirura muricola* dans des échantillons de gorilles et de cercopithèques hocheurs. Des œufs et des fragments de la partie postérieure du corps d'un mâle adulte de *P. muricola* ont été trouvés dans les échantillons fécaux de chimpanzés [99]. *P. muricola* est un parasite relativement fréquent des rongeurs en Afrique et en Asie [236–239]. Les adultes se trouvent dans l'estomac des hôtes définitifs [240]. Des insectes de l'ordre des Dermaptères (qui comprend les forficules ou « perce-oreilles ») et très probablement aussi des scarabées sont des hôtes intermédiaires du nématode [241]. Par conséquent, nous ne pouvons pas exclure avec certitude que ces échantillons fécaux, posés sur le sol avant la collecte, aient pu être contaminés par des *P. muricola* infectant les bousiers (Scarabeidae) ou par des fèces de rongeurs. Cependant, ce parasite a été précédemment décrit également chez des PNH sauvages du Nigéria [237] et du Congo [242], chez des chimpanzés réintroduits en Tanzanie [99] et chez des PNH en captivité d'Amérique du Sud [201, 243]. Bien que *P. muricola* semble être un parasite

relativement non pathogène chez les rongeurs, il provoque des maladies graves, parfois mortelles, chez les primates en captivité. La pathogénicité du nématode chez les chimpanzés ou les gorilles sauvages reste inconnue et ce parasite n'a pas été rapporté chez l'homme.

Chapitre VI : Conclusion

Chapitre VI : Conclusions

Dans notre étude, nous avons montré pour la première fois que l'ADN extrait de matières fécales de PNH peut être utilisé pour diagnostiquer les infections à *Mansonella*. Ces résultats apportent de nouvelles perspectives pour le diagnostic d'infections par des filaires de la famille des Onchocercidae, utilisant d'autres produits biologiques que le sang et les tissus cutanés. L'utilisation de prélèvements obtenus de manière non invasive, combinée aux techniques de biologie moléculaire, permettrait d'étudier ces agents pathogènes dans des populations d'animaux sauvages inaccessibles. Cette méthode non invasive pourrait être testée comme un moyen alternatif d'obtention d'échantillons biologiques à des fins diagnostiques chez l'homme. Nous avons pu montrer l'abondance mais aussi l'existence d'une diversité des *Mansonella* chez des PNH sauvages, qui pourraient jouer le rôle de réservoir selvatique de ces parasites. Comme d'autres agents pathogènes qui franchissent la barrière des espèces, la propagation de filarioses zoonotiques semble possible et pourrait augmenter [244], en particulier compte-tenu de la proximité croissante entre les humains et les animaux sauvages.

Nous avons apporté également de nouvelles informations sur la prévalence et la diversité génétique des GH infectant six espèces différentes de PNH au Cameroun et au Gabon, où les hommes vivent de plus en plus en contact et à proximité de la faune sauvage. Il est donc nécessaire de connaitre le potentiel zoonotique et la dynamique de partage des parasites entre les humains et les PNH. D'une part, l'existence d'un réservoir sylvatique inconnu de GH pourrait maintenir ou augmenter le risque d'infection, en particulier parmi les populations humaines vivant à proximité des PNH ; d'autre part, la présence de populations humaines à proximité des parcs ou vivant en lisière de forêt pourrait constituer une menace pour la santé des PNH en raison de la transmission d'espèces de GH n'ayant pas de spécificité d'hôte.

Pour atteindre nos objectifs, nous avons utilisé des techniques de biologie moléculaire, qui sont plus sensibles dans l'identification des espèces que la microscopie, en particulier quand l'intensité d'infection est faible [140, 245]. S'il est vrai que les techniques de biologie moléculaire actuelles ciblant les séquences ribosomales et mitochondriales ont considérablement amélioré la sensibilité de la détection des GH, certains marqueurs moléculaires manquent souvent de la spécificité nécessaire pour faire la différence entre des espèces de GH appartenant au même genre, ce qui est crucial dans les études sur le partage des parasites entre différentes espèces d'hôtes. Les progrès récents que connait la biologie moléculaire, notamment le séquençage du genome complet, basés sur le séquençage de nouvelle génération applicable aux parasites des primates [109, 114, 160] permettraient d'identifier et de

décrire des espèces cryptiques. Pour démontrer les similitudes et les différences entre les GH infectant les humains et les PNH, les prochaines études devront procéder au séquençage complet des parasites humains et des parasites de PNH.

L'importance croissante de l'élevage intensif et des pratiques agricoles, tout en menaçant la biodiversité, mettent de plus en plus en danger la santé humaine et animale. Les prochaines études doivent être élargies, non seulement aux animaux domestiques, mais aussi à la population humaine vivant en bordure des parcs au Cameroun et au Gabon. Cela permettra une meilleure compréhension de l'épidémiologie, de la diversité génétique et du potentiel zoonotique des GH.

Au regard de nos résultats, il est important de protéger les PNH des conséquences de l'anthropisation de leur habitat naturel par la création d'aires protégées afin de conserver les habitats naturels des grands primates et assurer leur survie dans l'environnement [246]. En plus des aires protégées, les partenariats entre gouvernements et organismes à but non lucratif contribuent à bien encadrer les efforts de conservation des PNH [247]. L'adoption de plans d'action régionaux développés par les pays des aires de distribution géographique des PNH permet d'organiser des stratégies de conservation à plus petite échelle afin de réduire les menaces anthropiques dans les espaces naturels des PNH [248]. La création d'activités génératrices de revenu au profit des populations par le biais d'activités d'écotourisme telles que le reboisement et les excursions, la construction d'infrastructures adéquates et équipées permettront d'éviter la fragmentation des espaces naturels [249].
Pour freiner la perte de la biodiversité, des programmes réguliers d'éducation à la conservation devraient être mis en place afin de bien sensibiliser la population à la conservation des PNH, au coût qu'entraînerait leur perte pour la santé des écosystèmes et pour la société humaine. Les problèmes de conservation des PNH ne pourront être résolus sans la participation des populations locales. Conscient de cette évidence, nous avons en perspective de retourner sur les sites de prélèvement pour la restitution de nos résultats, mais aussi de mener des campagnes de sensibilisation au profit des populations vivant autour des parcs sur les dangers que représentent la perte de la biodiversité en particulier celle des PNH.

References

[1] Chapman CA, Peres CA. Primate conservation in the new millennium: The role of scientists. *Evolutionary Anthropology* 2001; 10: 16–33.

[2] Gillespie ATR, Greiner EC, Chapman CA, et al. Gastrointestinal parasites of the *Colobus* monkeys of Uganda. *J Parasitol* 2005; 91: 569–573.

[3] Zamedjo Y. Gestion décentralisée des ressources forestières au Cameroun: cas de la forêt communale de Djoum. *Université de Dschang - Ingénieur des eaux, forêt et chasses 2011*.

[4] Toft JD. The pathoparasitology of the alimentary tract and pancreas of nonhuman primates: A review. *Veterinary Pathology* 1982; 19: 44–92.

[5] Calvignac-Spencer S, Leendertz SAJ, Gillespie TR, et al. Wild great apes as sentinels and sources of infectious disease. *Clinical Microbiology and Infection* 2012; 18: 521–527.

[6] Homsy J. Ape tourism and human diseases : How close should we get?, http://static1.1.sqspcdn.com/static/f/1200343/21170419/1354662194597/Homsy.pdf?token=JwLVjdUWYZC3uGP3wI9g2U9EcGY%3D (1999, accessed July 19, 2021).

[7] The Mountain Gorilla Veterinary Project 2002 Employee Health Group. Risk of Disease Transmission between Conservation Personnel and the Mountain Gorillas: Results from an Employee Health Program in Rwanda. *EcoHealth*; 1. Epub ahead of print December 6, 2004. DOI: 10.1007/s10393-004-0116-4.

[8] Cooper N, Griffin R, Franz M, et al. Phylogenetic host specificity and understanding parasite sharing in primates. *Ecology Letters* 2012; 15: 1370–1377.

[9] Krief S, Escalante AA, Pacheco MA, et al. On the diversity of malaria parasites in African apes and the origin of *Plasmodium falciparum* from bonobos. *PLoS Pathogens*; 6. Epub ahead of print 2010. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000765.

[10] Pacheco MA, Cranfield M, Cameron K, et al. Malarial parasite diversity in chimpanzees: The value of comparative approaches to ascertain the evolution of *Plasmodium falciparum* antigens. *Malaria Journal* 2013; 12: 1–20.

[11] Prugnolle F, Durand P, Neel C, et al. African great apes are natural hosts of multiple related malaria species, including *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010; 107: 1458–1463.

[12] Sundararaman SA, Liu W, Keele BF, et al. *Plasmodium falciparum*-like parasites infecting wild apes in southern Cameroon do not represent a recurrent source of human malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2013; 110: 7020–7025.

[13] Liu W, Li Y, Learn GH, et al. Origin of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in gorillas. *Nature* 2010; 467: 420–425.

[14] Faust C, Dobson AP. Primate malarias: Diversity, distribution and insights for zoonotic *Plasmodium*. *One Health*; 1. Epub ahead of print December 2015. DOI: 10.1016/j.onehlt.2015.10.001.

[15] Prugnolle F, Rougeron V, Becquart P, et al. Diversity, host switching and evolution of *Plasmodium vivax* infecting African great apes. DOI: 10.1073/pnas.1306004110.

[16] Duval L, Nerrienet E, Rousset D, et al. Chimpanzee Malaria Parasites Related to *Plasmodium ovale* in Africa. Epub ahead of print 2009. DOI: 10.1371/journal.pone.0005520.

[17] Toft Ii JD, Eberhard ML. *Chapter 3 - Parasitic Diseases*. 1998.

[18] CDC. Mansonellosis. *https://www.cdc.gov/dpdx/mansonellosis/index.html (accessed on 30 November 2020)*.

[19] Mourembou G, Fenollar F, Lekana-Douki JB, et al. *Mansonella*, including a Potential New Species, as Common Parasites in Children in Gabon. Epub ahead of print 2015. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004155.

[20] Lowrie RC, Tidwell M, Orihel TC, et al. Susceptibility of Laboratory Primates to Infection with *Mansonella Ozzardi* from Man *. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*; 30. Epub ahead of print July 1, 1981. DOI: 10.4269/ajtmh.1981.30.790.

[21] Jones KE, Patel NG, Levy MA, et al. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 2008; 451: 990–993.

[22] Zommers Z, Macdonald DW, Johnson PJ, et al. Impact of human activities on chimpanzee ground use and parasitism (*Pan troglodytes*). *Conservation Letters* 2013; 6: 264–273.

[23] McLennan MR, Hasegawa H, Bardi M, et al. Gastrointestinal parasite infections and selfmedication in wild chimpanzees surviving in degraded forest fragments within an agricultural landscape mosaic in Uganda. *PLoS ONE* 2017; 12: 1–29.

[24] Muehlenbein MP. Intestinal parasite infections and fecal steroid levels in wild chimpanzees. *American Journal of Physical Anthropology* 2006; 130: 546–550.

[25] Muehlenbein MP. Parasitological analyses of the male chimpanzees (*Pan troglodytes schweinfurthii*) at Ngogo, Kibale National Park, Uganda. *American Journal of Primatology*; 65. Epub ahead of print February 2005. DOI: 10.1002/ajp.20106.

[26] Gillespie TR, Lonsdorf E v, Canfield EP, et al. Demographic and ecological effects on patterns of parasitism in eastern chimpanzees (*Pan troglodytes schweinfurthii*) in Gombe National Park , Tanzania. *American Journal of Physical Anthropology* 2010; 544: 534–544.

[27] Bakuza JS, Nkwengulila G. Variation over time in parasite prevalence among free-ranging chimpanzees at Gombe National Park, Tanzania. *International Journal of Primatology* 2009; 30: 43–53.

[28] Ota N, Hasegawa H, McLennan MR, et al. Molecular identification of *oesophagostomum* spp. from 'village' chimpanzees in uganda and their phylogenetic relationship with those of other primates. *Royal Society Open Science*; 2. Epub ahead of print 2015. DOI: 10.1098/rsos.150471.

[29] Klein SL. The effects of hormones on sex differences in infection: From genes to behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2000; 24: 627–638.

[30] Grear DA, Perkins SE, Hudson PJ. Does elevated testosterone result in increased exposure and transmission of parasites? *Ecology Letters* 2009; 12: 528–537.

[31] Lilly AA, Mehlman PT, Doran D. Intestinal parasites in gorillas, chimpanzees, and humans at Mondika research site, dzanga-ndoki national park, Central African Republic. *International Journal of Primatology* 2002; 23: 555–573.

[32] Hussain AI, Shanmugam V, Bhullar VB, et al. Screening for simian foamy virus infection by using a combined antigen Western blot assay: Evidence for a wide distribution among Old World primates and identification of four new divergent viruses. *Virology* 2003; 309: 248–257.

[33] Wolfe ND, Dunavan CP, Diamond J. Origins of major human infectious diseases. *Nature* 2007; 447: 279–283.

[34] Rolland RM, Hausfater G, Marshall B, et al. Antibiotic-resistant bacteria in wild primates: Increased prevalence in baboons feeding on human refuse. *Applied and Environmental Microbiology* 1985; 49: 791–794.

[35] Ravasi DF, O'Riain MJ, Davids F, et al. Phylogenetic evidence that two distinct *trichuris* genotypes infect both humans and non-human primates. *PLoS ONE*; 7. Epub ahead of print 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0044187.

[36] Cibot M, Guillot J, Lafosse S, et al. Nodular worm infections in wild non-human primates and humans living in the sebitoli area (Kibale National Park, Uganda): do high spatial proximity favor zoonotic transmission? *PLoS Neglected Tropical Diseases*; 9. Epub ahead of print 2015. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004133.

[37] Stam AB. Un cas mortel d'ascaridiose (*Ascaris lumbricoides* L.) chez le chimpanzé nain (*Pan paniscus* Schwarz). *NOTES ET INFORMATIONS Laboratoire médical, Stanleyville (Congo)*; 675.

[38] Xie Y, Niu L, Zhao B, et al. Complete mitochondrial genomes of chimpanzee- and gibbon-derived ascaris isolated from a zoological garden in Southwest China. *PLoS ONE*; 8. Epub ahead of print 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0082795.

[39] Nejsum P, Bertelsen MF, Betson M, et al. Molecular evidence for sustained transmission of zoonotic *Ascaris suum* among zoo chimpanzees (*Pan troglodytes*). *Veterinary Parasitology* 2010; 171: 273–276.

[40] Kalousová B, Hasegawa H, Petrželková KJ, et al. Adult hookworms (*Necator* spp.) collected from researchers working with wild western lowland gorillas. *Parasites and Vectors* 2016; 9: 4–9.

[41] Nonga HE, Costantine A, Maulid Y. A survey of gastrointestinal helminths in Baboons (*Papio Cynocephalus*) and warthogs (*Phacochoerus africanus*) at Saadani National Park , Bagamoyo , Tanzania. *Tanzania Veterinary Journal*; 29.

[42] Pullan RL, Smith JL, Jasrasaria R, et al. Global numbers of infection and disease burden of soil transmitted helminth infections in 2010. *Parasites and Vectors* 2014; 7: 1–19.

[43] Chan MS. The global burden of intestinal nematode infections: fifty years on. *Parasitol Today*; 13.

[44] Awasthi S, Bundy D. Intestinal nematode infection and anaemia in developing countries. *British Medical Journal* 2007; 334: 1065–1066.

[45] Lopez AD, Murray CC. The global burden of disease, 1990-2020. *Nat Med* 1998; 4: 1241–3. doi: 10.1038/3218. PMID: 9809543.

[46] WHO. Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases third who report on neglected tropical diseases. *WHO Document Production Services Geneva, Switzerland 2015*.

[47] Simonsen PE, Onapa AW, Asio SM. *Mansonella perstans* filariasis in Africa. *Acta Tropica*; 120. Epub ahead of print 2011. DOI: 10.1016/j.actatropica.2010.01.014.

[48] Wanji S, Tayong DB, Layland LE, et al. Update on the distribution of *Mansonella perstans* in the southern part of Cameroon: Influence of ecological factors and mass drug administration with ivermectin. *Parasites and Vectors* 2016; 9: 1–17.

[49] Bregani ER, Rovellini A, Mbaïdoum N, et al. Comparison of different anthelminthic drug regimens against *Mansonella perstans* filariasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2006; 100: 458–463.

[50] Orihel TC, Eberhard ML. Zoonotic Filariasis. *Tropical Infectious Diseases* 2011; 11: 750–758.

[51] Richard-lenoble D, Kombila M, Bain O. Foyer de filariose humaine au Gabon a microfilaire dermique indifférenciable de *Microfilaria rodhaini*. *Annales de Parasitologie* 1982; 57: 506.

[52] Downes BL, Jacobsen KH. A systematic review of the epidemiology of mansonelliasis. *African Journal of Infectious Diseases* 2010; 4: 7–14.

[53] WHO. Soil-transmitted helminthiases: eliminating soil-transmitted helminthiases as a public health problem in children: progress report 2001-2010 and strategic plan 2011-2020. *Human Helminthiases in the Philippines* 2012; 90.

[54] Bethony J, Brooker S, Albonico M, et al. Soil-transmitted helminth infections : ascariasis , trichuriasis , and hookworm. 367.

[55] Stewart TB GLC. The veterinary importance of nodular worms (*Oesophagostomum* spp). *Parasitol Today* 1989; 5: 209–213.

[56] Pedersen AB, Altizer S, Poss M, et al. Patterns of host specificity and transmission among parasites of wild primates. *International Journal for Parasitology* 2005; 35: 647–657.

[57] Clough D. Gastro-intestinal parasites of red-fronted lemurs in kirindy forest, Western Madagascar. *Journal of Parasitology* 2010; 96: 245–251.

[58] Cutillas C, Callejón R, de Rojas M, et al. *Trichuris suis* and *Trichuris trichiura* are different nematode species. *Acta Tropica* 2009; 111: 299–307.

[59] Phillips KA, Haas ME, Grafton BW, et al. Survey of the gastrointestinal parasites of the primate community at Tambopata National Reserve, Peru. *Journal of Zoology* 2004; 264: 149–151.

[60] Kalema-Zikusoka G, Rothman JM, Fox MT. Intestinal parasites and bacteria of mountain gorillas (*Gorilla beringei beringei*) in Bwindi Impenetrable National Park, Uganda. *Primates* 2005; 46: 59–63.

[61] Ashford RW, Reid GDF, Wrangham RW. Intestinal parasites of the chimpanzee *Pan troglodytes* in Kibale Forest, Uganda . *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 2000; 94: 173–179.

[62] Robles MDR. New species of trichuris (Nematoda: Trichuridae) from akodon montensis thomas, 1913, of the paranaense forest in Argentina. *Journal of Parasitology* 2011; 97: 319–327.

[63] Cutillas C, de Rojas M, Zurita A, et al. *Trichuris colobae* n. sp. (Nematoda: Trichuridae), a new species of *Trichuris* from *Colobus guereza kikuyensis*. *Parasitology Research* 2014; 113: 2725–2732.

[64] Liu G, Gasser RB, Nejsum P, et al. Mitochondrial and Nuclear Ribosomal DNA Evidence Supports the Existence of a New *Trichuris* Species in the Endangered Franc ¸ ois ' Leaf-Monkey. 8. Epub ahead of print 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0066249.

[65] Ghai RR, Chapman CA, Omeja PA, et al. Nodule worm infection in humans and wild primates in uganda: cryptic species in a newly identified region of human transmission. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2014; 8: 39.

[66] Landsoud-Soukate J, Tutin CEG, Fernandez M. Intestinal parasites of sympatric gorillas and chimpanzees in the Lope Reserve, Gabon. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 1995; 89: 73–79.

[67] Ocaido M, Dranzoa C, Cheli P. Gastrointestinal parasites of baboons (*Papio anubis*) interacting with humans in West Bugwe Forest Reserve, Uganda. *African Journal of Ecology* 2003; 41: 356–359.

[68] ANOFEL. Parasitoses et mycoses des régions tempérées et tropicales. 2019.

[69] Nejsum P, Grøndahl C, Murrell KD. Molecular evidence for the infection of zoo chimpanzees by pig *Ascaris*. *Veterinary Parasitology* 2006; 139: 203–210.

[70] Hotez PJ, Bethony J, Bottazzi ME, et al. Hookworm: "The great infection of mankind." *PLoS Medicine* 2005; 2: 0187–0191.

[71] Hasegawa H, Shigyo M, Yanai Y, et al. Molecular features of hookworm larvae (*Necator* spp.) raised by coproculture from Ugandan chimpanzees and Gabonese gorillas and humans. *Parasitology International* 2017; 66: 12–15.

[72] Hasegawa H, Modrý D, Kitagawa M, et al. Humans and Great Apes Cohabiting the Forest Ecosystem in Central African Republic Harbour the Same Hookworms. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2014; 8: 1–10.

[73] Blotkamp J, Krepel HP, Kumar V, et al. Observations on the morphology of adults and larval stages of *Oesophagostomum* sp. isolated from man in northern Togo and Ghana. *Journal of Helminthology* 1993; 67: 49–61.

[74] Polderman AM, Blotkamp J. *Oesophagostomum* infections in humans. *Parasitology Today* 1995; 11: 451–456.

[75] Gasser RB, de Gruijter JM, Polderman AM. Insights into the epidemiology and genetic make-up of *Oesophagostomum bifurcum* from human and non-human primates using molecular tools. *Parasitology* 2006; 132: 453–460.

[76] Lieshout L Van, Gruijter JM De, Adu-nsiah M, et al. *Oesophagostomum bifurcum* in non-human primates is not a potential reservoir for human infection in Ghana. 2005; 10: 1315–1320.

[77] Krief S, Huffman MA, Thierry S, et al. Noninvasive monitoring of the health of *Pan troglodytes schweinfurthii* in the Kibale National Park, Uganda. *International Journal ofPrimatology* 2005; 26: 467–490.

[78] Gillespie ATR, Greiner EC, Chapman CA, et al. Gastrointestinal parasites of the guenons of western Uganda. *J Parasitol* 2019; 90: 1356–1360.

[79] Doody A. Safeguarding biodiversity is essential to prevent the next COVID-19.

[80] Haddad NM, Brudvig LA, Clobert J, et al. Habitat fragmentation and its lasting impact on Earth's ecosystems. *Science Advances*; 1. Epub ahead of print March 6, 2015. DOI: 10.1126/sciadv.1500052.

[81] Morand S, Jittapalapong S, Suputtamongkol Y, et al. Infectious diseases and their outbreaks in Asia-Pacific: Biodiversity and its regulation loss matter. *PLoS ONE*; 9. Epub ahead of print February 25, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0090032.

[82] Rulli MC, Santini M, Hayman DTS, et al. The nexus between forest fragmentation in Africa and *Ebola virus* disease outbreaks. *Scientific Reports*; 7. Epub ahead of print March 14, 2017. DOI: 10.1038/srep41613.

[83] Weiss RA, McMichael AJ. Social and environmental risk factors in the emergence of infectious diseases. *Nature Medicine*; 10. Epub ahead of print December 2004. DOI: 10.1038/nm1150.

[84] Adetunji VE. Prevalence of gastro-intestinal parasites in primates and their keepers from two zoological gardens in Ibadan, Nigeria. *Sokoto Journal of Veterinary Sciences* 2014; 12: 25–30.

[85] Murray S, Stem C, Boudreau B, et al. Intestinal parasites of baboons (*Papio cynocephalus anubis*) and chimpanzees (*Pan troglodytes*) in Gombe National Park. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 2000; 31: 176–178.

[86] Muehlenbein MP, Watts DP. The costs of dominance: Testosterone, cortisol and intestinal parasites in wild male chimpanzees. *BioPsychoSocial Medicine* 2010; 4: 1–12.

[87] Kolapo TU, Jegede HO. a Survey of gastrointestinal parasites of captive animals at the. *Vom Journal of Veterinary Science* 2017; 12: 17–27.

[88] Ebbert MA, McGrew WC, Marchant LF. Differences between chimpanzee and baboon gastrointestinal parasite communities. *Parasitology* 2015; 142: 958–967.

[89] Howells ME, Pruetz J, Gillespie TR. Patterns of gastro-intestinal parasites and commensals as an index of population and ecosystem health: The case of sympatric western chimpanzees (*Pan troglodytes verus*) and guinea baboons (*Papio hamadryas papio*) at Fongoli, Senegal. *American Journal of Primatology* 2011; 73: 173–179.

[90] Pafčo B, Kreisinger J, Čížková D, et al. Genetic diversity of primate strongylid nematodes: Do sympatric nonhuman primates and humans share their strongylid worms? *Molecular Ecology* 2019; 28: 4786–4797.

[91] Dawet A. Survey of Gastrointestinal Parasites of Non-Human Primates in Jos Zoological Garden. *Journal of Primatology* 2013; 02: 2–4.

[92] File SK, Mcgrew WC, Tutin CEG. of the Intestinal Parasites of a Community Feral. *Society* 2012; 62: 259–261.

[93] Graber M. Parasites internes des vertébrés domestiques et sauvages, autres que les primates de la République Populaire du Congo (d'après la collection Cassard-Chambron, 1956-1960). Rôle pathogène - prophylaxie. *Revue d"elevage et de medecine veterinaire des pays tropicaux* 1981; 34: 155–167.

[94] Masi S, Chauffour S, Bain O, et al. Seasonal Effects on Great Ape Health : A Case Study of Wild Chimpanzees and Western Gorillas. *PLoS ONE* 2012; 7: e49805.

[95] Mbaya A.W. UUJ. Gastrointestinal parasites of captive and free-roaming primates at the Afi Mountain Primate Conservation Area in Calabar, Nigeria and their zoonotic implications. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 2011; 14: 709–714.

[96] Kooriyama T, Hasegawa H. Parasitology of five primates in Mahale Mountains National Park ,. *Primates* 2012; 53: 365–375.

[97] Kawabat M. A Preliminary Note on the Intestinal Parasites of Wild Chimpanzees in the Mahale Mountains , Tanzania. *Primates* 1991; 32: 275–278.

[98] Drakulovski P, Bertout S, Locatelli S. Assessment of gastrointestinal parasites in wild chimpanzees (*Pan troglodytes troglodytes*) in southeast Cameroon. *Parasitol Res* 2014; 113: 2541–2550.

[99] Petrzelkova KJ, Hasegawa H, Moscovice LR, et al. Parasitic Nematodes in the Chimpanzee Population on Rubondo Island, Tanzania. *International Journal ofPrimatology* 2006; 27: 767–777.

[100] Sá RUIM, Ová JPŠ, Pomajbíková KŘINA, et al. Gastrointestinal Symbionts of Chimpanzees in Cantanhez National Park , Guinea - Bissau with respect to habitat fragmentation. *American Journal of Primatology* 2013; 75: 1032–1041.

[101] Krief S, Vermeulen B, Lafosse S, et al. Nodular Worm Infection in Wild Chimpanzees in Western Uganda : A Risk for Human Health ? *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2010; 4: 1–5.

[102] Mclennan MR, Huffman MA. High Frequency of Leaf Swallowing and its Relationship to Intestinal Parasite Expulsion in “Village” Chimpanzees at Bulindi, Uganda. *American Journal of Primatology* 2012; 74: 642–650.

[103] Ghai RR, Simons ND, Chapman CA, et al. Hidden Population Structure and Cross-species Transmission of Whipworms (*Trichuris* sp .) in Humans and Non-human Primates in Uganda. *PLoS Neglected Tropical Diseases*; 8. Epub ahead of print 2014. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003256.

[104] Petrášová J, Modrý D, Huffman MA, et al. Gastrointestinal Parasites of Indigenous and Introduced Primate Species of Rubondo Island National Park, Tanzania. *International Journal of Primatology* 2010; 31: 920–936.

[105] Hasegawa H, Kano T. A Parasitological survey on the feces of pygmy Chimpanzees , Pan paniscus , at Wamba , Zaire. *Primates* 1983; 24: 419–423.

[106] Hamad I, Keita MB, Peeters M, et al. Pathogenic eukaryotes in gut microbiota of western lowland gorillas as revealed by molecular survey. *Scientific Reports* 2014; 4: 1–9.

[107] Mcgrew WC. Intestinal parasites of sympatric *Pan troglodytes* and *Papio* Spp . at two sites : Gombe (Tanzania) and Mt . Assirik (Senegal). *American Journal of Primatology* 1989; 17: 147–155.

[108] Medkour H, Amona I, Laidoudi Y, et al. Parasitic infections in African humans and non-human primates. *Pathogens* 2020; 9: 1–20.

[109] Vlcková K, Pafco B, Petrželková KJ, Modrý D, Todd A YC, Torralba M, Wilson BA, Stumpf RM, White BA, Nelson KE LS and GA. Relationships Between Gastrointestinal Parasite Infections and the Fecal Microbiome in Free-Ranging Western Lowland Gorillas. *Front Microbiol* 2018; 9: 1–12.

[110] Sleeman AJM, Meader LL, Antoine B, et al. Gastrointestinal parasites of mountain gorillas (*Gorilla gorilla beringei*) in the Parc National des Volcans , rwanda (*Gorilla gorilla beringei*) in the Parc National. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 2019; 31: 322–328.

[111] Makouloutou P, Nguema PPM, Fujita S, et al. Prevalence and genetic diversity of *Oesophagostomum stephanostomum* in wild lowland gorillas at Moukalaba-Doudou National Park , Gabon. *Helminthologia (Poland)* 2014; 51: 83–93.

[112] Petrželková K, Jana P, Modrý, et al. Gastrointestinal Parasites of Indigenous and Introduced Primate Species of Rubondo. *Int J Primatol* 2010; 31: 920–936.

[113] Ashford RW, Reid GDF, Wrangham RW, et al. Annals of Tropical Medicine & Parasitology Intestinal parasites of the chimpanzee *Pan troglodytes* in Kibale Forest , Uganda Intestinal parasites of the chimpanzee *Pan troglodytes* in Kibale Forest , Uganda. *Annals of Tropical Medicine* 2000; 94: 173–179.

[114] Pafčo B, Tehlárová Z, Jirků Pomajbíková K, et al. Gastrointestinal protists and helminths of habituated agile mangabeys (*Cercocebus agilis*) at Bai Hokou, Central African Republic. *American Journal of Primatology* 2018; 80: 1–9.

[115] Ashford RW, Reid GDF, Butynski TM. Annals of Tropical Medicine & Parasitology The intestinal faunas of man and mountain gorillas in a shared habitat. *Annals of Tropical Medicine* 1990; 84: 337–340.

[116] Caumes JL, Bronstein JA, Klotz F. *Trichuris* and trichuriasis. *EMC - Maladies Infectieuses* 2005; 2: 140–145.

[117] WHO. Prevention and control of schistomiasis and soil-transmitted helminthiasis. *Acta Tropica* 2008; 108: 222–228.

[118] Hotez PJ, Brooker S, Bethony JM, et al. Hookworm Infection. 2004; 799–807.

[119] CDC. oesophagostomiasis. *https://www.cdc.gov/dpdx/oesophagostomiasis/index.html (accessed on 30 November 2020)*.

[120] Beaver PC, Jung RC CE. *Oesophagostomum* species. In: *In Beaver and others, eds.,1984.* 1984, p. Clinical parasitology. : Lea & Febiger, 287-288.

[121] Levine ND. Nodular worms, bowel worms, gapeworms and kidney worms. In: *Nematode parasites of domestic animals and man.* 1968, p. Burgess, 115-125.

[122] Olsen OW. *Oesophagostomum columbianum*. 1974, p. In Olsen OW, ed.1974. Animal parasites. Their li.

[123] Lapage G. Genus *Oesophagostomum*. In: Entomology VH and (ed). Ballière, Tindall and Cox, 1959, pp. 193-198.

[124] Ta-Tang T-H, Crainey JL, Post RJ, et al. Mansonellosis : current perspectives. *Research and Reports in Tropical Medicine* 2018; 9: 9–24.

[125] Terio KA, Lonsdorf E v., Kinsel MJ, et al. Oesophagostomiasis in non-human primates of Gombe National Park, Tanzania. *American Journal of Primatology* 2018; 80: 1–9.

[126] Akpan PA. Survey of Gastro-Intestinal Parasites of Chimpanzees and Drill Monkeys in Drill Ranch ,. *African Research Review* 2010; 4: 334–340.

[127] Fowler A KYS v. Leaf-swallowing in Nigerian chimpanzees: evidence for assumed self-medication. *Primates* 2007; 48: 73–6.

[128] Dupain J, Elsacker L van, Nell C, et al. New Evidence for Leaf Swallowing and Oesophagostomum Infection in Bonobos (*Pan paniscus*). *International Journal of Primatology*; 23.

[129] Krief S, Jamart A, Mahé S, et al. Clinical and pathologic manifestation of oesophagostomosis in African great apes: Does self-medication in wild apes influence disease progression? *Journal of Medical Primatology* 2008; 37: 188–195.

[130] 0rihel TC, Seibold HR. Nematodes of the Bowel and Tissues. 1972; 103: 76–103.

[131] Orihel TC. Necator Americanus Infection in Primates. *The Journal of Parasitology, vol 57, no 1, 1971, pp JSTOR,* 1971; 57: 117–121.

[132] Storey PA, Faile G, Hewitt E, et al. Clinical epidemiology and classification of human oesophagostomiasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2000; 94: 177–182.

[133] Thienpont D, Mortelmans J, Vercruysse J. Contribution à l'étude de la Trichuriose du chimpanzé et de son traitement avec la Methyrídine. *Ann Soc belge Mad trop* 1962; 2: 211–218.

[134] OMS. *Parasitologie médicale: techniques de base pour le laboratire*. 1993.

[135] de Carvalho LGX, Moreira LE, Pena JL, et al. A comparative study of the TF-Test ® , Kato-Katz , Hoffman-Pons-Janer , Willis and Baermann-Moraes coprologic methods for the detection of human parasitosis. 2012; 107: 80–84.

[136] Weber R, Bryan RT, Juranek DD. Improved stool concentration procedure for detection of *Cryptosporidium* oocysts in fecal specimens. 1992; 30: 2869–2873.

[137] Allen A, Ridley D. Further observations on the formol-ether concentration technique for faecal parasites. *T'echnical methods* 1969; 545–546.

[138] Knopp S, Mgeni AF, Khamis IS, et al. Diagnosis of soil-transmitted helminths in the era of preventive chemotherapy: Effect of multiple stool sampling and use of

different diagnostic techniques. *PLoS Neglected Tropical Diseases*; 2. Epub ahead of print 2008. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000331.

[139] Knopp S, Speich B, Hattendorf J, et al. Diagnostic accuracy of kato-katz and FLOTAC for assessing anthelmintic drug efficacy. *PLoS Neglected Tropical Diseases*; 5. Epub ahead of print 2011. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001036.

[140] Knopp S, Salim N, Schindler T, et al. Diagnostic accuracy of Kato-Katz, FLOTAC, Baermann, and PCR methods for the detection of light-intensity hookworm and Strongyloides stercoralis infections in Tanzania. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2014; 90: 535–545.

[141] Tarafder MR, Carabin H, Joseph L, et al. Estimating the sensitivity and specificity of Kato-Katz stool examination technique for detection of hookworms, *Ascaris lumbricoides* and *Trichuris trichiura* infections in humans in the absence of a "gold standard." *International Journal for Parasitology* 2010; 40: 399–404.

[142] Nikolay B, Brooker SJ, Pullan RL. Sensitivity of diagnostic tests for human soil-transmitted helminth infections: A meta-analysis in the absence of a true gold standard. *International Journal for Parasitology* 2014; 44: 765–774.

[143] Knopp S, Glinz D, Rinaldi L, et al. FLOTAC: A promising technique for detecting helminth eggs in human faeces. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2009; 103: 1190–1194.

[144] LagatieID O, Verheyen A, van HoofID K, et al. Detection of *Ascaris lumbricoides* infection by ABA-1 coproantigen ELISA. Epub ahead of print 2020. DOI: 10.1371/journal.pntd.0008807.

[145] Van Doorn HR, Koelewijn R, Hofwegen H, et al. Use of enzyme-linked immunosorbent assay and dipstick assay for detection of *Strongyloides stercoralis* infection in humans. *Journal of Clinical Microbiology* 2007; 45: 438–442.

[146] Buonfrate D, Perandin F, Formenti F, et al. A retrospective study comparing agar plate culture, indirect immunofluorescence and real-time PCR for the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection. *Parasitology* 2017; 144: 812–816.

[147] Javanian M, Gorgani-Firouzjaee T, Kalantrai N. Comparison of ELISA and PCR of the 18S rRNA gene for detection of human strongyloidiasis using serum

sample. *Infectious Diseases*; 51. Epub ahead of print May 4, 2019. DOI: 10.1080/23744235.2019.1575978.

[148] Gobbi F, Tamarozzi F, Buonfrate D, et al. Laboratory Parameters after Treatment for *Loa loa* and *Mansonella perstans*: The Experience of a Single Referral Center for Tropical Diseases in a Non-Endemic Area. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*; 100. Epub ahead of print April 3, 2019. DOI: 10.4269/ajtmh.18-0693.

[149] Connell EMO, Nutman TB. Review Article Molecular Diagnostics for Soil-Transmitted Helminths. 2020; 95: 508–513.

[150] Gordon CA, Gray DJ, Gobert GN, et al. DNA amplification approaches for the diagnosis of key parasitic helminth infections of humans. *Molecular and Cellular Probes* 2011; 25: 143–152.

[151] Gasser RB, Hung GC, Chilton NB, et al. Advances in developing molecular-diagnostic tools for strongyloid nematodes of equids: Fundamental and applied implications. *Molecular and Cellular Probes* 2004; 18: 3–16.

[152] Blouin MS. Molecular prospecting for cryptic species of nematodes: Mitochondrial DNA versus internal transcribed spacer. *International Journal for Parasitology* 2002; 32: 527–531.

[153] Gasser RB. PCR-based technology in veterinary parasitology. *Veterinary Parasitology* 1999; 84: 229–258.

[154] Oliveira LMA, Santos HLC, Gonçalves MML, et al. Evaluation of polymerase chain reaction as an additional tool for the diagnosis of low-intensity Schistosoma mansoni infection. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2010; 68: 416–421.

[155] Verweij JJ, Brienen EAT, Ziem J, et al. Simultaneous detection, and quantification of *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus*, and *Oesophagostomum bifurcum* in fecal samples using multiplex real-time PCR. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2007; 77: 685–690.

[156] Mejia R, Vicuña Y, Broncano N, et al. A novel, multi-parallel, real-time polymerase chain reaction approach for eight gastrointestinal parasites provides

improved diagnostic capabilities to resource-limited at-risk populations. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2013; 88: 1041–1047.

[157] Basuni M, Mohamed Z, Ahmad M, et al. Detection of selected intestinal helminths and protozoa at hospital Universiti Sains Malaysia using multiplex realtime PCR. *Tropical Biomedicine* 2012; 29: 434–442.

[158] Parida M. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Molecular Methods in Plant Disease Diagnostics: Principles and Protocols* 2016; 59–73.

[159] Mugambi RM, Agola EL, Mwangi IN, et al. Development and evaluation of a Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) technique for the detection of hookworm (*Necator americanus*) infection in fecal samples. *Parasites and Vectors* 2015; 8: 1–7.

[160] Pilotte N, Papaiakovou M, Grant JR, et al. Improved PCR-Based Detection of Soil Transmitted Helminth Infections Using a Next-Generation Sequencing Approach to Assay Design. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2016; 10: 1–18.

[161] De Gier B, Ponce MC, Van De Bor M, et al. Helminth infections and micronutrients in school-age children: A systematic review and meta-analysis. *American Journal of Clinical Nutrition* 2014; 99: 1499–1509.

[162] Gall S, Mu¨ller I, Walter C, Seelig H, Steenkamp L, Pu¨hse U et al. Associations between selective attention and soil-transmitted helminth infections, socioeconomic status, and physical fitness in disadvantaged children in Port Elizabeth, South Africa: An observational study. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2017; 8: 1–9.

[163] WHO. Helminth control in school-age children Helminth control in school age children. 2011; 90.

[164] WHO. Soil-transmitted helminthiases: number of children treated in 2010. *Relevé épidémiologique hebdomadaire / Section d'hygiène du Secrétariat de la Société des Nations = Weekly epidemiological record / Health Section of the Secretariat of the League of Nations*; 87: 225–232.

[165] WHO. Accelerating Work to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases: A Roadmap for Implementation (World Health Organizaiton, Geneva, Switzerland, 2012). *Who* 2012; 42.

[166] WHO. Soil-transmitted helminthiases: number of children treated in 2013. *Relevé épidémiologique hebdomadaire / Section d'hygiène du Secrétariat de la Société des Nations = Weekly epidemiological record / Health Section of the Secretariat of the League of Nations* 2015; 90: 89–96.

[167] Tchuenté LAT, N'Goran EK. Schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis control in Cameroon and Cte d'Ivoire: Implementing control on a limited budget. *Parasitology* 2009; 136: 1739–1745.

[168] Tchuenté LT, Noumedem CD, Ngassam P, et al. Mapping of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis in the regions of Littoral, North-West, South and South-West Cameroon and recommendations for treatment.

[169] Neglected Tropical Diseases (NTD). Taux de couverture des traitements de masse pour les MTN - 2016 Le Cameroun et les maladies tropicales négligées.

[170] Neglected Tropical Diseases. Taux de couverture des traitements de masse pour les MTN - 2016 Le Gabon et les maladies tropicales négligées.

[171] Anonymous. Drugs for Parasitic Infections. *Journal of Statistical Planning and Inference*. Epub ahead of print 2004. DOI: 10.1016/0378-3758(85)90065-5.

[172] Coulibaly YI, Dembele B, Diallo AA, et al. A Randomized Trial of Doxycycline for *Mansonella perstans* Infection. *New England Journal of Medicine* 2009; 361: 1448–1458.

[173] Debrah LB, Phillips RO, Pfarr K, et al. The efficacy of doxycycline treatment on *Mansonella perstans* infection: An open-label, randomized trial in Ghana. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2019; 101: 84–92.

[174] MINFOF/IUCN. Caractérisation d'une population de grands et moyens mammifères dans la Reserve de Faune du Dja : Potentiel et menaces. 2015; 31.

[175] Nguiffo S. Etude de cas : la réserve de faune Dja. 2001; 197–216.

[176] MINFOF. Plan d'aménagement du Parc National de Lobéké et de sa zone périphérique.

[177] MEDINOF. Plan d'aménagement de la forêt communale de Djoum. p. 30.

[178] Kamgno J, Pion SD, Chesnais CB, et al. A Test-and-Not-Treat Strategy for Onchocerciasis in Loa loa-Endemic Areas. *The New England journal of medicine* 2017; 377: 2044–2052.

[179] van der Kuyl AC, Kuiken CL, Dekker JT, et al. Phylogeny of African monkeys based upon mitochondrial 12S rRNA sequences. *Journal of Molecular Evolution* 1995; 40: 173–180.

[180] Boué V, Locatelli S, Boucher F, et al. High rate of simian immunodeficiency virus (SIV) infections in wild chimpanzees in northeastern Gabon. *Viruses* 2015; 7: 4997–5015.

[181] Etienne L, Locatelli S, Ayouba A, et al. Noninvasive Follow-Up of Simian Immunodeficiency Virus Infection in Wild-Living Nonhabituated Western Lowland Gorillas in Cameroon. *Journal of Virology* 2012; 86: 9760–9772.

[182] Casiraghi M, Anderson TJC, Bandi C, et al. A phylogenetic analysis of filarial nematodes: Comparison with the phylogeny of *Wolbachia* endosymbionts. *Parasitology* 2001; 122: 93–103.

[183] NCBI. Nucleotide BLAST: search nucleotide databases using a nucleotide query.

[184] Edgar RC. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 2004; 32: 1792–1797.

[185] Posada D. jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* 2008; 25: 1253–1256.

[186] Nguyen LT, Schmidt HA, Von Haeseler A, et al. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 2015; 32: 268–274.

[187] Kalyaanamoorthy S, Minh BQ, Wong TKF, et al. ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods* 2017; 14: 587–589.

[188] Hoang DT, Chernomor O, von Haeseler A, et al. UFBoot2: Improving the Ultrafast Bootstrap Approximation. Molecular biology and evolution. *Molecular Biology and Evolution* 2018; 35: 518–522.

[189] Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, et al. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: Assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* 2010; 59: 307–321.

[190] Hasegawa H, Kalousova B, McLennan MR, et al. *Strongyloides* infections of humans and great apes in Dzanga-Sangha Protected Areas, Central African Republic and in degraded forest fragments in Bulindi, Uganda. *Parasitology International*; 65. Epub ahead of print October 2016. DOI: 10.1016/j.parint.2016.05.004.

[191] Huffman MA, Pebsworth P, Bakuneeta C, et al. Chimpanzee–parasite ecology at Budongo Forest (Uganda) and the Mahale Mountains (Tanzania): influence of climatic differences on self-medicative behavior. *In: Huffman MA, Chapman CA, editors Primate parasite ecology: the dynamics and study of host–parasite relationships Cambridge: Cambridge University Press;* 2009; 331–50.

[192] Huffman MA. Current Evidence for Self-Medication in Primates: A Multidisciplinary Perspective. *Yearbook of Physical Anthropology* 1997; 40: 171–200.

[193] Kalousová B, Piel AK, Modrý D, et al. Gastrointestinal Parasites of Savanna Chimpanzees (*Pan troglodytes schweinfurthii*) in Ugalla , Tanzania. *Int J Primatol* 2014; 463–475.

[194] Agile Mangabey-Mangabey Species Survival Plan. http://www.mangabeyssp.org/Agile Mangabey.htm (2008).

[195] Ankel-Simons F. *Primate anatomy: an introduction.* 3rd ed. San Diego, USA: Elsevier Academic Press, 2007.

[196] Zuk M, McKean KA. Sex differences in parasite infections: Patterns and processes. *International Journal for Parasitology* 1996; 26: 1009–1024.

[197] Arneberg P. Host population density and body mass as determinants of species richness in parasite communities: Comparative analyses of directly transmitted nematodes of mammals. *Ecography* 2002; 25: 88–94.

[198] Klein SL. Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection. *Parasite Immunology* 2004; 26: 247–264.

[199] van Bogaert O. A park for people and wildlife: wwf report, posted on 1st of March 2000. *https://wwf.panda.org/?2085/A-park-for-people-and-wildlife (2000) Accessed 01122020*.

[200] von Linstow O. The American hookworm in chimpanzee. *American Journal of Medecine* 1903; We 6: 611-undefined.

[201] Dollfus, RP. Chabaud AG. Cinq especes de nématodes chez un atele [*Ateles ater* (G. Cuvier 1823)] mort a la ménagerie du museum. *Arch Mus Hist Nat* 1955; 3: 27–40.

[202] Buckley JJC. *On Two New Species of Enterobius from the Monkey Lagothrix hwnboldtii*. 1931.

[203] Ackert JE PFK. Investigations on the control of hookworm disease. XII. Studies on the occurrence, distribution and morphology of *Necator suillus*, including descriptions of the other species of Necator. *American Journal of Hygiene* 1922; 3: 1–25.

[204] Noda R YH. On two species of nematodes, *Necator gorillae* sp. nov. (Ancylostomidae) and *Chitwoodspirura wehri* Chabaud and Rousselot, 1956 (Spiruridae), from a gorilla. . *Bull Univ Osaka* 1964; 15: 175–80.

[205] Gasser RB, Woods WG, Blotkamp C, et al. Screening for nucleotide variations in ribosomal DNA arrays of Oesophagostomum bifurcum by polymerase chain reaction-coupled single-strand conformation polymorphism. *Electrophoresis* 1999; 20: 1486–1491.

[206] Narat V, Guillot J, Pennec F, et al. Intestinal Helminths of Wild Bonobos in Forest-Savanna Mosaic: Risk Assessment of Cross-Species Transmission with Local People in the Democratic Republic of the Congo. *EcoHealth* 2015; 12: 621–633.

[207] Eberhard ML, Kovacs-Nace E, Blotkamp J, et al. Experimental *Oesophagostomum bifurcum* in monkeys. *Journal of Helminthology* 2001; 75: 51–56.

[208] Bradbury RS. *Ternidens deminutus* Revisited : A Review of Human Infections with the False Hookworm.

[209] Goldsmid JM. *Ternidens* infection. *Parasitic Zoonoses vol II Boca Raton, FL, USA: CRC Press* 1982; 269–88.

[210] Gasser RB. Molecular tools - Advances, opportunities and prospects. *Veterinary Parasitology* 2006; 136: 69–89.

[211] Lello J, Boag B, Fenton A, et al. Competition and mutualism among the gut helminths of a mammalian host. *Nature*; 428. Epub ahead of print April 2004. DOI: 10.1038/nature02490.

[212] Telfer S, Lambin X, Birtles R, et al. Species Interactions in a Parasite Community Drive Infection Risk in a Wildlife Population. *Science*; 330. Epub ahead of print October 8, 2010. DOI: 10.1126/science.1190333.

[213] Huffman MA, Gotoh S, Turner LA, et al. Seasonal trends in intestinal nematode infection and medicinal plant use among chimpanzees in the Mahale Mountains Tanzania. *Primates* 1997; 38: 111–125.

[214] Doležalová J, Oborník M, Hajdušková E, et al. How many species of whipworms do we share? Whipworms from man and other primates form two phylogenetic lineages. *Folia Parasitologica*; 62. Epub ahead of print 2015. DOI: 10.14411/fp.2015.063.

[215] Yao C, Walkush J, Shim D, et al. Molecular species identification of *Trichuris trichiura* in African green monkey on St. Kitts, West Indies. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports* 2018; 11: 22–26.

[216] Cavallero S, Nejsum P, Cutillas C, et al. Insights into the molecular systematics of *Trichuris* infecting captive primates based on mitochondrial DNA analysis. *Veterinary Parasitology* 2019; 272: 23–30.

[217] Callejón R, Halajian A, Cutillas C. Description of a new species, *Trichuris ursinus* n. sp. (Nematoda: Trichuridae) from *Papio ursinus* Keer, 1792 from South Africa. *Infection, Genetics and Evolution* 2017; 51: 182–193.

[218] Pafčo B, Benavides JA, Pšenková-Profousová I, et al. Do habituation, host traits and seasonality have an impact on protist and helminth infections of wild western lowland gorillas? *Parasitology Research*; 116. Epub ahead of print December 7, 2017. DOI: 10.1007/s00436-017-5667-8.

[219] Bain O, Moisson P, Huerre M, et al. Filariae from a wild gorilla in Gabon with description of a new species of *Mansonella*. *parasite* 1995; 2: 315–322.

[220] Chabaud AG, Bain O. La Lignee Dipetalonema. Nouvel Essai De Classification. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee* 1976; 51: 365–397.

[221] van den Berghe L, Chardome M, Peel E. *Dipetalonema gorillae* n. sp., filaire de *Gorilla gorilla* au Congo Belge. *Folia Sci Afr Cent* 1957; 3: 87.

[222] Senanayake KS, Söderberg J, Põlajev A, et al. The Genome of *Setaria digitata*: A cattle nematode closely related to human filarial parasites. *Genome biology and evolution* 2020; 12: 3971–3976.

[223] Crainey JL, Marín MA, Silva TRR da, et al. *Mansonella ozzardi* mitogenome and pseudogene characterisation provides new perspectives on filarial parasite systematics and CO-1 barcoding. *Scientific Reports* 2018; 8: 1–11.

[224] Crainey JL, Costa CHA, de Oliveira Leles LF, et al. Deep sequencing reveals occult mansonellosis coinfections in residents from the brazilian amazon village of São Gabriel da Cachoeira. *Clinical Infectious Diseases* 2020; 71: 1990–1993.

[225] Lefoulon E, Bain O, Bourret J, et al. Shaking the Tree: Multi-locus sequence typing usurps current Onchocercid (Filarial Nematode) phylogeny. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2015; 9: 1–19.

[226] Terio KA, Kinsel MJ, Raphael J, et al. Pathologic Lesions in Chimpanzees (*Pan trogylodytes schweinfurthii*) from Gombe National Park, Tanzania, 2004–2010. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*; 42. Epub ahead of print December 2011. DOI: 10.1638/2010-0237.1.

[227] WHO. Bench Aids for the Diagnosis of Filarial Infections. *Parasitology Today* 1999; 15: 84.

[228] Berghe L, van den Chardome M, Peel E. *Microfilaria leopoldi* n. sp. chez *Gorilla gorilla* au Congo Belge. *Folia Scientif Afr Centr* 1957; 3: 87.

[229] Baird, JK. Neafie, RC. Lanoie, L. Connor DH. Adult *Mansonella perstans* in the abdominal cavity in nine Africans. 1987 ; 37:. *Am J Trop Med Hyg* 1987; 37: 578–84.

[230] Peel, E. Chardome M. Sur les filaridés de chimpanzés *Pan paniscus* et *Pan satyrus* au Congo Belge. *Ann Soc Belge de Med Trop* 1946; 26: 117–56.

[231] Cabaret J, Gasnier N, Jacquiet P. Faecal egg counts are representative of digestive-tract strongyle worm burdens in sheep and goats. *Parasite* 1998; 5: 137–142.

[232] Leoutsakos, B. Agnadi, N. Kolisiatis S. Rectal bleeding due to *Oesophagostomum brumpti*: report of a case. *Dis Colon Rectum* 1977; 20: 632–4.

[233] van den Berghe, L. Chardome, M. Peel E. The filarial parasites of the eastern gorilla in the Congo. *J Helminthol* 1964; 38: 349–68.

[234] Weerakoon KG, McManus DP. Cell-Free DNA as a diagnostic tool for human parasitic infections. *Trends in Parasitology* 2016; 32: 378–391.

[235] Oi M, Sato Y, Nakagaki K, et al. Detection of *Dirofilaria immitis* DNA in host serum by nested PCR. *Parasitology Research* 2015; 114: 3645–3648.

[236] Gedoelst L. Notes sur la faune parasitaire du Congo Belge. *Rev Zool Afr* 1916; 5: 1–90.

[237] Baylis HA. On a collection of nematodes from nigerian mammals (Chiefly Rodents). *Parasitology* 1928; 20: 280–304.

[238] Morel P-C. Les helminthes des animaux domestiques de l'Afrique occidentale : revue. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux* 1959; 12: 153.

[239] Tubangui MA. Worm parasites of the brown rat (*Mus norvegicus*) in the Philippine Islands with a special reference to those forms that may be transmitted to human beings. *Philippine J Sci 1931;46:537–92* 1931; 46: 537–92.

[240] Tenora, F. Barus, V. Prokes, M. Sumbera, R. Koubkova B. Helminths parasitizing the silvery mole-rat *Heliophobius argenteocinereus* (Rodentia: Bathyergidae) from Malawi. *Helminthologia* 2003; 40: 153–60.

[241] Anderson RC. Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission. *2nd ed Wallingford: CABI*.

[242] Vuylsteke A. Note sur quelques Nématodes parasites avec description de neuf especes nouvelles. *Rev Zool Bot Afr* 1956; 53: 441–77.

[243] Foster, AO. Johnson CM. A preliminary note on identity, life cycle, and pathogenicity of an important parasite of captive monkeys. *Am J Trop Med Hyg* 1939; 19: 265–77.

[244] Nelson GS. Filarial infections as zoonoses. *Journal of Helminthology* 1965; 39: 229–250.

[245] Basuni M, Rahumatullah A, Miswan N, et al. A Pentaplex Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for Detection of Four Species of Soil-Transmitted Helminths. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*; 84. Epub ahead of print February 4, 2011. DOI: 10.4269/ajtmh.2011.10-0499.

[246] Mengue-Medou C. Les aires protégées en Afrique : perspectives pour leur conservation. *VertigO*. Epub ahead of print April 1, 2002. DOI: 10.4000/vertigo.4126.

[247] Matsuura N, Takenoshita Y, Yamagiwa J. Eco-anthropologie et primatologie pour la conservation de la biodiversité : un projet collaboratif dans le Parc National de Moukalaba-Doudou, Gabon1. *Revue de primatologie*. Epub ahead of print December 30, 2013. DOI: 10.4000/primatologie.1775.

[248] Morgan, BJ, al. *Regional Action Plan for the Conservation of the Nigeria-Cameroon Chimpanzee (Pan troglodytes ellioti)*.

[249] Chuo MD, Angwafo TE. Propose strategies to enhance the biodiversity status and traditional knowledge systems relevant for the conservation of *Pan Troglodytes Ellioti* in the Kimbi-Fungom National Park and Kom-Wum Forest Reserve. *International Journal of Advanced Engineering, Management and Science*; 4. Epub ahead of print 2018. DOI: 10.22161/ijaems.4.4.15.

Annexes

Sirima *et al. Parasites Vectors* (2021) 14:354
https://doi.org/10.1186/s13071-021-04855-7

Parasites & Vectors

RESEARCH Open Access

Soil-transmitted helminth infections in free-ranging non-human primates from Cameroon and Gabon

C. Sirima[1†], C. Bizet[1†], H. Hamou[1†], B. Červená[2,3], T. Lemarcis[1], A. Esteban[1], M. Peeters[1], E. Mpoudi Ngole[4], I. M. Mombo[5], F. Liégeois[6], K. J. Petrželková[2,7], M. Boussinesq[1] and S. Locatelli[1,6*]

Abstract

Background: Zoonotic diseases are a serious threat to both public health and animal conservation. Most non-human primates (NHP) are facing the threat of forest loss and fragmentation and are increasingly living in closer spatial proximity to humans. Humans are infected with soil-transmitted helminths (STH) at a high prevalence, and bidirectional infection with NHP has been observed. The aim of this study was to determine the prevalence, genetic diversity, distribution and presence of co-infections of STH in free-ranging gorillas, chimpanzees and other NHP species, and to determine the potential role of these NHP as reservoir hosts contributing to the environmental sustenance of zoonotic nematode infections in forested areas of Cameroon and Gabon.

Methods: A total of 315 faecal samples from six species of NHPs were analysed. We performed PCR amplification, sequencing and maximum likelihood analysis of DNA fragments of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) nuclear ribosomal DNA to detect the presence and determine the genetic diversity of *Oesophagostomum* spp., *Necator* spp. and *Trichuris* spp., and of targeted DNA fragments of the internal transcribed spacer 1 (ITS1) to detect the presence of *Ascaris* spp.

Results: *Necator* spp. infections were most common in gorillas (35 of 65 individuals), but also present in chimpanzees (100 of 222 individuals) and in one of four samples from greater spot-nosed monkeys. These clustered with previously described type II and III *Necator* spp. Gorillas were also the most infected NHP with *Oesophagostomum* (51/65 individuals), followed by chimpanzees (157/222 individuals), mandrills (8/12 samples) and mangabeys (7/12 samples), with *O. stephanostomum* being the most prevalent species. *Oesophagostomum bifurcum* was detected in chimpanzees and a red-capped mangabey, and a non-classified *Oesophagostomum* species was detected in a mandrill and a red-capped mangabey. In addition, *Ternidens deminutus* was detected in samples from one chimpanzee and three greater spot-nosed monkeys. A significant relative overabundance of co-infections with *Necator* and *Oesophagostomum* was observed in chimpanzees and gorillas. *Trichuris* sp. was detected at low prevalence in a gorilla, a chimpanzee and a greater spot-nosed monkey. No *Ascaris* was observed in any of the samples analysed.

*Correspondence: sabrina.locatelli@ird.fr
†C. Sirima, C. Bizet and H. Hamou contributed equally to this work
[6] Present Address: Institut de Recherche Pour Le Développement (IRD), Maladies Infectieuses Et Vecteurs : Écologie, Génétique, Évolution et Contrôle (MIVEGEC), IRD 224-CNRS 5290–University of Montpellier, Montpellier, France
Full list of author information is available at the end of the article

© The Author(s) 2021. This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Conclusions: Our results on STH prevalence and genetic diversity in NHP from Cameroon and Gabon corroborate those obtained from other wild NHP populations in other African countries. Future research should focus on better identifying, at a molecular level, the species of *Necator* and *Oesophagostomum* infecting NHP and determining how human populations may be affected by increased proximity resulting from encroachment into sylvatic STH reservoir habitats.

Keywords: Soil-transmitted helminths, Non-human primate, Africa, Zoonosis, Phylogeny, Faeces

Background

Zoonotic diseases are a serious threat to public health and animal conservation. The risk of zoonotic transmission of viral, bacterial, fungal and parasitic diseases is high between human and non-human primates (NHP) in general, and with the more closely related great apes in particular [1, 2]. Like many NHP, great apes are threatened by forest loss and fragmentation. Unless severely hunted, they are increasingly living in anthropogenically disturbed habitats, such as farmlands, human settlements, fragments of forest and isolated protected areas [3]. The consequence of people and NHP living in increasing spatial proximity to each other [4] is an increasing risk of infection by pathogens contaminating water sources, soil and food [5–10]. Of particular importance among these pathogens are soil-transmitted helminths (STH), which have developmental stages outside of their hosts, allowing for persistence of infective stages in the environment [11]. Infections occur through ingestion or skin penetration of third-stage larvae or eggs. These factors combine to make helminthiases a potential zoonotic risk when humans and NHP share the same habitat.

Approximately 1.5 billion people worldwide are infected with STH (*Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Necator americanus* and *Ancylostoma duodenale*), especially where access to safe drinking water, sanitation and hygiene is poor. The pathology of STH infections in humans includes anaemia, growth retardation and delayed cognitive development [12]. Information on STH prevalence and diversity in African NHP is scarce in some regions, and geographically heterogeneous. Studies results vary according to whether the populations targeted were free-ranging, habituated or (semi-) captive and the analytical approach adopted (morphological or molecular) to identify infections. In NHP, some of these nematodes have unclear clinical significance, while others may have strong pathogenic potential at high intensities. For example, heavy infections of nodular worms (*Oesophagostomum* spp.) are associated with morbidity and mortality in some chimpanzee populations (e.g. in Mahale [13] and Gombe [14], both in Tanzania).

Several cases of bidirectional STH transmission between humans and NHP have been reported [15–18]. *Trichuris* spp. are common in many species of free-ranging NHP in Africa [19, 20] and cryptic lineages, some of which infect also humans, have been detected [16, 21]. Similarly, *Ascaris* has also been found in NHP [22]. Free-ranging chimpanzees [23] and olive baboons [24] can become infected with human roundworms, suggesting that these species are hosts of *Ascari lumbricoides* or a very similar parasite. Gorillas, chimpanzees and several Old World monkey species have been reported to be hosts of *Nectar americanus* based on phenetic characteristics or molecular evidence [25]. Three other *Necator* species (*N. congolensis*, *N. gorillae* and *N. exilidens*) have also been described in African great apes, and *N. gorillae* has been reported to infect humans [17, 26, 27]. Finally, eight species of *Oesophagostomum* have been recorded in free-ranging NHP from the subfamilies *Cercopithecinae* and *Colobinae*, and in chimpanzees (*Pan troglodytes*) [15, 28–30], with three of these (*O. bifurcum, O. oesophagostomum, O. aculeatum*) infecting humans.

The prevalence rate and intensity of STH infections in NHP can vary according to season, social behaviour, degree of arboreality, which affects contact with infectious stages in the soil, and age and sex of the individuals. Sex differences in parasite infections can be the result of differences in home range, foraging dynamics and risk-taking behaviour [31]. The sexes could also differ in their susceptibility to infection because of sex hormones, such as testosterone and oestrogens, which are known to affect immune system function [32].

The World Health Organisation goal for 2030 is morbidity control, defined as reaching < 2% prevalence of medium-to-high intensity infections in preschool-age children and school-age children [12, 33]. In STH endemic countries, re-infection has been observed in half of the children treated for intestinal worms [34], a phenomenon attributed to re-infection due to persistence of infective worm stages in the environment. In addition, the extent to which NHP may act as reservoirs of infection may be affected by landscape perturbations, which facilitate novel ecological associations, new contact zones and host-switching: a pressing problem in forested areas increasingly subjected to anthropogenic disturbance and habitat fragmentation.

Therefore, studying STH parasitism in NHP, including African apes, has important public health implications.

In order to formulate effective public health control measures, a better understanding of nematode infections in NHP is needed so that the risk of zoonotic transmission and the potential role of NHP as reservoirs of infections can be determined. This includes monitoring parasite infections, exploring the transmission dynamics among NHP populations and characterising the genetic diversity of the parasites circulating in NHP and human populations.

Thus, the aims of the present study were: (i) to explore the prevalence and genetic diversity of selected genera of STH (*Trichuris*, *Ascaris*, *Necator* and *Oesophagostomum*) infecting gorillas and chimpanzees living in forests of Cameroon and Gabon, and determine the occurrence of these parasites in other NHP species from Cameroon; (ii) to investigate whether the prevalence of STH infection varied among gorillas and chimpanzees across the study sites and whether any co-infection with multiple parasites is observed; and (iii) to examine the presence of parasite sharing among all NHP species investigated, whether parasite occurrence varies with host sex and the potential for zoonotic transmission.

Methods

Study sites and faecal collection methods

To explore to which extent NHP may act as reservoirs of STH infections, we analysed a total of 315 faecal samples from free-ranging, unhabituated NHPs. These samples were fresh when collected (< 1 day old) and were collected non-invasively around NHP nests and feeding places or on traces at four study sites in Cameroon [the forests surrounding the villages of Djoum (DJ) (2°40′00″N, 12°40′00″E); Mambélé (MB) (2°25′00″N, 15°24′00″E); and the neighbouring Lobéké National Park (LB NP) and village of Somalomo (SOM) (3°23′00″N, 12°44′00″E)] (collections between 2008 and 2010), and in primary and secondary forests surrounding the village of Matakamangoye (MKT) (0°6′30″ S, 13°41′57″E) in Gabon (collections between 2009 and 2013) (Fig. 1). These samples had been characterised and analysed in previous studies to determine the prevalence and genetic diversity of Simian Immunodeficiency Viruses (SIV) [35, 36] as well as of filariae [37]. Experienced trackers and/or the researchers identified most faecal samples to be of chimpanzee and gorilla origin and only a few to be of *Cercopithecidae* monkey origin. A 15- to 20-g sample was then placed into a 50-ml tube and mixed with an equal amount of RNA*later*® (Ambion, Austin, TX, USA). The date, time and location [longitude and latitude provided by Global Positioning System (GPS)] of sample collection were recorded along with the collector's name. Faecal samples were generally kept at ambient temperature for no longer than 2 weeks and subsequently stored at − 20 °C once back in Yaoundé, Cameroon, or Franceville, Gabon. Samples were shipped to Montpellier, France, at ambient temperature and then stored at − 80 °C upon arrival. All samples were transported to France in full compliance with export and import regulations.

Extractionn of host and parasite DNA from NHP faecal samples

Non-human primate DNA was extracted from faeces using the QIAamp Stool DNA Mini kits (Qiagen, Valencia, CA, USA) following the manufacturer's instructions. Briefly, 1.5 ml of faecal RNA*later*® mixture was re-suspended in stool lysis buffer and the mixture centrifuged. The supernatants were treated with an InhibitEx tablet, subjected to proteinase K digestion and passed through a DNA binding column. Bound DNA was eluted in 100 µl of elution buffer. To investigate the presence and genetic diversity of STH in NHP faecal samples, a second DNA extraction was performed. A modified protocol was used after the initial resuspension of the sample in the stool lysis buffer. The modification consisted of an additional homogenisation in tubes containing silica beads of different size (lysis matrix E) in a FastPrep-24 mill (MP Biomedical, Eschwege, Germany) and an overnight incubation at 56 °C to improve egg shell lysis and better exposure of the parasite DNA.

Host species confirmation and identification of individual genotypes by microsatellite analyses

To identify the NHP species infected by the targeted STH, host species confirmation was performed by PCR amplification and sequence analysis of a 460- to 500-bp mitochondrial DNA (mtDNA) fragment spanning the 12S rDNA region, using methods described in previous studies [38]. To determine the number of individuals sampled, the faeces collected from gorillas and chimpanzees were subjected to microsatellite analyses, as previously described [36, 39, 40]. Samples were genotyped at seven loci in two multiplex PCRs (amplifying D18s536, D4s243, D10s676, and D9s922 or D2s1326, D2s1333 and D4s1627). To determine the host sex, a region of the amelogenin gene that contains a deletion in the X but not the Y chromosome was amplified using a *Taq* DNA polymerase core kit (MP Biomedical, Irvine, CA, USA) with 2–10 µl faecal DNA. Samples from the other NHP were subjected to mtDNA analyses but not to microsatellite analyses: to minimise the risk of analysing more than one sample belonging to the same individual, we selected samples collected the same day but in distant, non-overlapping monkey territories. Despite these precautions,

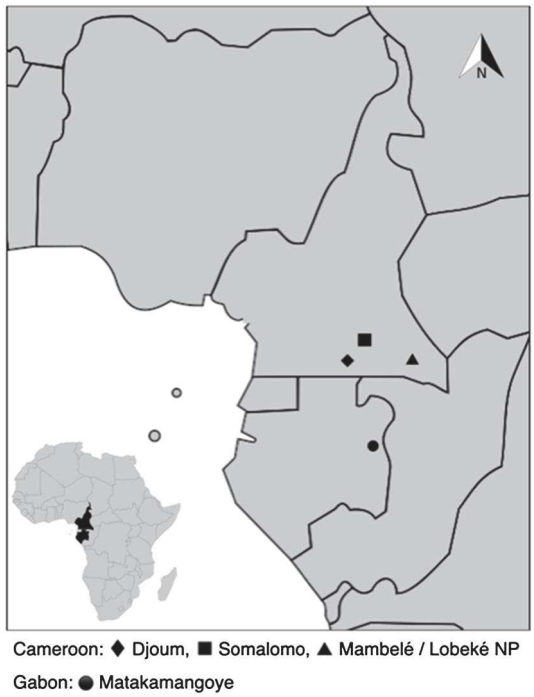


Fig. 1 Faecal sample collection sites in Cameroon and Gabon. In Cameroon, the collection sites of Djoum (DJ), Somalomo (SOM) and Mambelé (MB)/Lobeké (LB) National Park are indicated by a filled diamond, filled square and filled triangle, respectively. In Gabon, the collection site of Matakamangoye (MKT) is indicated by a filled circle

and given the low number of samples collected, we will consider them as samples and not as separate individuals.

PCR screening of soil-transmitted helminths

To better understand which NHP species are mostly infected with the STH, therefore representing the most prevalent reservoir, semi-nested PCR assays targeting the internal transcribed spacer 2 (ITS2) marker were used to determine the presence of *Trichuris* spp., *Oesophagostomum* spp. and *Necator* spp. in all 315 samples [15, 41, 42]. To detect the presence of *Ascaris* spp., we performed a nested PCR targeting the ITS1 marker [43]. Primer details, PCR conditions and expected amplicons size are given in Table 1. All PCR reactions were performed in a 50-µl reaction volume containing 10 and 5 µl of template DNA for primary and semi-nested/nested PCR, respectively, 10 pM of each primer, 25 µl HotStarTaq Master Mix (Qiagen, Hilden, Germany), providing a final concentration of 1.5 mM $MgCl_2$ and 200 µM of each dNTP. For the first round of PCR, bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added at a final concentration of 0.2 µg/ml to improve amplification success. The reactions were performed on a Bio-Rad T100™ thermal cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The amplicons were electrophoresed on 1% agarose gels stained with ethidium bromide. After purification (in 2% agarose gel) with the GeneClean® Turbo Kit (Qbiogene, Inc., Carlsbad, CA, USA), the PCR products were sequenced with the primers of the second step (if nested or semi-nested) on an automated sequencer (3500 Genetic Analyzer; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and the resulting sequences were analysed using SeqMan DNASTAR software (Lasergene; DNASTAR, Inc., Madison, WI, USA). At least two attempts were made to obtain high-quality sequences by adapting the quantity of PCR-purified DNA used in the sequencing reactions. Low-quality sequences (short amplicon size and/or sequences displaying background noise with too many unresolved degenerated nucleotides) were excluded from further phylogenetic analyses (details on the number of sequences obtained that were of satisfactory size and quality are given in Table 2).

Molecular identification and phylogenetic analysis

To explore the genetic diversity of the nematodes present in the NHP studied and to evaluate their zoonotic potential, we first confirmed the identity of these nematodes, searching through nucleotide BLAST [44] (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). All sequences were aligned in Geneious Prime 2020.1.2 (https://www.geneious.com) guided by CLUSTALW implemented in Geneious. The sequences of *Oesophagostomum* containing ambiguous nucleotides were submitted to haplotype reconstruction using "Open Unphase/Genotype data" in DnaSP 6 [45]. The reconstructed haplotypes were used in further analyses. Pairwise sequence distances were calculated in Geneious. Sequences representing different haplotypes and/or haplogroups were subsequently used in the phylogenetic analyses. GenBank sequences of the species found in humans and NHP were narrowed down to haplogroups. Each haplogroup was represented by one sequence in the final alignment. A maximum likelihood (ML) analysis was carried out in IQ-TREE 1.6.11 [46]. The most suitable model was chosen by ModelFinder [47] implemented in IQ-TREE based on the highest Bayesian information criterion scores and weights (BIC). The tree topology was tested by 1000 replicates of ultrafast bootstrap [48] and the Shimodaira–Hasegawa (SH)-like approximate likelihood ratio test [49].

Statistical analysis

To explore the STH co-infection patterns in the NHP species studied, we investigated whether *Oesophagostomum* and *Necator* occurred together (i.e. in the same faecal samples) more or less frequently than expected by

Table 1 Primers and PCR cycling programmes

Target organism	Gene	Primer	Sequence (5′–3′)	Product size (bp)	Thermal profile[a]						
					Step 1		Step 2		Step3		*N*
					Temperature (°C)	Duration (s)	Temperature (°C)	Duration (s)	Temperature (°C)	Duration (s)	
Oesophagostomum/Necator	*ITS2*	NC1	ACGTCTGGTTCAGGGTTGTT	NA	94	30	50	30	72	45	45
		NC2	TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT								
		OesophITS2	TGTRACACTGTTTGTC-GAAC	250/300	94	30	55	30	72	30	35
		NC2	TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT								
Trichuris trichiura	*ITS2*	ExtITS2	GGATCACTTGGCTGGTAG	NA	94	30	56	30	72	45	45
		NC2	TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT								
		IntITS2	CTTGAATACTTTGAACGCACATTG	480–700	94	30	49	30	72	45	35
		NC2	TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT								
Ascaris lumbricoides	*ITS1*	ITS F1	CGAGCAGAAAAAAAAAAGTCTCC	NA	94	30	50	45	72	45	45
		ITS R1	GGAATGAACCCGATGGCGCAAT								
		ITS F2	CGAGCAGAAAAAAAAAAAAGTCTCC	~500	94	30	52	30	72	30	35
		ITS R2	GCTGCGTTCTTCATCGAT								

ITS Internal transcribed spacer, *N* number of cycles, *NA* data not available

All PCR analyses started with 95 °C for 15 min and finished with 72 °C for 10 min

[a] Step 1: denaturation; Step 2: annealing; Step 3: elongation

chance. We ran a two-tailed Fisher's exact test for chimpanzees and gorillas separately, and for these two species pooled together. We excluded mandrills, mangabeys and *Cercopithecus* monkeys from this analysis due to the low number of samples collected. Using the same test, we compared the prevalence of infection with *Oesophagostomum* or *Necator* between male and female chimpanzees in Gabon (the only site where we had complete results for the amelogenine microsatellite analysis).

Results

Host species and individuals' genotypes

The 315 samples analysed in our study originated from six species: 65 from gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*), 222 from chimpanzee (*Pan troglodytes troglodytes*), 12 from mandrill (*Mandrillus sphinx*), nine from red-capped mangabey (*Cercocebus torquatus torquatus*), three from agile mangabey (*Cercocebus agilis*) and four from greater spot-nosed monkey (*Cercopithecus nictitans*). Based on the microsatellite analyses, both gorilla and chimpanzee samples corresponded to 65 and 222 different individuals, respectively. Among the 315 samples analysed, we obtained information on the sex of only 114 chimpanzees from Matakamangoye. Amelogenine gene analyses results indicated that 40 chimpanzee samples were from females and 74 from males. As the number of other cercopithecid primate samples was low and the host individuals were not genotyped, no statistical analyses could be performed on these samples. The number of samples collected and the NHP species distribution of these samples across sites is detailed in Table 2.

Prevalence of STH infections

The prevalence of all analysed STH taxa in gorillas and chimpanzees and the presence of these taxa in mandrills, mangabeys and greater spot-nosed monkeys is summarised in Table 2. *Oesophagostomum* was the most frequently occurring parasite, present in most of the NHP species investigated, with a prevalence of 78.5% (51/65) in gorillas and 70.7% (157/222) in chimpanzees. *Oesophagostomum* DNA was also commonly detected in other NHP host species, with the exception of greater spot-nosed monkeys (Table 2). *Necator* DNA was detected by PCR in roughly half of both gorilla and chimpanzee samples, 53.8% (35/65) and 45.0% (100/222) respectively, and in one of the four greater spot-nosed monkey samples. *Trichuris* was detected very rarely, in just two of the 222 chimpanzees (0.9%),

Table 2 Summary of results of PCR-positive individuals/samples with *ITS2* sequences exploitable for phylogenetic analyses

Locality	NHP species	*n*[a]	PCR-positive for *Necator* spp.	*ITS2* phylogeny *Necator* spp.	PCR-positive for *Oesophag.*sp.	*ITS2* phylogeny *Oesophagostomum.* spp.	PCR-positive for *Trichuris* spp.	*ITS2* phylogeny *Trichuris* spp.
Djoum (CAM)	Mandrill	12	0	–	8	3	0	–
	Red-capped mangabey	7	0	–	3	2	0	–
	Greater spot-nosed monkey	1	0	–	0	–	0	–
Somalomo (CAM)	Chimpanzee	23	20 (87.0%)	9	22 (95.7%)	17	0	–
	Gorilla	38	24 (63.2%)	1	38 (100%)	26	0	–
	Red-capped mangabey	2	2	0	2	1	0	-
	Greater spot-nosed monkey	2	1	0	2[b]	2[b]	1	1
Mambélé (CAM)	Chimpanzee	59	17 (28.8%)	10	34 (+ 1[b]) (57.6%)	22 (+ 1[b])	2 (3.4%)	1
	Gorilla	12	2 (16.7%)	1	8 (66.7%)	8	1 (3.7%)	1
	Agile mangabey	3	1	1	2	2	0	–
	Greater spot-nosed monkey	1	0	-	1[b]	1[b]	0	–
Lobéké NP (CAM)	Gorilla	15	9 (60.0%)	2	5 (33.3%)	1	0	-
Matakamangoye (GAB)	Chimpanzee	140	63 (45.0%)	50	101 (72.1%)	90		
Total		315	139(44.1%)	75	223 (+ 4[b]) (70.8%)	172 (+ 4[b])	4 (1.3%)	3

CAM Cameroon, GAB Gabon, *NHP* non-human primates, *NP* National Park

[a] *n* represents the number of individuals tested (chimpanzee, gorilla) or of samples tested (all other NHP species)

[b] Sequences of *Ternidens deminutus* not used in the phylogenetic tree

in one of the 65 gorillas (1.5%) and in one of the four greater spot-nosed monkey samples (Table 2). *Ascaris* was not detected in any of the analysed samples. In addition, PCR amplicons from assays targeting *Necator* and *Oesophagostomum* from a chimpanzee and three greater spot-nosed monkey samples were identified by BLAST sequence analyses as *Ternidens deminutus*.

In both gorillas and chimpanzees, the highest prevalence of *Oesophagostomum* and *Necator* was observed in Somalomo, Cameroon, followed by Matakamangoye, Gabon, and the lowest prevalence was observed in animals originating from Mambélé, Cameroon. Only gorilla samples were collected in the Lobéké NP, where the prevalence of *Necator* and *Oesophagostomum* reached 60.0 and 33.3% respectively.

Among the surveyed host species, gorillas were the species most infected by either *Necator*, *Oesophagostomum* or by both taxa (86.2%), followed by chimpanzees (81.5%). Mandrills were positive only for *Oesophagostomum*, greater spot-nosed monkeys were positive only for *Necator*, while both parasites were detected in red-capped and agile mangabeys. *Necator*/*Oesophagostomum* co-infections were detected in 30 gorillas (46.1%), in 76 chimpanzees (34.2%), in two red-capped mangabey samples and in one of three agile mangabey samples (Table 3).

Occurrence of *Oesophagostomum* and *Necator* co-infections in chimpanzees and gorillas

We first analysed chimpanzees and gorillas separately and observed that co-infection with *Oesophagostomum* and *Necator* occurred frequently, but that the association was not statistically significant. When the two NHP species were combined and analysed together, co-infections occurred more often than expected by chance (two-tailed Fisher's exact test: $p = 0.023$; Additional file 1: Table S1).

Parasitic infections according to the sex of the individual analysed

Sex was determined for 114 of the 140 chimpanzee samples from Gabon: 40 females and 74 males. The prevalence of *Oesophagostomum* or *Necator* did not differ significantly between males and females (two-tailed Fisher's exact test: $p = 0.645$ and 0.326, respectively; Additional file 1: Table S2).

Phylogenetic analyses

A total of 254 sequences of *Necator*, *Oesophagostomum*, *Ternidens deminutus* and/or *Trichuris* was obtained from 204 faecal samples (Table 2). The success rate of obtaining high-quality sequences from the PCR products was 53.9% for *Necator*, 77.1% for *Oesophagostomum* and *Ternidens deminutus* together and 75% for *Trichuris*. Sequences generated in this study that represent unique haplotypes were deposited in GenBank (Accession numbers given in Additional file 2: Table S1-B, S2-B and S3). Table 4 provides an overview of the different parasite species detected in the NHP hosts according to the study site, with haplotypes listed when applicable, and the number of individuals/samples for which sequences were obtained.

Necator

Of 139 *Necator* PCR-positive samples, we obtained 75 high-quality partial sequences of the ITS2 region (138–273 bp). These sequences originated from 19 chimpanzees, five gorillas and one agile mangabey sample from Cameroon, and from 50 chimpanzees from Gabon (Additional file 2: Table S1-B). A total of five different variants (NH1–NH5) of ITS2 was detected; of these (NH1–NH4 differed by three single nucleotide polymorphism (SNP) positions, and haplotype NH5 differed from the others by 3.7–5.6%. Two genotypes (NH3, NH4) had one ambiguous nucleotide "Y" that differed in its position within the alignment. Minimal differences were

Table 3 *Necator* and *Oesophagostomum* PCR-positive individuals (gorilla, chimpanzee)/samples (other NHP)

Host	*n*	PCR-positive *Necator* only	PCR-positive *Oesophagostomum* only	*Necator*/*Oesophagostomum* co-infections	*Necator* OR *Oesophagostomum* OR both parasites
Chimpanzee	222	100 (45%)	157 (70.7%)	76 (34.2%)	181 (81.5%)
Gorilla	65	35 (53.8%)	51 (78.5%)	30 (46.1%)	56 (86.2%)
Mandrill	12	0	8	0	8
Red-capped mangabey	9	2	5	2	5
Agile mangabey	3	1	2	1	2
Greater spot-nosed monkey	4	1	0	0	1
Total	315	139	223	109	253

Values in table are presented as the number (*n*) of animals with the percentage of total given in parentheses where appropriate

observed among variants NH1–NH4; therefore, these will be referred to as haplogroup NH1-4. Haplotype NH1 ($n=14$) was detected in gorillas and chimpanzees from both Gabon and Cameroon (Lobéké and Mambélé), while haplotype NH2, the most frequent haplotype ($n=32$), was detected only in chimpanzees from both countries. Variants NH3 and NH4 were both represented by a single sequence and both were detected in chimpanzee samples from Mambélé, Cameroon. Haplotype NH5 was found in a single chimpanzee sample from Matakamangoye, Gabon. Unfortunately, 26 sequences were too short to be assigned to one particular haplotype; 23 of these sequences were identical to both NH1 and NH2 (comprising sequences from two gorillas from Mambélé and Lobéké, one agile mangabey sample from Mambélé and 21 chimpanzees from different study sites), and three were identical to NH1, NH2 or NH4 (2 chimps and a gorilla from Somalomo).

Nine *Necator* sp. sequences representing all five variants/haplogroups were combined in a final alignment of 310 bp, comprising a total of 40 sequences (31 accessed from GenBank) of *Necator* spp. and two additional sequences of *Bunostomum trigonocephalum* (GenBank accession numbers AY439022, MG182023) added as an outgroup. The complete list of sequences and their assignment to haplogroups can be found in Additional file 2: Tables S1-A and S1-B. The ML phylogenetic tree was computed by the HKY + F model. The resulting tree showed two distinct clades, with the first comprising only *N. americanus* sequences, originating mainly from humans, and the second comprising only sequences labelled as *Necator* sp., originating predominantly from NHP, which were further divided in two sub-clades (Fig. 2). Our haplotype NH5 sequence clustered very closely with a sequence of *Necator* sp. type III (AB793535) published by Hasegawa et al. [17] that originated from a human from the Central African Republic (CAR). All sequences representing the other haplogroup (NH1–NH4) clustered in a different sub-clade, although the node was not strongly supported. This sub-clade also comprised sequences of *Necator* sp. originating from chimpanzees (Uganda),

Table 4 Occurrence of different species of *Necator*, *Oesophagostomum*, *Trichuris* and *Ternidens* according to the NHP sampled and the collection location

Parasite Locality	NHP species[a]	*Necator* type II[b]	*Necator* type III[b]	*O. stephanostomum*[b]	*O. bifurcum*[b]	*Oesophagostomum* spp.[b]	*Trichuris* spp.[b]	*Ternidens deminutus*[b]
Djoum (CAM)	Mandrill $n=3$	–	–	–	–	3 OH15	–	–
	Red-capped Mangabey $n=2$	–	–	–	1 OH9,12	1 OH13	–	–
Somalomo (CAM)	Chimpanzee $n=17$	9 NH2, 1/2, 1/2/4	–	14 OH1,2,4,5	3 OH9,10,11	-	–	–
	Gorilla $n=26$	1 NH2/4	–	26 OH1,2,3,5,7,8	–	-	–	–
	Red-capped Mangabey $n=1$	–	–	–	–	1 OH13,14	–	–
	Greater spot-nosed monkey $n=2$	–	–	–	–	–	1	2
Mambélé (CAM)	Chimpanzee $n=30$	10 NH1,2,3,4	–	21 OH1,2,3,4,5	1 OH9	–	1	1
	Gorilla $n=8$	1 NH1/2	–	8 OH1,2,3	–	–	-	–
	Agile Mangabey $n=2$	1 NH1/2	–	2 OH1,3	–	–	-	–
	Greater spot-nosed monkey $n=1$	-	–	–	–	–	-	1
Lobéké NP (CAM)	Gorilla $n=4$	3 NH1,1/2	–	1 OH1	–	–	1	–
Matakamangoye (GAB)	Chimpanzee $n=108$	49 NH1,2	1 NH5	90 OH1,2,3,4,5,6,16	–	–	–	–
Total		74	1	162	5	5	3	4

[a] *n* is the number of individuals (gorilla, chimpanzee) or samples (other NHP) from which exploitable sequences were obtained

[b] Numbers indicate the number of high-quality partial sequences of the ITS2 region (138–273 bp) obtained. Haplotypes are shown where applicable

gorillas (Gabon, CAR) and a human from CAR [17, 50]. Hasegawa et al. [17] labelled this taxon as *Necator* sp. type II.

Oesophagostomum

Of 227 *Oesophagostomum* PCR-positive samples we obtained 176 high-quality partial sequences of the ITS2 region (171–174 bp). These sequences were subsequently unfolded to 214 phased sequences belonging to 17 unique haplotypes, labelled OH1–17. The list of sequences and their assignment to haplotypes is provided in Additional file 2: Table S2-B. Thirteen sequences were too short to be distinguished as either haplotype OH1 or OH2. All haplotypes but one had some *Oesophagostomum* species as the closest match in BLAST. The haplotype OH17 (4 sequences) had a 100% match with a sequence of *Ternidens deminutus* (AJ888729). This haplotype comprised sequences originating from a chimpanzee and one greater spot-nosed monkey from Mambélé and two greater spot-nosed monkey samples from Somalomo in Cameroon. The remaining 16 *Oesophagostomum* haplotypes, together with other available *Oesophagostomum* spp. sequences ($n=45$), were used to create an alignment (175 bp) to build a ML tree using model K2P + G4. Five sequences of *O. dentatum* served as the outgroup. The list of GenBank sequences used in this analysis is provided in the Additional file 2: Table S2-A.

In the phylogenetic tree, haplotypes OH9–12 originating from four chimpanzees and one mangabey sample clustered in a strongly supported clade with all *O. bifurcum* sequences (Fig. 3). Our four haplotypes differed from each other by 0.6–1.1%, with the pairwise sequence distance (PSD) within the whole *O. bifurcum* clade ranging from 0.6 to 4.6%. These four haplotypes originated from Cameroon only. Haplotypes OH10 and OH11 came from three chimpanzees from Somalomo, haplotype OH12 came from a red-capped mangabey from Djoum and haplotype OH9 was detected in two chimpanzees from Somalomo and one from Mambélé, and the last one came from a red-capped mangabey from Djoum (Additional file 2: Table S2-B).

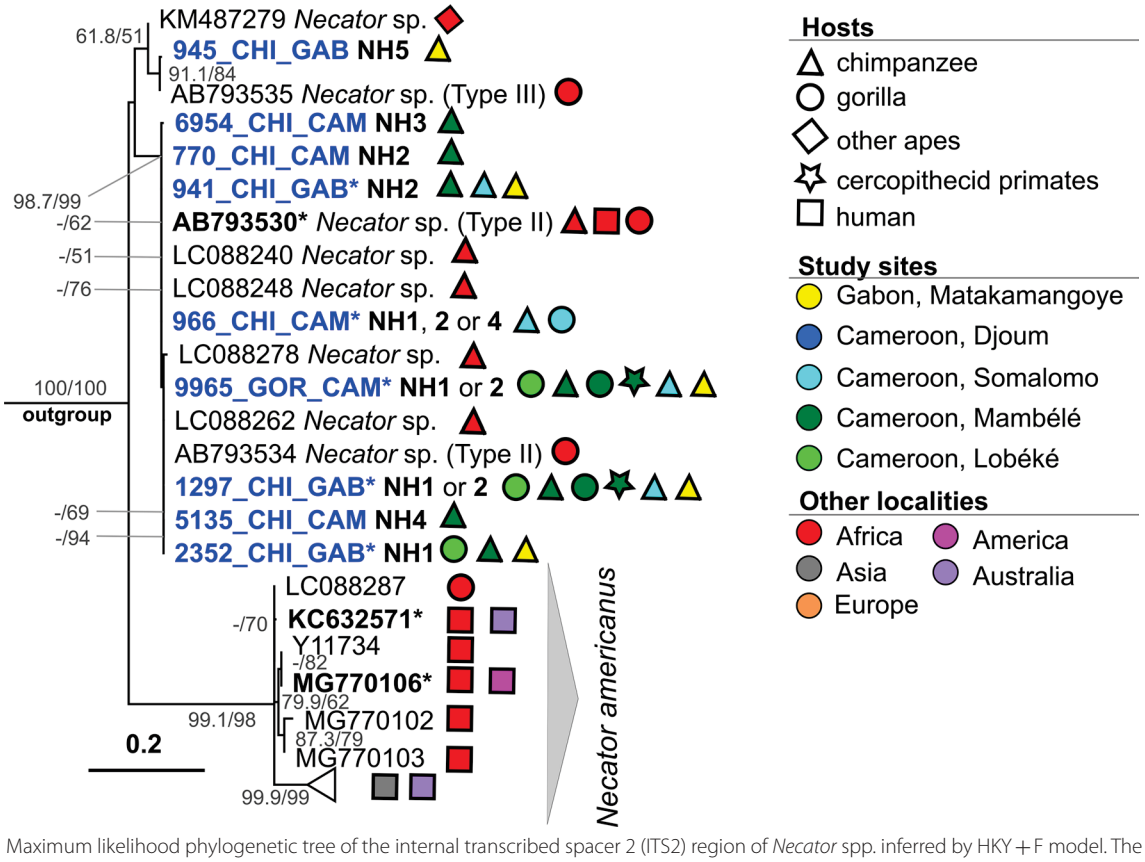


Fig. 2 Maximum likelihood phylogenetic tree of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) region of *Necator* spp. inferred by HKY + F model. The phylogeny was tested by the SH-aLRT nonparametric test (left) and ultrafast bootstrap (right) in 1000 replicates. Only values > 50 (in %) are shown. Sequences originating from this study are given in blue. Sequences in bold and those marked with an asterisk indicate haplogroups comprising multiple sequences

Haplotypes OH1–8 and OH16 clustered in a strongly supported clade comprising sequences of *O. stephanostomum* (Fig. 3). These haplotypes originated from all our study localities except Djoum and were detected in gorillas, chimpanzees and two agile mangabey samples (Mambélé, Cameroon) (Additional file 2: Table S2-B). These haplotypes differed from each other by 0.6–2.9%, and the overall PSD in the whole clade reached 6%. Finally, haplotypes OH13–15, which clustered with sequences of *Oesophagostomum* spp. originating from different cercopithecid monkeys and humans from Uganda, formed a clade separated and quite distant from *O. stephanostomum*, supported only by the SH-like approximate likelihood ratio test and not by bootstrap (Fig. 3). Our haplotypes originated from two red-capped mangabey samples from Somalomo and Djoum, and three mandrill samples from Djoum (Additional file 2: Table S2-B). Haplotypes OH13–15 differed by 0.6–2.9%, which is also the PSD range for the whole clade. Our haplotypes from *O. bifurcum* clade (OH9–12) differed from *O. stephanostomum* haplotypes OH1–8 and OH16 by 1.7–4.6% and from *Oesophagostomum* spp. haplotypes by 5.2–8%. A similar difference was observed between our *O. stephanostomum* and *Oesophagostomum* spp. haplotypes, varying between 4.6 and 8%.

Trichuris

In one PCR-positive sample, the sequencing of *Trichuris* was not successful. The region spanning the ITS1, 5.8S and ITS2 (467–703 bp) was amplified from three samples originating from a gorilla, a chimpanzee and a greater spot-nosed monkey from Lobéké, Mambélé and Somalomo, Cameroon, respectively. All three sequences were identical in the 416-bp overlapping region of ITS2. The final alignment of 625 bp from the ITS region used for phylogenetic analysis comprised 113 sequences of *Trichuris* spp. A sequence of *T. vulpis* (GenBank Accession number AM234616) was used as an outgroup. The complete list of sequences and their assignment to haplogroups is given in Additional file 2: Table S3. In the phylogenetic tree computed by the TN + F + R2 model, our sequences clustered in a strongly supported clade containing sequences of *T. trichiura* and *Trichuris* spp. originating from humans and NHP, such as *Pan troglodytes*, *Cercopithecus* spp., *Colobus* spp., *Papio* spp., *Chlorocebus aethiops* and *Procolobus rufomitratus* from Uganda, Cameroon, South Africa and some European zoos (Fig. 4; Additional file 3: Figure S1).

Co-infections confirmed by sequencing results

Of the 76 chimpanzees in which co-infection with *Oesophagostomum* and *Necator* was detected by our optimised PCR assay, we obtained sequences exploitable for phylogenetic analyses for 43 of them, corresponding to a 56.6%f success rate; for gorillas, we obtained only two high-quality pairs of sequences from 30 PCR-positive samples for both of these parasites. The remaining sequences were not included in the alignments used in the ML phylogenetic analyses because they were of lower quality (< 138 bp) or displayed a background noise with too many unresolved degenerated nucleotides. However, PCR results clearly displayed two separate bands corresponding to the amplicon sizes expected for *Necator* and *Oesophagostomum.*

Co-occurrence of *O. stephanostomum* and *Necator* sp. type II was quite common and was detected in 33 chimpanzees from Matakamangoye, Gabon, seven chimpanzees and one gorilla from Somalomo, Cameroon and one chimpanzee and one gorilla from Mambelé, Cameroon. Co-infection with *O. bifurcum* and *Necator* sp. type II occurred in one chimpanzee from Matakamangoye, Gabon, and in one chimpanzee from Mambelé, Cameroon. In one greater spot-nosed monkey sample from Somalomo, Cameroon, the presence of *Trichuris* sp. and *Ternidens deminutus* was detected. Finally, one gorilla in Lobéké NP, Cameroon, tested positive for *Trichuris* sp. and *Necator* sp. type II. A check-list of co-infections confirmed by sequencing is provided in Additional file 1: Table S3.

Discussion

To the best of our knowledge, this is the first study to assess the prevalence and genetic diversity of STH in these regions of Cameroon and Gabon. Our results show that the prevalence of *Oesophagostomum* and *Necator* was relatively high in gorillas and chimpanzees; in contrast, *Trichuris* infection was low and *Ascaris* was absent. Previous studies of free-ranging gorillas from Dzanga Sangha Protected Areas, CAR and the Moukalaba-Doudou NP, Gabon, reported a similar prevalence of *Necator* and *Oesophagostomum* [27, 51]. *Trichuris* and *Ascaris* have also been detected in gorillas in Gabon and Rwanda, but at very low prevalence [51, 52]. In chimpanzees, the prevalence of *Necator* and *Oesophagostumum* was reported at relatively high rates in chimpanzee populations living in primary and secondary forest habitats in Lopé, Gabon [23]; Dzanga-Ndoki, CAR [53]; Budongo [54], Sebitoli, [7], Kibale [6, 19, 28] and Bulindi [18, 55], Uganda; Gombe [56, 57] and Mahale [13], Tanzania. This was not the case for chimpanzees living in dry savanna habitats, where conditions for the survival and transmission of parasites with free-living stages are more difficult [53, 58]. *Trichuris* and *Ascaris* infections have been detected at a low (< 10%) or very low prevalence [23, 28, 53, 56, 59–61], with the exception of a chimpanzee

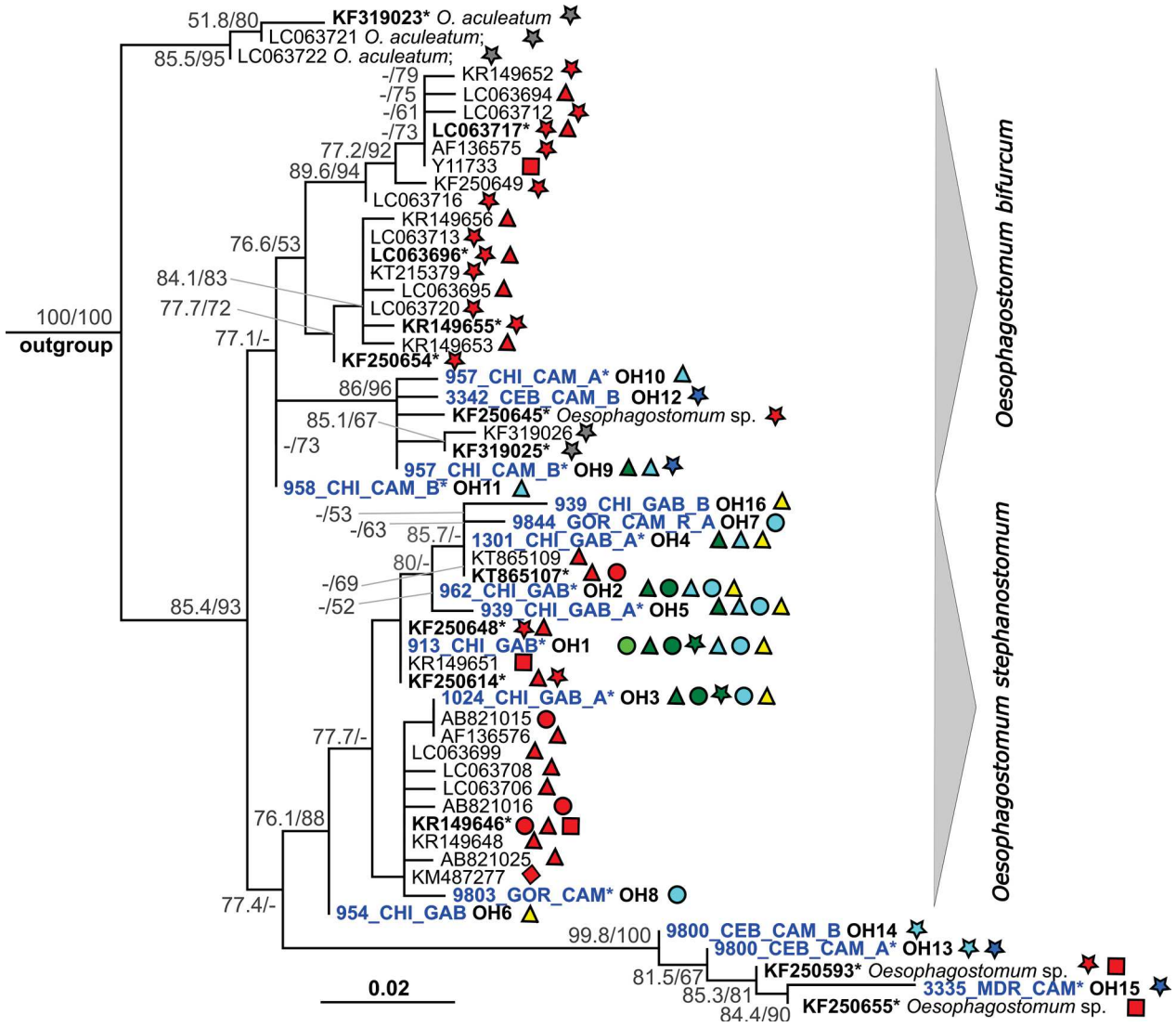


Fig. 3 Maximum likelihood phylogenetic tree of the ITS2 region of *Oesophagostomum* spp. inferred using model K2P + G4. The phylogeny was tested by the SH-aLRT nonparametric test (left) and ultrafast bootstrap (right) in 1000 replicates. Only values > 50 (in %) are shown. Sequences originating from this study are given in blue. Sequences in bold and those marked with an asterisk indicate haplogroups comprising multiple sequences. Symbols and colour codes are as described in Fig. 2 caption

community in Mahale, Tanzania [54] and one in Cantanhez NP, Republic of Guinea Bissau [62]. However, due to the variety of different detection techniques used in these studies (microscopy and molecular analyses), the results of the majority of these studies are not directly comparable, thereby making it difficult to assess and understand meaningful differences both within and between populations. In our study, *Oesophagostomum* was detected in all NHP species with the exception of the greater spot-nosed monkeys, while *Necator* was detected in the greater spot-nosed monkey and both mangabey species but not in mandrills. As we analysed only a limited number of samples from these NHP species, we were not able to compare our results with those from previously published studies and, therefore, we cannot speculate on whether arboreal monkeys have a lower exposure to infective larvae or eggs than the more terrestrial NHP. Among the NHP species we investigated, only the greater spot-nosed monkeys are almost exclusively arboreal; all of the other species are semi-terrestrial to varying degrees [63, 64], with gorillas being primarily terrestrial. Previous research reported a 41% *Oesophagostomum* prevalence in arboreal red colobus monkeys compared to 100%

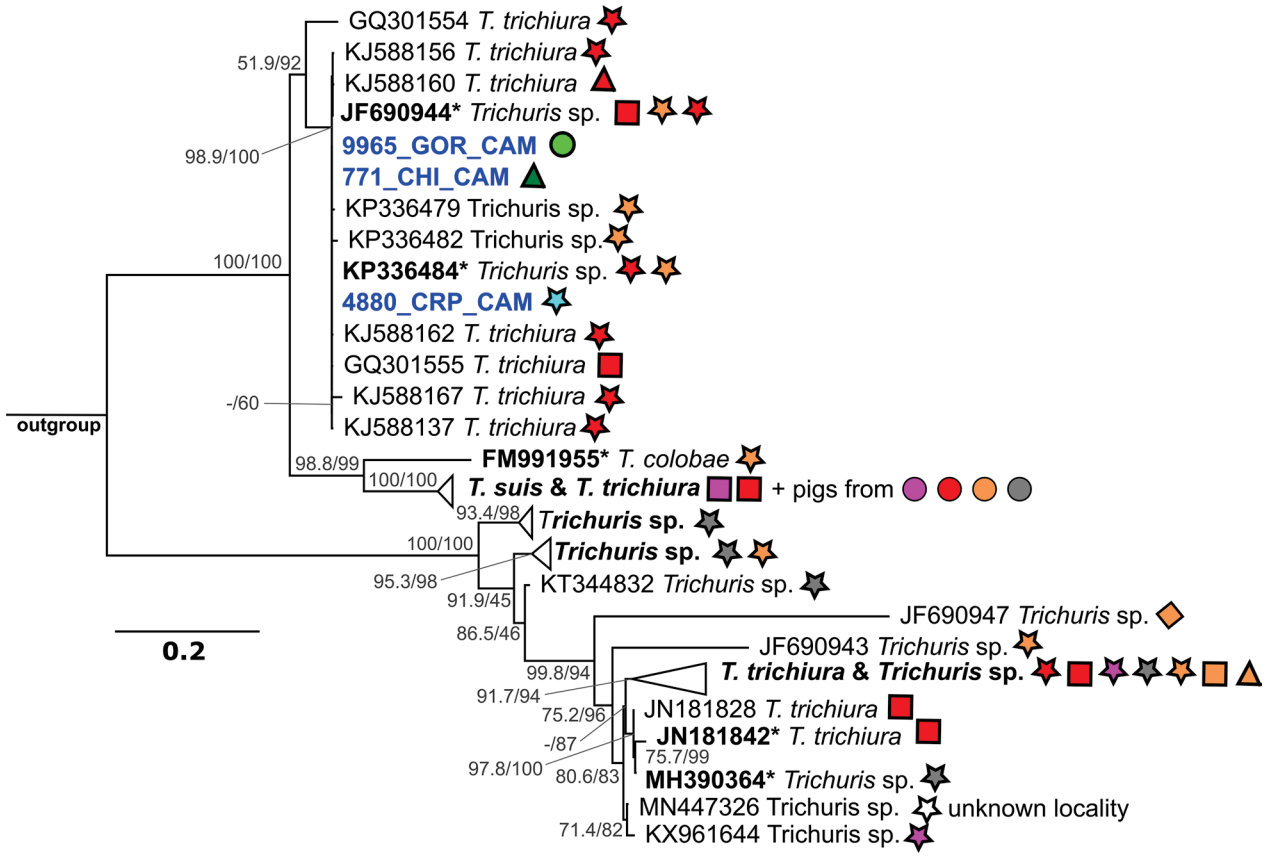


Fig. 4 Maximum likelihood phylogenetic tree of the ITS2 region of *Trichuris* spp. inferred using the TN + F + R2 model. The phylogeny was tested by the SH-aLRT nonparametric test (left) and ultrafast bootstrap (right) in 1000 replicates. Only values > 50 (in %) are shown. Sequences originating from this study are given in blue. Sequences in bold and those marked with an asterisk indicate haplogroups comprising multiple sequences. Symbols and colour codes are as described in Fig. 2

prevalence observed in sympatric chimpanzees, in Kibale NP, Uganda [15]. However, other factors (phylogenetic proximity, social structure and interactions, co-infection with other parasites, etc.) may contribute to determine susceptibility, as reported in the study conducted at Mahale Mountains NP, Tanzania where *Oesophagostomum* was present in all examined NHP species but prevalence was higher in arboreal red-tailed monkeys and red colobus compared to baboons [65].

We did not observe any sex difference in the prevalence of *Oesophagostomum* spp. and *Necator* spp. in chimpanzees. In this aspect, our results corroborate those of other epidemiological investigations in wild NHP [6, 27, 28, 30, 56]. However, sex differences in parasitic infection are commonly observed in many animals [32] although infection rates can fluctuate according to seasons. Other factors, such as breeding, hunting season and territory defence, can increase stress and have an impact on the immunity level of animals and on their susceptibility to parasitic infections [32, 66, 67].

In our study sites in Cameroon and in Gabon, and, in general, across an increasing number of territories, NHP are found in degraded forests and plantations or farmed landscapes near human settlements. Even national parks struggle to limit human activities, such as timber extraction, non-timber resource exploitation and hunting. In the Lobéké NP, for example, 443,825 hectares are set aside for sport hunting and another 271,945 hectares for community-managed hunting [68], and the BaAka people are allowed to go into the park to fish and harvest non-timber forest products. Somalomo, a small town (approx. 1000 inhabitants) located in the East Region of Cameroon, near the border with the Centre and South Regions, at the edge of the Dja Faunal Reserve, was the site in our study with the highest infection for both *Oesophagostomum* and *Necator* in chimpanzees and gorillas. Despite the anthropogenic pressure exerted on all territories, we did not find a single NHP infected with *Necator americanus,* a typical human parasite. However, we cannot exclude the possibility that *N. americanus*

occurred in our study populations. A next-generation sequencing approach may allow the detection of co-infections with different *Necator* species and improve the quality of the sequences obtained. Possible events of zoonotic transmission of *N. americanus* have been previously reported in gorillas, chimpanzees and other NHP [69–72]. Hasegawa and colleagues [17] provided the first molecular evidence that *N. americanus* parasitises wild western lowland gorillas, but at a much lower prevalence than reported in humans; it was also the first study to report the identification of *Necator* species other than *N. americanus* in humans. These authors proposed that the worms with *cox1* of groups B or C (and ITS types II or III) are species distinct from *N. americanus* and concluded that the infective larvae examined corresponded to other hookworms previously described in the great apes, i.e., *N. congolensis*, *N. exilidens* or *N. gorillae* [73, 74]. The *Necator* we detected clearly belong to the type II species and one specimen also probably belonged to the type III species. Type II *Necator* was detected in one sample of agile mangabey in Mambélé, which expands the spectrum of hosts to cercopithecid monkeys.

For nodular worms, we found three different clades that probably represent three separate species among our surveyed NHP. The majority of our sequences belonged to nine haplotypes (OH1–OH8, plus OH16) that clustered with *O. stephanostomum.* The species was detected in both great ape species at all study sites in most of the tested samples and, in addition, in two agile mangabey samples from Mambélé. Within the study sites, we found an apparent sharing of certain haplotypes among NHP hosts, especially OH1, which was detected in all host species and at all study sites. On the other hand, it is possible that some haplotypes are site- or host-specific (e.g. OH16 was found only in Gabon; OH7 and OH8 were found only in gorillas; and OH5 was found only in chimpanzees).

Our findings confirm that *O. stephanostomum* is the predominant species in great apes [6, 7, 15, 55, 75]. This species seems to be specific to NHP, as previous studies in Gabon, Democratic Republic of the Congo and CAR failed to find zoonotic infections with *O. stephanostomum* in humans living in sympatry with infected chimpanzee or gorilla populations [10, 27, 51]. However, some zoonotic transmission may be possible, as shown by a study from Uganda [7].

A second clade clustering with *O. bifurcum* included four haplotypes (OH9–12) detected in chimpanzees and a red-capped mangabey at three study sites in Cameroon. Haplotype OH9 was found at all three study sites in both host species. In contrast to *O. stephanostomum*, human infection with *O. bifurcum* is well documented, but the records are mostly restricted to northern Togo and northern Ghana [76]. This parasite has a zoonotic potential, as proven in a study which demonstrated the susceptibility of rhesus monkeys to infection with *O. bifurcum* isolated from humans, albeit at low levels [77]. Interestingly, studies from Kibale NP in Uganda [7, 15] show the transmission of *O. stephanostomum* and one undetermined *Oesophagostomum* species among sympatric NHP and humans, while no *O. bifurcum* was found in humans. No *O. bifurcum* was detected in our gorilla samples, corroborating the results of a previous study from Gabon where only a single population of *O. stephanostomum*, with notable molecular variations, was prevalent in western lowland gorillas [51]. Past studies have shown that *O. bifurcum* is rarely found in great apes, but it is common in other NHP species [55]. A study conducted in the CAR reported a high prevalence of this strongylid in mangabeys but a low relative abundance in gorillas and chimpanzees [27]. Mixed infections with *O. stephanostomum* and *O. bifurcum* have been reported in chimpanzees in Bulindi NP and Kibale NP [6, 7, 55]. In our samples, we did not detect this co-infection.

Lastly, our haplotypes OH13–OH15, found in mandrills from Djoum and in a red-capped mangabey from Somalomo, Cameroon, clustered with an undetermined *Oesophagostomum* sp. These haplotypes probably represent a separate species, and they cluster with sequences sampled in a survey from Kibale, Uganda, where this *Oesophagostomum* sp. strain, shared by different cercopithecid monkeys and humans, was first reported [15]. Further studies are clearly needed to clarify the phylogenetic relationship among *Oesophagostomum* species infecting African human populations and NHP.

Four sequences, originating from a chimpanzee and one greater spot-nosed monkey from Mambélé, and two greater spot-nosed monkey samples from Somalomo, Cameroon, matched with a sequence of *Ternidens deminutus* (data not shown). *Ternidens* infections of monkeys, chimpanzees, gorillas and baboons have been reported throughout sub-Saharan Africa and Asia [27, 78]. *Ternidens deminutus* is thought to be a zoonosis acquired from NHP, although some "spillback" from humans to monkey populations may also occur in some areas [79]. The possible presence of multiple cryptic species has been suggested, with a human-specific haplotype of the parasite existing alongside several host-specific NHP genotypes. This theory is supported by the analogous presence of several host-specific haplotypes, including a human-specific haplotype, in the genetically similar helminth species *O. bifurcum* [80]. Ternidensiasis most commonly has a similar clinical picture as oesophagostomiasis, with multiple intestinal abscess nodules or helminthomas of the large intestine [79].

Finally, we found evidence of a significant overabundance of co-infections with *Oesophagostomum* and

Necator, corroborating previous observations of co-infections in chimpanzees with hookworms and nodular worms in Uganda [18, 27]. Indeed, the relative overabundance of parasite co-infection appears to be common in many host species [81, 82]. In fact, our results may underestimate the actual number of co-infections because conventional PCR followed by Sanger sequencing has its limitations in terms of discriminating between the presence of multiple strongylid species/lineages in a single sample. The low rate of high-quality sequences we obtained may also be explained by the presence of parasite co-infections in the samples analysed.

Regarding the health impact of these STH on their host, hookworms produce wounds that will constantly bleed by using their buccal capsules to attach to the mucosal surfaces of the host's small intestine [83, 84]. In addition to blood loss, this process is responsible for secondary bacterial infections and significant inflammation in the mucosae, impairing digestion and absorption [85]. Therefore, the main adverse effects of these hematophagous parasites recorded in humans, domestic animals and wildlife species are anaemia, retarded growth, secondary bacteraemia and mortality [83, 85–88]. *Oesophagostomum* infections are responsible for oesophagostomiasis, an uninodular or multinodular disease with symptoms in NHP raised in sanctuaries (acute weakness and abdominal pain, vomiting, diarrhoea and weight loss) that are similar to those recorded in severely ill human patients [89]. Bowel obstruction, nodule rupture resulting in peritonitis, hepatic complications, among others are the signs observed during post-mortem examinations of captive chimpanzees and gorillas [90, 91]. In the wild, the health impact of nodular worm infection in NHP has been found to be variable. On the one hand, pathologic lesions associated with *Oesophagostomum* spp. infection have been described in wild chimpanzees from Kibale NP and Mahale in Uganda (*Pan troglodytes schweinfurthii*), Taï NP in Cote d'Ivoire (*Pan troglodytes verus*) and Gombe NP in Tanzania (*Pan troglodytes schweinfurthii*) [13, 14, 92]. In Gombe NP, chimpanzees suffered from weight loss and other clinical signs suggestive of significant infections [14]. On the other hand, in other NHP populations, *Oesophagostomum* infections did not appear to affect the host's overall health [92]. With the exceptions mentioned above, the rarity of overt clinical signs of disease linked to specific intestinal parasites in wild apes suggests that infections by many species are tolerated and/or mediated by self-medicative behaviours, such as leaf swallowing [13, 18, 92, 93]. Clinical differences between free-ranging and (semi-) captive populations could be explained by differences in stress level, limited space, proximity of individuals, deworming procedures, infection with human strains, closer monitoring and the easier diagnosis in NHP living in sanctuaries [92]. Given the perspective of a shrinking natural habitat combined with the increasing sharing of habitat between humans and NHP, these pathologies represent a major threat to human and NHP health.

Among the 315 samples tested, only four (one gorilla, two chimpanzees and a greater spot-nosed monkey) were positive for *Trichuris* sp. Three sequences were exploitable and clustered together with *T. trichiura* and *Trichuris* spp. originating from humans and other NHP. The low prevalence detected is comparable with that recorded for chimpanzees in many other localities [13, 23, 60, 94]. However, some notable exceptions of high prevalence of infection have been reported in chimpanzee populations in Cantanhez NP in Guinea-Bissau (15% prevalence) and at Mont Assirik in Senegal (50% prevalence) [62, 95]. Other studies focused primarily on the genetic diversity of this nematode, mostly from captive settings with only a few more reporting low prevalence in the wild NHP populations studied [16, 21, 96, 97]. For a long time, *T. trichiura* has been described as a species with low host specificity, infecting human and NHP alike; recent studies have brought to light the existence of multiple lineages, probably cryptic species, of *Trichuris* that seem to be more host specific than expected [98]. Additionally, two species of *Trichuris* were recently described in NHP, namely *T. colobae* from *Colobus guereza kikuyensis* [99] and *T. ursinus* from *Papio ursinus* [100].

We did not detect any *Ascaris* sp. in any of the wild NHP species analysed, corroborating the results of previous research. Roundworms of the genus *Ascaris* are frequently found in captive chimpanzees but are not common in their wild counterparts [101, 102]. Altogether, parasites such as *Trichuris* and *Ascaris* seem to be almost absent (or occur at low prevalence) in the wild, contrary to what has been observed in captive gorillas both in zoos and sanctuaries [103].

Conclusions

This study reports new information on the occurrence and genetic diversity of STH infecting six different NHP species living in Cameroon and Gabon. Spillover and spillback processes may play an important role in the maintenance of STH burden at the human–wildlife interface. Our results highlight the need for a better understanding of potential parasite-sharing between humans and NHP. On the one hand, a sylvatic STH reservoir could increases the risk of infection, particularly among human populations living in close proximity to NHP; on the other hand, proximity to human settlements may pose a threat to NHP health by facilitating the transmission of STH species or strains with lower host specificity. For STH diagnostics, molecular

assays appear to be more sensitive for species identification than microscopy, particularly at low infection intensities [104, 105]. To demonstrate similarities and differences in STH infecting humans and NHP, extensive sequencing of both human and NHP isolates will need to be performed. While current molecular assays targeting ribosomal and mitochondrial sequences have vastly improved the sensitivity of the diagnosis of STH infections, some DNA markers often lack the specificity required to discriminate between different species within the same genus, which is crucial in studies of parasite-sharing across different host species. The recent development of next-generation sequencing-based DNA analysis applicable to primate parasites [106–108] allows these complex communities to be identified and described; moreover, this methodology approach should be used more extensively, as it is capable of detecting rare and cryptic species. In conclusion, calls for better control of STH require an improved understanding of their epidemiology, genetic diversity and degree of zoonotic transmission.

Abbreviations

BIC: Bayesian information criterion; BLASTn: Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool; CAR: Central African Republic; DJ: Djoum; ITS (1, 2): Internal transcribed spacer (1, 2); LB: Lobéké National Park; MB: Mambélé; MKT: Matakamangoye; mtDNA: Mitochondrial DNA; NHP: Non-human primates; NP: National Park; PSD: Pairwise sequence distance; SIV: Simian immunodeficiency virus; SOM: Somalomo; STH: Soil-transmitted helminths.

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at https://doi.org/10.1186/s13071-021-04855-7.

Additional file 1: Table S1. Number of chimpanzees, gorillas or the two species combined, positive or negative for *Oesophagostomum* spp. co-infected or not with *Necator* spp. (values under the null hypothesis of co-infections occurring more often than expected by chance are shown in parentheses). **Table S2.** Number of male and female chimpanzees positive or negative for *Oesophagostomum* spp. and for *Necator* spp. (expected values under the null hypothesis of no sex difference are shown in parentheses). **Table S3.** Check-list of co-infections confirmed by sequencing.

Additional file 2: Table S1-A. List of *Necator* spp. ITS2 sequences from GenBank used in this study and their assignment to haplogroups, together with the information on the host and locality. The sequences in bold are representatives for the given haplogroup and were used in the phylogenetic tree. **Table S1-B.** List of *Necator* spp. ITS2 sequences generated in this study and their assignment to the haplogroups, together with the information on the host and locality. **Table S2-A.** List of *Oesophagostomum* spp. ITS2 sequences from GenBank used in this study and their assignment to haplogroups, together with the information on the host and locality. The sequences in bold are representatives for the given haplogroup and were used in the phylogenetic tree. **Table S2-B**. List of *Oesophagostomum* spp. ITS2 sequences generated in this study and their assignment to the haplogroups, together with the information on the host and locality. The sequences in bold are representatives for the given haplogroup and were used in the phylogenetic tree. **Table S3.** List of *Trichuris* spp. ITS2 sequences from GenBank, the sequences from this study and their assignment to the haplogroups, together with the information on the host and locality. The sequences in bold are representatives for the given haplogroup and were used in the phylogenetic tree.

Additional file 3: Figure S1. Maximum likelihood phylogenetic tree of ITS2 region of *Trichuris*-non-collapsed.

Acknowledgements

We are grateful to the staff of the SIV team from PRESICA and tp the Cameroonian Ministry of Public Health and Ministry of Environment and Forestry. We thank Alain-Prince Okouga, Philippe Engandja and Vanina Boué for technical and logistic support in Gabon; the Ministry of Water and Forests of Gabon and Colette Gaillard for technical support; and Johnny Vlaminck (Department of Virology, Parasitology and Immunology, Ghent University, Merelbeke, Belgium) for providing positive control samples.

Authors' contributions

SL conceived and designed the experiments. HH, CS, CB, TL, AE and SL performed the experiments. CS, BC, TL and SL analysed the data. IMM, FL, MP and EMN contributed reagents/materials/analysis tools. CS, BC, KJP, MB and SL wrote the paper, with contributions from all authors. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This work was supported in part by Grants from the National Institute of Health (RO1 AI 50529), the Agence Nationale de Recherches sur le SIDA et les Hépatites virales (ANRS 12125/12182/12325), the Centre Interdisciplinaire de Recherches Médicales de Franceville (CIRMF) and the Institut de Recherche pour le Développement (IRD). S Locatelli received a grant for PhD research from the Méditerranée Infection Foundation. KJ Petrželková and B Červená were supported by the Czech Science Foundation (Grant #18-24345S).

Availability of data and materials

All data generated or analysed during this study are included in this published article (and its Additional files). We deposited all newly generated sequences from this study in GenBank under accession numbers MW528535–MW528543 and MW621486–MW621493 for *Necator* spp., MW528465–MW528480 and MW621343–MW621355 for *Oesophagostomum* spp., MW528545–MW528547 for *Trichuris* sp. and MW617064–MW617066 for *Ternidens deminutus*.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Non-human primate faecal samples were collected non-invasively, around nests, food sites, or on traces, on the forest floor.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors have declared that they have no competing interests.

Author details

[1]Institut de Recherche Pour Le Développement (IRD), UMI 233-TransVIHMI-INSERM U1175–University of Montpellier, Montpellier, France. [2]Institute of Vertebrate Biology, Czech Academy of Sciences, Květná 8, 603 65 Brno, Czech Republic. [3]Department of Pathology and Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Veterinary Sciences Brno, Brno, Czech Republic. [4]Projet Prévention du Sida Au Cameroun (PRESICA) and Virology Laboratory IMPM/IRD, Yaoundé, Cameroon. [5]Centre Interdisciplinaire de Recherches Médicales de Franceville, BP 769, Franceville, Gabon. [6]Present Address: Institut de Recherche Pour Le Développement (IRD), Maladies Infectieuses Et Vecteurs : Écologie, Génétique, Évolution et Contrôle (MIVEGEC), IRD 224-CNRS 5290–University of Montpellier, Montpellier, France. [7]Biology Centre, Institute of Parasitology, Czech Academy of Sciences, Ceske Budejovice, Czech Republic.

Received: 22 February 2021 Accepted: 18 June 2021
Published online: 05 July 2021

References

1. Wolfe ND, Dunavan CP, Diamond J. Origins of major human infectious diseases. Nature. 2007;447(7142):279–83. https://doi.org/10.1038/nature05775.
2. Calvignac-Spencer S, Leendertz SA, Gillespie TR, Leendertz FH. Wild great apes as sentinels and sources of infectious disease. Clin Microbiol Infect. 2012;18(6):521–7. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03816.x.
3. Junker J, Blake S, Boesch C, Campbell G, Du TL, Duvall C, et al. Recent decline in suitable environmental conditions for African great apes. Divers Distrib. 2012;18(11):1077–91.
4. Hockings KJ, McLennan MR, Carvalho S, Ancrenaz M, Bobe R, Byrne RW, et al. Apes in the Anthropocene: flexibility and survival. Trends Ecol Evol. 2015;30(4):215–22. https://doi.org/10.1016/j.tree.2015.02.002.
5. Legesse M, Erko B. Zoonotic intestinal parasites in *Papio anubis* (baboon) and *Cercopithecus aethiops* (vervet) from four localities in Ethiopia. Acta Trop. 2004;90(3):231–6. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2003.12.003.
6. Krief S, Vermeulen B, Lafosse S, Kasenene JM, Nieguitsila A, Berthelemy M, et al. Nodular worm infection in wild chimpanzees in Western Uganda: a risk for human health? PLoS Negl Trop Dis. 2010;4(3):e630. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000630.
7. Cibot M, Guillot J, Lafosse S, Bon C, Seguya A, Krief S. Nodular worm infections in wild non-human primates and humans living in the Sebitoli area (Kibale National Park, Uganda): do high spatial proximity favor zoonotic transmission? PLoS Negl Trop Dis. 2015;9(10):e0004133. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004133.
8. Schuster FL, Visvesvara GS. Amebae and ciliated protozoa as causal agents of waterborne zoonotic disease. Vet Parasitol. 2004;126(1–2):91–120. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.09.019.
9. Mossoun A, Pauly M, Akoua-Koffi C, Couacy-Hymann E, Leendertz SA, Anoh AE, et al. Contact to non-human primates and risk factors for zoonotic disease emergence in the Tai Region. Cote d'Ivoire Ecohealth. 2015;12(4):580–91. https://doi.org/10.1007/s10393-015-1056-x.
10. Narat V, Guillot J, Pennec F, Lafosse S, Gruner AC, Simmen B, et al. Intestinal helminths of wild bonobos in forest-Savanna Mosaic: risk assessment of cross-species transmission with local people in the Democratic Republic of the Congo. EcoHealth. 2015;12(4):621–33. https://doi.org/10.1007/s10393-015-1058-8.
11. Bethony J, Brooker S, Albonico M, Geiger SM, Loukas A, Diemert D, et al. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. Lancet. 2006;367(9521):1521–32. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68653-4.
12. World Health Organisation. Soil-transmitted helminth infections—fact sheets. 2020. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/soil-transmitted-helminth-infections. Accessed 21 May 2021.
13. Huffman MA, Gotoh S, Turner LA, Hamai M, Yoshida K. Seasonal trends in intestinal nematode infection and medicinal plant use among chimpanzees in the Mahale Mountains National Park. Tanzania Primates. 1997;38:111–25.
14. Terio KA, Kinsel MJ, Raphael J, Mlengeya T, Lipende I, Kirchhoff CA, et al. Pathologic lesions in chimpanzees (*Pan trogylodytes schweinfurthii*) from Gombe National Park, Tanzania, 2004–2010. J Zoo Wildl Med. 2011;42(4):597–607. https://doi.org/10.1638/2010-0237.1.
15. Ghai RR, Chapman CA, Omeja PA, Davies TJ, Goldberg TL. Nodule worm infection in humans and wild primates in Uganda: cryptic species in a newly identified region of human transmission. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(1):e2641. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002641.
16. Ghai RR, Simons ND, Chapman CA, Omeja PA, Davies TJ, Ting N, et al. Hidden population structure and cross-species transmission of whipworms (Trichuris sp.) in humans and non-human primates in Uganda. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(10):e3256. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003256.
17. Hasegawa H, Modry D, Kitagawa M, Shutt KA, Todd A, Kalousova B, et al. Humans and great apes cohabiting the forest ecosystem in central african republic harbour the same hookworms. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(3):e2715. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002715.
18. McLennan MR, Hasegawa H, Bardi M, Huffman MA. Gastrointestinal parasite infections and self-medication in wild chimpanzees surviving in degraded forest fragments within an agricultural landscape mosaic in Uganda. PLoS ONE. 2017;12(7):e0180431. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180431.
19. Ashford RW, Reid GD, Wrangham RW. Intestinal parasites of the chimpanzee *Pan troglodytes* in Kibale Forest, Uganda. Ann Trop Med Parasitol. 2000;94(2):173–9.
20. Kalema-Zikusoka G, Rothman JM, Fox MT. Intestinal parasites and bacteria of mountain gorillas (*Gorilla beringei beringei*) in Bwindi Impenetrable National Park, Uganda. Primates. 2005;46(1):59–63. https://doi.org/10.1007/s10329-004-0103-y.
21. Doležalová J, Oborník M, Hajdušková E, Jirků M, Petrželková KJ, Bolechová P, et al. How many species of whipworms do we share? Whipworms from man and other primates form two phylogenetic lineages. Folia Parasitol. 2015;62:1–2.
22. Acha PN, Szyfres B. Zoonoses and communicable diseases common to man and animals. Volume III: Parasitoses. Washington: Pan American Health Organization; 2003. p. 285–324.
23. Landsoud-Soukate J, Tutin CE, Fernandez M. Intestinal parasites of sympatric gorillas and chimpanzees in the Lope Reserve. Gabon Ann Trop Med Parasitol. 1995;89(1):73–9.
24. Ocaido M, Dranzoa C, Cheli P. Gastrointestinal parasites of baboons (*Papio anubis*) interacting with humans in West Bugwe Forest Reserve. Uganda Afr J Ecol. 2003;41:356–9.
25. Ashford RW, Crewe W. The parasites of *Homo sapiens*. London: Taylor & Francis; 2003.
26. Kalousova B, Hasegawa H, Petrzelkova KJ, Sakamaki T, Kooriyma T, Modry D. Adult hookworms (*Necator* spp.) collected from researchers working with wild western lowland gorillas. Parasites Vectors. 2016;9:75. https://doi.org/10.1186/s13071-016-1357-0.
27. Pafco B, Kreisinger J, Cizkova D, Psenkova-Profousova I, Shutt-Phillips K, Todd A, et al. Genetic diversity of primate strongylid nematodes: do sympatric nonhuman primates and humans share their strongylid worms? Mol Ecol. 2019;28(21):4786–97. https://doi.org/10.1111/mec.15257.
28. Krief S, Huffman M, Sevenet T, Guillot J, Bories C, Hladik CM, et al. Noninvasive monitoring of the health of *Pan troglodytes schweinfurthii* in Kibale National Park. Uganda Int J Primatol. 2005;26:467–90.
29. Gillespie TR, Greiner EC, Chapman CA. Gastrointestinal parasites of the guenons of western Uganda. J Parasitol. 2004;90(6):1356–60. https://doi.org/10.1645/GE-311R.
30. Gillespie TR, Greiner EC, Chapman CA. Gastrointestinal parasites of the colobus monkeys of Uganda. J Parasitol. 2005;91(3):569–73. https://doi.org/10.1645/GE-434R.
31. Nunn CL, Altizer S. Infectious diseases in primates: behavior, ecology and evolution. Oxford: Oxford University Press; 2006.
32. Zuk M, McKean KA. Sex differences in parasite infections: patterns and processes. Int J Parasitol. 1996;26(10):1009–23.
33. Jourdan PM, Lamberton PHL, Fenwick A, Addiss DG. Soil-transmitted helminth infections. Lancet. 2018;391(10117):252–65. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31930-X.
34. Jia TW, Melville S, Utzinger J, King CH, Zhou XN. Soil-transmitted helminth reinfection after drug treatment: a systematic review and meta-analysis. PLoS Negl Trop Dis. 2012;6(5):e1621. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001621.
35. Neel C, Etienne L, Li Y, Takehisa J, Rudicell RS, Bass IN, et al. Molecular epidemiology of simian immunodeficiency virus infection in wild-living gorillas. J Virol. 2010;84(3):1464–76. https://doi.org/10.1128/JVI.02129-09.
36. Boue V, Locatelli S, Boucher F, Ayouba A, Butel C, Esteban A, et al. High rate of Simian Immunodeficiency Virus (SIV) infections in wild Chimpanzees in Northeastern Gabon. Viruses. 2015;7(9):4997–5015. https://doi.org/10.3390/v7092855.
37. Gaillard CM, Pion SD, Hamou H, Sirima C, Bizet C, Lemarcis T, et al. Detection of DNA of filariae closely related to *Mansonella perstans* in faecal samples from wild non-human primates from Cameroon and Gabon. Parasites Vectors. 2020;13(1):313. https://doi.org/10.1186/s13071-020-04184-1.
38. van der Kuyl AC, Kuiken CL, Dekker JT, Goudsmit J. Phylogeny of African monkeys based upon mitochondrial 12S rRNA sequences. J Mol Evol. 1995;40(2):173–80.

39. Etienne L, Locatelli S, Ayouba A, Esteban A, Butel C, Liegeois F, et al. Noninvasive follow-up of simian immunodeficiency virus infection in wild-living nonhabituated western lowland gorillas in Cameroon. J Virol. 2012;86(18):9760–72. https://doi.org/10.1128/JVI.01186-12.
40. Sullivan KM, Mannucci A, Kimpton CP, Gill P. A rapid and quantitative DNA sex test: fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin. Biotechniques. 1993;15(4):636–8.
41. Gasser RB, Chilton NB, Hoste H, Beveridge I. Rapid sequencing of rDNA from single worms and eggs of parasitic helminths. Nucleic Acids Res. 1993;21(10):2525–6. https://doi.org/10.1093/nar/21.10.2525.
42. Romstad A, Gasser RB, Monti JR, Polderman AM, Nansen P, Pit DS, et al. Differentiation of *Oesophagostomum bifurcum* from *Necator americanus* by PCR using genetic markers in spacer ribosomal DNA. Mol Cell Probes. 1997;11(3):169–76.
43. Das K, Chowdhury P, Ganguly S. Internal transcribed spacer 1 (ITS1) based sequence typing reveals phylogenetically distinct *Ascaris* population. Comput Struct Biotechnol J. 2015;13:478–83. https://doi.org/10.1016/j.csbj.2015.08.006.
44. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990;215(3):403–10. https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
45. Rozas J, Ferrer-Mata A, Sanchez-DelBarrio JC, Guirao-Rico S, Librado P, Ramos-Onsins SE, et al. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. Mol Biol Evol. 2017;34(12):3299–302. https://doi.org/10.1093/molbev/msx248.
46. Nguyen LT, Schmidt HA, von Haeseler A, Minh BQ. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. Mol Biol Evol. 2015;32(1):268–74. https://doi.org/10.1093/molbev/msu300.
47. Kalyaanamoorthy S, Minh BQ, Wong TKF, von Haeseler A, Jermiin LS. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. Nat Methods. 2017;14(6):587–9. https://doi.org/10.1038/nmeth.4285.
48. Hoang DT, Chernomor O, von Haeseler A, Minh BQ, Vinh LS. UFBoot2: improving the ultrafast bootstrap approximation. Mol Biol Evol. 2018;35(2):518–22. https://doi.org/10.1093/molbev/msx281.
49. Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. Syst Biol. 2010;59(3):307–21. https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010.
50. Hasegawa H, Kalousova B, McLennan MR, Modry D, Profousova-Psenkova I, Shutt-Phillips KA, et al. Strongyloides infections of humans and great apes in Dzanga-Sangha Protected Areas, Central African Republic and in degraded forest fragments in Bulindi, Uganda. Parasitol Int. 2016;65:367–70. https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.05.004.
51. Makouloutou P, Mbehang Nguema PP, Fujita S, Takenoshita Y, Hasegawa H, Yanagida T, et al. Prevalence and genetic diversity of *Oesophagostomum stephanostomum* in wild lowland gorillas at Moukalaba-Doudou National Park, Gabon. Helminthologia. 2014;51(2):83–93.
52. Sleeman JM, Meader LL, Mudakikwa AB, Foster JW, Patton S. Gastrointestinal parasites of mountain gorillas (*Gorilla gorilla beringei*) in the Parc National des Volcans. Rwanda J Zoo Wildl Med. 2000;31(3):322–8. https://doi.org/10.1638/1042-7260(2000)031[0322:GPOMGG]2.0.CO;2.
53. Lilly AA, Mehlman PT, Doran D. Intestinal parasites in gorillas, chimpanzees, and humans at Mondika ResearchSite, Dzanga-Ndoki National Park, Central African Republic. Int J Parasitol. 2002;23:555–73.
54. Huffman MA, Pebsworth P, Bakuneeta C, Gotoh S, Bardi M. Chimpanzee–parasite ecology at Budongo Forest (Uganda) and the Mahale Mountains (Tanzania): influence of climatic differences on self-medicative behavior. In: Huffman MA, Chapman CA, editors. Primate parasite ecology: the dynamics and study of host–parasite relationships. Cambridge: Cambridge University Press; 2009. p. 331–50.
55. Ota N, Hasegawa H, McLennan MR, Kooriyama T, Sato H, Pebsworth PA, et al. Molecular identification of *Oesophagostomum* spp from "village" chimpanzees in Uganda and their phylogenetic relationship with those of other primates. R Soc Open Sci. 2015;2(11):150471. https://doi.org/10.1098/rsos.150471.
56. Gillespie TR, Lonsdorf EV, Canfield EP, Meyer DJ, Nadler Y, Raphael J, et al. Demographic and ecological effects on patterns of parasitism in eastern chimpanzees (*Pan troglodytes schweinfurthii*) in Gombe National Park, Tanzania. Am J Phys Anthropol. 2010;143(4):534–44. https://doi.org/10.1002/ajpa.21348.
57. Bakuza JS, Nkwengulila G. Variation over time in parasite prevalence among free-ranging chimpanzees at Gombe National Park, Tanzania. Int J Primatol. 2009;30:43.
58. Kalousová B, Piel AK, Pomajbíková K, Modrý D, Stewart FA, Petrželková KJ. Gastrointestinal parasites of savanna chimpanzees (*Pan troglodytes schweinfurthii*) in Uganda, Tanzania. Int J Primatol. 2014;35:463–75.
59. Petrzelkova KJ, Hasegawa H, Appleton CC, Huffman MA, Archer CE, Moscovice LR, et al. Gastrointestinal parasites of the chimpanzee population introduced onto Rubondo Island National Park, Tanzania. Am J Primatol. 2010;72(4):307–16. https://doi.org/10.1002/ajp.20783.
60. Drakulovski P, Bertout S, Locatelli S, Butel C, Pion S, Mpoudi-Ngole E, et al. Assessment of gastrointestinal parasites in wild chimpanzees (*Pan troglodytes troglodytes*) in southeast Cameroon. Parasitol Res. 2014;113(7):2541–50. https://doi.org/10.1007/s00436-014-3904-y.
61. Howells ME, Pruetz J, Gillespie TR. Patterns of gastro-intestinal parasites and commensals as an index of population and ecosystem health: the case of sympatric western chimpanzees (*Pan troglodytes verus*) and guinea baboons (*Papio hamadryas papio*) at Fongoli. Senegal Am J Primatol. 2011;73(2):173–9. https://doi.org/10.1002/ajp.20884.
62. Sa RM, Petrasova J, Pomajbikova K, Profousova I, Petrzelkova KJ, Sousa C, et al. Gastrointestinal symbionts of chimpanzees in Cantanhez National Park, Guinea-Bissau with respect to habitat fragmentation. Am J Primatol. 2013;75(10):1032–41. https://doi.org/10.1002/ajp.22170.
63. Maisels F, Hicks TC, Hart J, Shah N.Cercocebus agilis (amended version of 2019 assessment). The IUCN Red List of Threatened Species 2020:e. T136615A167735266. https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2020-1.RLTS.T136615A167735266.en. Accessed01 July 2021.
64. Ankel-Simons F. Primate anatomy: an introduction. 3rd ed. San Diego: Elsevier Academic Press; 2007.
65. Kooriyama T, Hasegawa H, Shimozuru M, Tsubota T, Nishida T, Iwaki T. Parasitology of five primates in Mahale Mountains National Park, Tanzania. Primates. 2012;53(4):365–75. https://doi.org/10.1007/s10329-012-0311-9.
66. Arneberg P. Host population density and body mass as determinants of species richness in parasite communities: Comparative analyses of directly transmitted nematodes of mammals. Ecography. 2002;25(1):88–94.
67. Klein SL. Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection. Parasite Immunol. 2004;26(6–7):247–64. https://doi.org/10.1111/j.0141-9838.2004.00710.x.
68. van Bogaert O. A park for people and wildlife: World Wildlife Fund report. 2000. https://wwf.panda.org/?2085/A-park-for-people-and-wildlife. Accessed 01.12.2020.
69. von Linstow O. The American hookworm in chimpanzee. Am J Med. 1903;6:611.
70. Dollfus RP, Chabaud AJ. Cinq espèces de Nématodes chez un Atèle [Ateles ater (G. Cuvier 1823)] mort à la Ménagerie du Muséum. Arch Mus Histoire Nat. 1955;3:27–40.
71. Buckley JJC. On two new species of *Enterobius* from the monkey *Lagothrix humboldtii*. J Helminthol. 1931;9:133–40.
72. Orihel TC. *Necator americanus* infection in primates. J Parasitol. 1971;57:117–21.
73. Ackert JE, Payne FK. Investigations on the control of hookworm disease XII. Studies on the occurrence, distribution and morphology of *Necator suillus*, including descriptions of the other species of Necator. Am J Hyg. 1922;3:1–25.
74. Noda R, Yamada H. On two species of nematodes, *Necator gorillae* sp. nov. (Ancylostomidae) and *Chitwoodspirura wehri* Chabaud and Rousselot, 1956 (Spiruridae), from a gorilla. Bull Univ Osaka Pref Ser B. 1964;15:175–80.
75. Gasser RB, Woods WG, Blotkamp C, Verweij J, Storey PA, Polderman AM. Screening for nucleotide variations in ribosomal DNA arrays of *Oesophagostomum bifurcum* by polymerase chain reaction-coupled single-strand conformation polymorphism. Electrophoresis. 1999;20(7):1486–91. https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2683(19990601)20:7%3c1486::AID-ELPS1486%3e3.0.CO;2-9.
76. Polderman AM, Blotkamp J. *Oesophagostomum* infections in humans. Parasitol Today. 1995;11(12):451–6.
77. Eberhard ML, Kovacs-Nace E, Blotkamp J, Verwij JJ, Asigri VA, Polderman AM. Experimental *Oesophagostomum bifurcum* in monkeys. J Helminthol. 2001;75(1):51–6. https://doi.org/10.1079/joh200031.

78. Bradbury RS. *Ternidens deminutus* revisited: a review of human infections with the false hookworm. Trop Med Infect Dis. 2019;4(3):106. https://doi.org/10.3390/tropicalmed4030106.
79. Goldsmid JM. *Ternidens* infection. In: Goldsmid JM, editor. Parasitic zoonoses, vol. II. Boca Raton: CRC Press; 1982. p. 269–88.
80. Gasser RB, de Gruijter JM, Polderman AM. Insights into the epidemiology and genetic make-up of *Oesophagostomum bifurcum* from human and non-human primates using molecular tools. Parasitology. 2006;132(Pt 4):453–60. https://doi.org/10.1017/S0031182005009406.
81. Lello J, Boag B, Fenton A, Stevenson IR, Hudson PJ. Competition and mutualism among the gut helminths of a mammalian host. Nature. 2004;428(6985):840–4. https://doi.org/10.1038/nature02490.
82. Telfer S, Lambin X, Birtles R, Beldomenico P, Burthe S, Paterson S, et al. Species interactions in a parasite community drive infection risk in a wildlife population. Science. 2010;330(6001):243–6. https://doi.org/10.1126/science.1190333.
83. Hotez PJ, Beaumier CM, Gillespie PM, Strych U, Hayward T, Bottazzi ME. Advancing a vaccine to prevent hookworm disease and anemia. Vaccine. 2016;34(26):3001–5. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.03.078.
84. Periago MV, Bethony JM. Hookworm virulence factors: making the most of the host. Microbes Infect. 2012;14(15):1451–64. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2012.09.002.
85. Seguel M, Munoz F, Navarrete MJ, Paredes E, Howerth E, Gottdenker N. Hookworm Infection in South American Fur Seal (*Arctocephalus australis*) Pups. Vet Pathol. 2017;54(2):288–97. https://doi.org/10.1177/0300985816677151.
86. Traversa D. Pet roundworms and hookworms: a continuing need for global worming. Parasites Vectors. 2012;5:91. https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-91.
87. Orihel TC. *Necator americanus* infection in primates. J Parasitol. 1971;57(1):117–21. https://doi.org/10.2307/3277764.
88. Rijksen HD. Diseases and mortality factors. A field study on Sumatran orangutans (*Pongo pygmaueus abelii* Lesson 1827): ecology, behaviour and conservation. Wageningen: H. Veenman & Zonen BV; 1978. p. 134–48.
89. Storey PA, Faile G, Hewitt E, Yelifari L, Polderman AM, Magnussen P. Clinical epidemiology and classification of human oesophagostomiasis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2000;94(2):177–82. https://doi.org/10.1016/s0035-9203(00)90267-0.
90. Rousselot R, Pellissier A. Esophagostomose nodulaire à *Oesophagostomum stephanostomum*. Pathologie du gorille et du chimpanzé. Bull Soc Pathol Exot. 1952;9:569–74.
91. Crestian J, Crespeau F. Observation d'un cas d'Oesophagostomose du chimpanzé. Rec Méd Vét. 1975;151:13–8.
92. Krief S, Jamart A, Mahe S, Leendertz FH, Matz-Rensing K, Crespeau F, et al. Clinical and pathologic manifestation of oesophagostomosis in African great apes: does self-medication in wild apes influence disease progression? J Med Primatol. 2008;37(4):188–95. https://doi.org/10.1111/j.1600-0684.2008.00285.x.
93. Fowler A, Koutsioni Y, Sommer V. Leaf-swallowing in Nigerian chimpanzees: evidence for assumed self-medication. Primates. 2007;48:73–6.
94. Muehlenbein MP. Parasitological analyses of the male chimpanzees (*Pan troglodytes schweinfurthii*) at Ngogo, Kibale National Park, Uganda. Am J Primatol. 2005;65(2):167–79. https://doi.org/10.1002/ajp.20106.
95. Ebbert MA, McGrew WC, Marchant LF. Differences between chimpanzee and baboon gastrointestinal parasite communities. Parasitology. 2015;142(7):958–67. https://doi.org/10.1017/S0031182015000104.
96. Yao C, Walkush J, Shim D, Cruz K, Ketzis J. Molecular species identification of *Trichuris trichiura* in African green monkey on St. Kitts, West Indies. Vet Parasitol Reg Stud Rep. 2018;11:22–6. https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2017.11.004.
97. Ravasi DF, O'Riain MJ, Davids F, Illing N. Phylogenetic evidence that two distinct *Trichuris* genotypes infect both humans and non-human primates. PLoS ONE. 2012;7(8):e44187. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044187.
98. Cavallero S, Nejsum P, Cutillas C, Callejon R, Dolezalova J, Modry D, et al. Insights into the molecular systematics of *Trichuris* infecting captive primates based on mitochondrial DNA analysis. Vet Parasitol. 2019;272:23–30. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.06.019.
99. Cutillas C, de Rojas M, Zurita A, Oliveros R, Callejon R. *Trichuris colobae* n. sp. (Nematoda: Trichuridae), a new species of Trichuris from *Colobus guereza kikuyensis*. Parasitol Res. 2014;113(7):2725–32. https://doi.org/10.1007/s00436-014-3933-6.
100. Callejon R, Halajian A, Cutillas C. Description of a new species, *Trichuris ursinus* n. sp. (Nematoda: Trichuridae) from *Papio ursinus* Keer, 1792 from South Africa. Infect Genet Evol. 2017;51:182–93. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.04.002.
101. Xie Y, Niu L, Zhao B, Wang Q, Nong X, Chen L, et al. Complete mitochondrial genomes of chimpanzee- and gibbon-derived *Ascaris* isolated from a zoological garden in southwest China. PLoS ONE. 2013;8(12):e82795. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082795.
102. Nejsum P, Bertelsen MF, Betson M, Stothard JR, Murrell KD. Molecular evidence for sustained transmission of zoonotic *Ascaris suum* among zoo chimpanzees (*Pan troglodytes*). Vet Parasitol. 2010;171(3–4):273–6. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.03.030.
103. Pafco B, Benavides JA, Psenkova-Profousova I, Modry D, Cervena B, Shutt KA, et al. Do habituation, host traits and seasonality have an impact on protist and helminth infections of wild western lowland gorillas? Parasitol Res. 2017;116(12):3401–10. https://doi.org/10.1007/s00436-017-5667-8.
104. Basuni M, Muhi J, Othman N, Verweij JJ, Ahmad M, Miswan N, et al. A pentaplex real-time polymerase chain reaction assay for detection of four species of soil-transmitted helminths. Am J Trop Med Hyg. 2011;84(2):338–43. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0499.
105. Knopp S, Salim N, Schindler T, Karagiannis Voules DA, Rothen J, Lweno O, et al. Diagnostic accuracy of Kato-Katz, FLOTAC, Baermann, and PCR methods for the detection of light-intensity hookworm and *Strongyloides stercoralis* infections in Tanzania. Am J Trop Med Hyg. 2014;90(3):535–45. https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0268.
106. Pilotte N, Papaiakovou M, Grant JR, Bierwert LA, Llewellyn S, McCarthy JS, et al. Improved PCR-based detection of soil transmitted helminth infections using a next-generation sequencing approach to assay design. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10(3):e0004578. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004578.
107. Vlckova K, Kreisinger J, Pafco B, Cizkova D, Tagg N, Hehl AB, et al. Diversity of *Entamoeba* spp. in African great apes and humans: an insight from Illumina MiSeq high-throughput sequencing. Int J Parasitol. 2018;48(7):519–30. https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.11.008.
108. Pafco B, Cizkova D, Kreisinger J, Hasegawa H, Vallo P, Shutt K, et al. Metabarcoding analysis of strongylid nematode diversity in two sympatric primate species. Sci Rep. 2018;8(1):5933. https://doi.org/10.1038/s41598-018-24126-3.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Table S1 Number of chimpanzees, gorillas or the two species combined, positive or negative for *Oesophagostomum* sp. coinfected or not with *Necator* sp. (values under the null hypothesis of co-infections occurring more often than expected by chance, are shown in parentheses)

Chimpanzees		*Necator* sp.			
		Positive	Negative	Total	Two-tailed probability
Oesophagostomum sp.	Positive	76 (70.7)	81 (86.3)	157	0.139
	Negative	24 (29.3)	41 (35.7)	65	
	Total	100	122	222	

Gorillas		*Necator* sp.			
		Positive	Negative	Total	Two-tailed probability
Oesophagostomum sp.	Positive	30 (27.5)	21 (23.5)	51	0.143
	Negative	5 (7.5)	9 (6.5)	14	
	Total	35	30	65	

Chimpanzees and Gorillas		*Necator* sp.			
		Positive	Negative	Total	Two-tailed probability
Oesophagostomum sp.	Positive	107 (98.3)	102 (110.7)	209	0.023
	Negative	28 (36.7)	50 (41.3)	78	
	Total	135	152	287	

Table S2 Number of female and male chimpanzees positive or negative for *Oesophagostomum* sp. and for *Necator* sp. and comparison of prevalence between sexes (expected frequencies per null hypothesis in parenthesis)

Parasite species	Sex	No. positives (%)	No. negatives	Total	P-value
Oesophagostomum sp.	Females	32 (80.0)	8	40	0.645
	Males	55 (74.3)	19	74	
	Total	87 (73.3)	27	114	
Necator sp.	Females	16 (40.0)	24	40	0.326
	Males	38 (51.4)	36	74	
	Total	54 (47.4)	60	114	

Table S3 Check-list of co-infections confirmed by sequencing

Host and location	***Necator* Type II**	***O. stephanostomum***	***O. bifurcum***	***Trichuris* sp.**	***Ternidens deminutus***
Chimpanzee (N=33) Matakamangoye (GAB)	X	X			
Chimpanzee (N=1) Somalomo (CAM)	X		X		
Chimpanzee (N=7) Somalomo (CAM)	X	X			
Gorilla (N=1) Somalomo (CAM)	X	X			
Greater spot-nosed monkey (N=1) Somalomo (CAM)				X	X
Agile mangabey (N=1) Mambélé (CAM)	X	X			
Chimpanzee (N=1) Mambélé (CAM)	X			X	
Chimpanzee (N=1) Mambélé (CAM)	X				
Chimpanzee (N=1) Mambélé (CAM)	X		X		
Gorilla (N=1) Mambélé (CAM)	X	X			
Gorilla (N=1) Lobéké NP	X			X	

Table S1-A
List of *Necator* ITS2 sequences from GenBank used in this study and their assignment to haplogroups, together with the information on the host and locality. The sequences in bold are representatives for the given haplogroup and were used in the phylogenetic tree.

Haplogroup	Sequence	Organism	Host	Locality
1	**AB793530**	*Necator* sp.	*Homo sapiens*	CAR
	LC088241	*Necator* sp.	*P. troglodytes*	Uganda
	LC088242	*Necator* sp.	*P. troglodytes*	Uganda
	LC088245	*Necator* sp.	*P. troglodytes*	Uganda
	LC088247	*Necator* sp.	*P. troglodytes*	Uganda
	LC088252	*Necator* sp.	*P. troglodytes*	Uganda
	LC088254	*Necator* sp.	*P. troglodytes*	Uganda
	LC088256	*Necator* sp.	*P. troglodytes*	Uganda
	LC088257	*Necator* sp.	*P. troglodytes*	Uganda
	LC088258	*Necator* sp.	*P. troglodytes*	Uganda
	LC088261	*Necator* sp.	*P. troglodytes*	Uganda
	LC088263	*Necator* sp.	*P. troglodytes*	Uganda
	LC088265	*Necator* sp.	*P. troglodytes*	Uganda
	LC088266	*Necator* sp.	*P. troglodytes*	Uganda
	LC088267	*Necator* sp.	*P. troglodytes*	Uganda
	LC088268	*Necator* sp.	*P. troglodytes*	Uganda
	LC088275	*Necator* sp.	*P. troglodytes*	Uganda
	LC088277	*Necator* sp.	*P. troglodytes*	Uganda
	LC088280	*Necator* sp.	*P. troglodytes*	Uganda
	LC088281	*Necator* sp.	*P. troglodytes*	Uganda
	LC088282	*Necator* sp.	*P. troglodytes*	Uganda
	LC088283	*Necator* sp.	*P. troglodytes*	Uganda
	LC088285	*Necator* sp.	*P. troglodytes*	Uganda
	AB793529	*Necator* sp.	*Homo sapiens*	CAR
	LC088259	*Necator* sp.	*P. troglodytes*	Uganda
	LC088298	*Necator* sp.	*G. g. gorilla*	Gabon
	LC088299	*Necator* sp.	*G. g. gorilla*	Gabon
	LC088269	*Necator* sp.	*P. troglodytes*	Uganda
	LC088243	*Necator* sp.	*P. troglodytes*	Uganda
	LC088250	*Necator* sp.	*P. troglodytes*	Uganda
	AB793533	*Necator* sp.	*Homo sapiens*	CAR
2	**LC088240**	*Necator* sp.	*P. troglodytes*	Uganda
3	**LC088248**	*Necator* sp.	*P. troglodytes*	Uganda
4	**LC088278**	*Necator* sp.	*P. troglodytes*	Uganda
5	**LC088262**	*Necator* sp.	*P. troglodytes*	Uganda
6	**AB793534**	*Necator* sp.	*G. g. gorilla*	CAR
7	**AB793535**	*Necator* sp.	*Homo sapiens*	CAR
8	**KM487279**	*Necator* sp.	*P. paniscus*	DRC
9	**MG770106**	*N. americanus*	*Homo sapiens*	Ghana
	MG770099	*N. americanus*	*Homo sapiens*	Ghana
	MG770101	*N. americanus*	*Homo sapiens*	Ghana
	MG770105	*N. americanus*	*Homo sapiens*	Ghana
	MG770107	*N. americanus*	*Homo sapiens*	Ghana
	MH665842	*N. americanus*	*Homo sapiens*	Brazil
	AB793527	*N. americanus*	*Homo sapiens*	CAR
	AF217891	*N. americanus*	*Homo sapiens*	Guatemala
	KM487278	*N. americanus*	*Homo sapiens*	DRC
10	**KC632571**	*N. americanus*	*Homo sapiens*	Australia
	MG770100	*N. americanus*	*Homo sapiens*	Ghana
	MG770104	*N. americanus*	*Homo sapiens*	Ghana
11	**HQ452543**	*N. americanus*	*Homo sapiens*	Malaysia

	LC036563	*N. americanus*	*Homo sapiens*	Japan
	JF960370	*N. americanus*	*Homo sapiens*	Malaysia
	JF960374	*N. americanus*	*Homo sapiens*	Malaysia
	JF960387	*N. americanus*	*Homo sapiens*	Malaysia
	JF960388	*N. americanus*	*Homo sapiens*	Malaysia
	JF960392	*N. americanus*	*Homo sapiens*	Malaysia
	JF960395	*N. americanus*	*Homo sapiens*	Malaysia
	JF960401	*N. americanus*	*Homo sapiens*	Malaysia
12	**JF960376**	*N. americanus*	*Homo sapiens*	Malaysia
	JF960375	*N. americanus*	*Homo sapiens*	Malaysia
13	**JF960400**	*N. americanus*	*Homo sapiens*	Malaysia
	HQ452537	*N. americanus*	*Homo sapiens*	Malaysia
	HQ452539	*N. americanus*	*Homo sapiens*	Malaysia
	HQ452540	*N. americanus*	*Homo sapiens*	Malaysia
	HQ452541	*N. americanus*	*Homo sapiens*	Malaysia
	HQ452542	*N. americanus*	*Homo sapiens*	Malaysia
	KM891738	*N. americanus*	N/A	N/A
	KC632569	*N. americanus*	*Homo sapiens*	Australia
	KU513968	*N. americanus*	*Homo sapiens*	Iran
	JF960373	*N. americanus*	*Homo sapiens*	Malaysia
	JF960377	*N. americanus*	*Homo sapiens*	Malaysia
	JF960382	*N. americanus*	*Homo sapiens*	Malaysia
	JF960384	*N. americanus*	*Homo sapiens*	Malaysia
	JF960385	*N. americanus*	*Homo sapiens*	Malaysia
	JF960389	*N. americanus*	*Homo sapiens*	Malaysia
	JF960391	*N. americanus*	*Homo sapiens*	Malaysia
	JF960396	*N. americanus*	*Homo sapiens*	Malaysia
	JF960397	*N. americanus*	*Homo sapiens*	Malaysia
	JF960399	*N. americanus*	*Homo sapiens*	Malaysia
14	**JF960380**	*N. americanus*	*Homo sapiens*	Malaysia
15	**JF960381**	*N. americanus*	*Homo sapiens*	Malaysia
16	**LC088287**	*N. americanus*	*G. g. gorilla*	Gabon
17	**Y11734**	*N. americanus*	*Homo sapiens*	Togo
18	**MG770102**	*N. americanus*	*Homo sapiens*	Ghana
19	**MG770103**	*N. americanus*	*Homo sapiens*	Ghana
20	**MK036419**	*N. americanus*	*Homo sapiens*	China
21	**JF960383**	*N. americanus*	*Homo sapiens*	Malaysia
22	**JF960372**	*N. americanus*	*Homo sapiens*	Malaysia
23	**AJ001600**	*N. americanus*	*Homo sapiens*	Malaysia
24	**JF960393**	*N. americanus*	*Homo sapiens*	Malaysia
25	**JF960390**	*N. americanus*	*Homo sapiens*	Malaysia
26	**JF960378**	*N. americanus*	*Homo sapiens*	Malaysia
27	**LC036565**	*N. americanus*	*Homo sapiens*	Laos
28	**KU855047**	*N. americanus*	soil	Thailand
29	**JF960386**	*N. americanus*	*Homo sapiens*	Malaysia
30	**JF960403**	*N. americanus*	*Homo sapiens*	Malaysia
31	**KU855048**	*N. americanus*	soil	Thailand

N/A – not available
CAR – Central African Republic
DRC – Democratic Republic of the Congo

Table S1-B
List of *Necator* ITS2 sequences generated in this study and their assignment to the haplogroups, together with the information on the host and locality. The sequences in bold are representatives for the given haplogroup and were used in the phylogenetic tree.

Variant	Sequence	Accession number	Host	Locality
NH1 (38 T, 228 T, 265A)	**2352_CHI_GAB**	MW528542	*P. t. troglodytes*	Gabon, MKT
(n= 14)	951_CHI_GAB		*P. t. troglodytes*	Gabon, MKT
	962_CHI_GAB		*P. t. troglodytes*	Gabon, MKT
	1279_CHI_GAB		*P. t. troglodytes*	Gabon, MKT
	1298_CHI_GAB		*P. t. troglodytes*	Gabon, MKT
	1299_CHI_GAB		*P. t. troglodytes*	Gabon, MKT
	1332L_CHI_GAB		*P. t. troglodytes*	Gabon, MKT
	1342_CHI_GAB		*P. t. troglodytes*	Gabon, MKT
	1347_CHI_GAB		*P. t. troglodytes*	Gabon, MKT
	2334_CHI_GAB		*P. t. troglodytes*	Gabon, MKT
	2347_CHI_GAB		*P. t. troglodytes*	Gabon, MKT
	2496_GOR_CAM		*G. g. gorilla*	Cameroon, LB
	5151_CHI_CAM	MW621489	*P. t. troglodytes*	Cameroon, MB
	9964_GOR_CAM	MW621492	*G. g. gorilla*	Cameroon, LB
NH2 (38 T, 22 T, 265 T)	**941_CHI_GAB**	MW528538	*P. t. troglodytes*	Gabon, MKT
(n= 32)	**770_CHI_CAM**	MW528539	*P. t. troglodytes*	Cameroon, MB
	771_CHI_CAM		*P. t. troglodytes*	Cameroon, MB
	776_CHI_CAM		*P. t. troglodytes*	Cameroon, MB
	888_CHI_CAM		*P. t. troglodytes*	Cameroon, MB
	932_CHI_GAB		*P. t. troglodytes*	Gabon, MKT
	934_CHI_GAB		*P. t. troglodytes*	Gabon, MKT
	939_CHI_GAB		*P. t. troglodytes*	Gabon, MKT
	956_CHI_CAM		*P. t. troglodytes*	Cameroon, SOM
	957_CHI_CAM	MW621486	*P. t. troglodytes*	Cameroon, SOM
	960_CHI_CAM		*P. t. troglodytes*	Cameroon, SOM
	987_CHI_GAB		*P. t. troglodytes*	Gabon, MKT
	990_CHI_GAB		*P. t. troglodytes*	Gabon, MKT
	998_CHI_GAB		*P. t. troglodytes*	Gabon, MKT
	1002_CHI_GAB		*P. t. troglodytes*	Gabon, MKT
	1008_CHI_GAB		*P. t. troglodytes*	Gabon, MKT
	1015_CHI_GAB		*P. t. troglodytes*	Gabon, MKT
	1021_CHI_GAB		*P. t. troglodytes*	Gabon, MKT
	1022_CHI_GAB		*P. t. troglodytes*	Gabon, MKT
	1169_CHI_GAB		*P. t. troglodytes*	Gabon, MKT
	1179_CHI_GAB		*P. t. troglodytes*	Gabon, MKT
	1237_CHI_GAB		*P. t. troglodytes*	Gabon, MKT
	1250_CHI_GAB		*P. t. troglodytes*	Gabon, MKT
	1296_CHI_GAB		*P. t. troglodytes*	Gabon, MKT
	1334_CHI_GAB		*P. t. troglodytes*	Gabon, MKT
	1343_CHI_GAB		*P. t. troglodytes*	Gabon, MKT
	1464_CHI_GAB		*P. t. troglodytes*	Gabon, MKT
	2340_CHI_GAB		*P. t. troglodytes*	Gabon, MKT
	2349_CHI_GAB		*P. t. troglodytes*	Gabon, MKT
	2364_CHI_GAB		*P. t. troglodytes*	Gabon, MKT
	2366_CHI_GAB		*P. t. troglodytes*	Gabon, MKT
	8386_CHI_CAM		*P. t. troglodytes*	Cameroon, MB
NH3 (38 C, 228 Y, 265 N/A)	**6954_CHI_CAM**	MW528536	*P. t. troglodytes*	Cameroon, MB
NH4 (38 Y, 228 A, 265 T)	**5135_CHI_CAM**	MW528540	*P. t. troglodytes*	Cameroon, MB

NH5	**945_CHI_GAB**	MW528535	*P. t. troglodytes*	Gabon, MKT
NH1 or **NH2**	**1297_CHI_GAB**	MW528541	*P. t. troglodytes*	Gabon, MKT
(n= 23)	**9965_GOR_CAM**	MW528537	*G. g. gorilla*	Cameroon, LB
	889_CHI_CAM		*P. t. troglodytes*	Cameroon, MB
	937_CHI_GAB		*P. t. troglodytes*	Gabon, MKT
	962_CHI_CAM	MW621487	*P. t. troglodytes*	Cameroon, SOM
	963_CHI_CAM		*P. t. troglodytes*	Cameroon, SOM
	965_CHI_CAM		*P. t. troglodytes*	Cameroon, SOM
	984_CHI_CAM		*P. t. troglodytes*	Cameroon, SOM
	988_CHI_GAB		*P. t. troglodytes*	Gabon, MKT
	1214_CHI_GAB		*P. t. troglodytes*	Gabon, MKT
	1241_CHI_GAB		*P. t. troglodytes*	Gabon, MKT
	1243_CHI_GAB		*P. t. troglodytes*	Gabon, MKT
	1253_CHI_GAB		*P. t. troglodytes*	Gabon, MKT
	1267_CHI_GAB		*P. t. troglodytes*	Gabon, MKT
	1275_CHI_GAB		*P. t. troglodytes*	Gabon, MKT
	1291_CHI_GAB		*P. t. troglodytes*	Gabon, MKT
	1320_CHI_GAB		*P. t. troglodytes*	Gabon, MKT
	1336_CHI_GAB		*P. t. troglodytes*	Gabon, MKT
	1344_CHI_GAB		*P. t. troglodytes*	Gabon, MKT
	2318_CHI_GAB		*P. t. troglodytes*	Gabon, MKT
	5150_AGILIS_CAM	MW621488	*C. agilis*	Cameroon, MB
	6949_CHI_CAM	MW621490	*P. t. troglodytes*	Cameroon, MB
	10017_GOR_CAM	MW621493	*G. g. gorilla*	Cameroon, MB
NH1, NH2 or **NH4**	**966_CHI_CAM**	MW528543	*P. t. troglodytes*	Cameroon, SOM
	4877_CHI_CAM		*P. t. troglodytes*	Cameroon, SOM
	9824_GOR_CAM	MW621491	*G. g. gorilla*	Cameroon, SOM

MB – Mambélé; MKT – Makamangoye; LB – Lobéké National Park; SOM – Somalomo. Positions are numbered based on the alignment of all obtained sequences.

Table S2-A
List of *Oesophagostomum* spp. ITS2 sequences from GenBank used in this study and their assignment to haplogroups (HG), together with the information on host and locality. The sequences in bold are representatives for the given haplogroup and were used in the phylogenetic tree.

HG	Sequence	Organism	Host	Locality
1.	**KM487277.1**	*O. stephanostomum*	*Pan paniscus*	DRC
2.	**KF250614.1**	*O. stephanostomum*	*Cercopithecus mitis*	Uganda
	KF250588.1	*O. stephanostomum*	*Cercopithecus ascanius*	Uganda
	KF250594.1	*O. stephanostomum*	*Cercopithecus ascanius*	Uganda
	KF250598.1	*O. stephanostomum*	*Colobus guereza*	Uganda
	KF250599.1	*O. stephanostomum*	*Colobus guereza*	Uganda
	KF250612.1	*O. stephanostomum*	*Cercopithecus ascanius*	Uganda
	KF250613.1	*O. stephanostomum*	*Cercopithecus ascanius*	Uganda
	KF250615.1	*O. stephanostomum*	*Cercopithecus mitis*	Uganda
	KF250616.1	*O. stephanostomum*	Red colobus	Uganda
	KF250617.1	*O. stephanostomum*	Red colobus	Uganda
	KF250618.1	*O. stephanostomum*	*Cercopithecus ascanius*	Uganda
	KF250619.1	*O. stephanostomum*	*Cercopithecus ascanius*	Uganda
	KF250631.1	*O. stephanostomum*	*Pan troglodytes*	Uganda
	KF250634.1	*O. stephanostomum*	*Cercopithecus ascanius*	Uganda
	KF250635.1	*O. stephanostomum*	*Cercopithecus ascanius*	Uganda
	KF250637.1	*O. stephanostomum*	*Cercopithecus ascanius*	Uganda
	KF250638.1	*O. stephanostomum*	Red colobus	Uganda
	KF250643.1	*O. stephanostomum*	*Pan troglodytes*	Uganda
	KF250653.1	*O. stephanostomum*	*Cercopithecus mitis*	Uganda
	KR149649.1	*O. stephanostomum*	*P. t. schweinfurthii*	Uganda
	KR149650.1	*O. stephanostomum*	*Colobus guereza*	Uganda
	KT865106.1	*O. stephanostomum*	*Pan troglodytes*	Tanzania
	KT865108.1	*O. stephanostomum*	*Pan troglodytes*	Tanzania
3.	**KF250648.1**	*O. stephanostomum*	*Cercopithecus ascanius*	Uganda
	KF250585.1	*O. stephanostomum*	*Cercopithecus ascanius*	Uganda
	KF250586.1	*O. stephanostomum*	*Cercopithecus ascanius*	Uganda
	KF250592.1	*O. stephanostomum*	*Cercopithecus ascanius*	Uganda
	KF250595.1	*O. stephanostomum*	*Lophocebus albigena*	Uganda
	KF250605.1	*O. stephanostomum*	*Cercopithecus mitis*	Uganda
	KF250606.1	*O. stephanostomum*	*Cercopithecus mitis*	Uganda
	KF250639.1	*O. stephanostomum*	*Pan troglodytes*	Uganda
	KF250640.1	*O. stephanostomum*	*Pan troglodytes*	Uganda
	KF250641.1	*O. stephanostomum*	*Pan troglodytes*	Uganda
	KF250642.1	*O. stephanostomum*	*Pan troglodytes*	Uganda
	KF250644.1	*O. stephanostomum*	*Lophocebus albigena*	Uganda
	KF250647.1	*O. stephanostomum*	*Pan troglodytes*	Uganda
4.	**KR149651.1**	*O. stephanostomum*	*Homo sapiens*	Uganda
5.	**KT865109.1**	*O. stephanostomum*	*Pan troglodytes*	Tanzania
6.	**KT865107.1**	*O. stephanostomum*	*Pan troglodytes*	Tanzania
	AB821022.1	*O. stephanostomum*	*Gorilla gorila gorilla*	Gabon
	AB821014.1	*O. stephanostomum*	*Gorilla gorila gorilla*	Gabon
7.	**LC063699.1**	*O. stephanostomum*	*P. t. schweinfurthii*	Uganda
8.	**LC063706.1**	*O. stephanostomum*	*P. t. schweinfurthii*	Uganda
9.	**LC063708.1**	*O. stephanostomum*	*P. t. schweinfurthii*	Uganda
10.	**AB821015.1**	*O. stephanostomum*	*Gorilla gorila gorilla*	Gabon
11.	**AB821016.1**	*O. stephanostomum*	*Gorilla gorila gorilla*	Gabon
12.	**AB821025.1**	*O. stephanostomum*	*Pan troglodytes*	Gabon
13.	**KR149646.1**	*O. stephanostomum*	*P. t. schweinfurthii*	Uganda
	AB821013.1	*O. stephanostomum*	*Gorilla gorila gorilla*	Gabon

	AB821017.1	*O. stephanostomum*	*Pan troglodytes*	Gabon
	AB821018.1	*O. stephanostomum*	*Gorilla gorila gorilla*	Gabon
	AB821019.1	*O. stephanostomum*	*Gorilla gorila gorilla*	Gabon
	AB821020.1	*O. stephanostomum*	*Gorilla gorila gorilla*	Gabon
	AB821021.1	*O. stephanostomum*	*Gorilla gorila gorilla*	Gabon
	AB821023.1	*O. stephanostomum*	*Gorilla gorila gorilla*	Gabon
	AB821024.1	*O. stephanostomum*	*Gorilla gorila gorilla*	Gabon
	AB821026.1	*O. stephanostomum*	*Pan troglodytes*	Gabon
	AB821027.1	*O. stephanostomum*	*Gorilla gorila gorilla*	Gabon
	AB821028.1	*O. stephanostomum*	*Gorilla gorila gorilla*	Gabon
	AB821029.1	*O. stephanostomum*	*Gorilla gorila gorilla*	Gabon
	AB821030.1	*O. stephanostomum*	*Gorilla gorila gorilla*	Gabon
	AB821031.1	*O. stephanostomum*	*Gorilla gorila gorilla*	Gabon
	KR149647.1	*O. stephanostomum*	*Homo sapiens*	Uganda
	KT592235.1	*O. stephanostomum*	*P. t. schweinfurthii*	Uganda
	LC063697.1	*O. stephanostomum*	*P. t. schweinfurthii*	Uganda
	LC063698.1	*O. stephanostomum*	*P. t. schweinfurthii*	Uganda
	LC063700.1	*O. stephanostomum*	*P. t. schweinfurthii*	Uganda
	LC063701.1	*O. stephanostomum*	*P. t. schweinfurthii*	Uganda
	LC063702.1	*O. stephanostomum*	*P. t. schweinfurthii*	Uganda
	LC063703.1	*O. stephanostomum*	*P. t. schweinfurthii*	Uganda
	LC063704.1	*O. stephanostomum*	*P. t. schweinfurthii*	Uganda
	LC063705.1	*O. stephanostomum*	*P. t. schweinfurthii*	Uganda
	LC063707.1	*O. stephanostomum*	*P. t. schweinfurthii*	Uganda
	LC063709.1	*O. stephanostomum*	*P. t. schweinfurthii*	Uganda
	LC063710.1	*O. stephanostomum*	*P. t. schweinfurthii*	Uganda
	LC063711.1	*O. stephanostomum*	*P. t. schweinfurthii*	Uganda
14.	**KR149648.1**	*O. stephanostomum*	*P. t. schweinfurthii*	Uganda
15.	**AF136575.1**	*O. bifurcum*	*Cercopithecus mona*	Ghana
16.	**AF136576.1**	*O. stephanostomum*	*Pan troglodytes*	Tanzania
17.	**KF250649.1**	*O. bifurcum*	*Cercopithecus lhoesti*	Uganda
	KF250589.1	*O. bifurcum*	Red colobus	Uganda
18.	**KF250654.1**	*O. bifurcum*	*Papio anubis*	Uganda
	KF250626.1	*O. bifurcum*	Red colobus	Uganda
19.	**KF319025.1**	*O. bifurcum*	*Macaca fascicularis*	China
	KF319024.1	*O. bifurcum*	*Macaca fascicularis*	China
20.	**KF319026.1**	*O. bifurcum*	*Macaca fascicularis*	China
21.	**KR149652.1**	*O. bifurcum*	*Papio anubis*	Uganda
22.	**KR149653.1**	*O. bifurcum*	*P. t. schweinfurthii*	Uganda
23.	**KR149655.1**	*O. bifurcum*	*Papio anubis*	Uganda
24.	**KR149656.1**	*O. bifurcum*	*P. t. schweinfurthii*	Uganda
25.	**KT215379.1**	*O. bifurcum*	*Papio cynocephalus*	Kenya
26.	**LC063694.1**	*O. bifurcum*	*P. t. schweinfurthii*	Uganda
27.	**LC063695.1**	*O. bifurcum*	*P. t. schweinfurthii*	Uganda
28.	**LC063696.1**	*O. bifurcum*	*P. t. schweinfurthii*	Uganda
	KF250587.1	*O. bifurcum*	*Cercopithecus ascanius*	Uganda
	KF250590.1	*O. bifurcum*	Red colobus	Uganda
	KF250591.1	*O. bifurcum*	*Papio anubis*	Uganda
	KF250596.1	*O. bifurcum*	*Lophocebus albigena*	Uganda
	KF250600.1	*O. bifurcum*	*Papio anubis*	Uganda
	KF250601.1	*O. bifurcum*	*Papio anubis*	Uganda
	KF250602.1	*O. bifurcum*	*Papio anubis*	Uganda
	KF250603.1	*O. bifurcum*	*Papio anubis*	Uganda
	KF250604.1	*O. bifurcum*	*Papio anubis*	Uganda
	KF250609.1	*O. bifurcum*	*Papio anubis*	Uganda
	KF250610.1	*O. bifurcum*	*Papio anubis*	Uganda
	KF250627.1	*O. bifurcum*	*Papio anubis*	Uganda
	KF250628.1	*O. bifurcum*	*Papio anubis*	Uganda

	KF250629.1	*O. bifurcum*	*Papio anubis*	Uganda
	KR149654.1	*O. bifurcum*	*Colobus guereza*	Uganda
	KR149657.1	*O. bifurcum*	*Papio anubis*	Uganda
	KT592234.1	*O. bifurcum*	*P. t. schweinfurthii*	Uganda
	LC063714.1	*O. bifurcum*	*Papio cynocephalus*	Tanzania
	LC063715.1	*O. bifurcum*	*Papio cynocephalus*	Tanzania
	LC063718.1	*O. bifurcum*	*Papio cynocephalus*	Tanzania
	LC063719.1	*O. bifurcum*	*Papio ursinus*	SAR
29.	**LC063712.1**	*O. bifurcum*	*Papio cynocephalus*	Tanzania
30.	**LC063713.1**	*O. bifurcum*	*Papio cynocephalus*	Tanzania
31.	**LC063716.1**	*O. bifurcum*	*Papio cynocephalus*	Tanzania
32.	**LC063717.1**	*O. bifurcum*	*Papio cynocephalus*	Tanzania
	LC063693.1	*O. bifurcum*	*P. t. schweinfurthii*	Uganda
33.	**LC063720.1**	*O. bifurcum*	*Papio ursinus*	SAR
34.	**Y11733.1**	*O. bifurcum*	*Homo sapiens*	Togo
35.	**KF250645.1**	*Oesophagostomum sp.*	*Cercopithecus lhoesti*	Uganda
	KF250646.1	*Oesophagostomum sp.*	*Cercopithecus lhoesti*	Uganda
	KF250650.1	*Oesophagostomum sp.*	*Cercopithecus lhoesti*	Uganda
	KF250651.1	*Oesophagostomum sp.*	*Cercopithecus lhoesti*	Uganda
	KF250652.1	*Oesophagostomum sp.*	*Cercopithecus lhoesti*	Uganda
36.	**KF250655.1**	*Oesophagostomum sp.*	*Homo sapiens*	Uganda
	KF250657.1	*Oesophagostomum sp.*	*Homo sapiens*	Uganda
37.	**KF250593.1**	*Oesophagostomum sp.*	*Cercopithecus ascanius*	Uganda
	KF250597.1	*Oesophagostomum sp.*	*Lophocebus albigena*	Uganda
	KF250607.1	*Oesophagostomum sp.*	*Lophocebus albigena*	Uganda
	KF250608.1	*Oesophagostomum sp.*	*Lophocebus albigena*	Uganda
	KF250611.1	*Oesophagostomum sp.*	*Colobus guereza*	Uganda
	KF250620.1	*Oesophagostomum sp.*	*Colobus guereza*	Uganda
	KF250621.1	*Oesophagostomum sp.*	*Colobus guereza*	Uganda
	KF250622.1	*Oesophagostomum sp.*	*Cercopithecus mitis*	Uganda
	KF250623.1	*Oesophagostomum sp.*	*Cercopithecus mitis*	Uganda
	KF250624.1	*Oesophagostomum sp.*	Red colobus	Uganda
	KF250625.1	*Oesophagostomum sp.*	Red colobus	Uganda
	KF250630.1	*Oesophagostomum sp.*	*Cercopithecus mitis*	Uganda
	KF250632.1	*Oesophagostomum sp.*	*Lophocebus albigena*	Uganda
	KF250633.1	*Oesophagostomum sp.*	*Lophocebus albigena*	Uganda
	KF250636.1	*Oesophagostomum sp.*	*Cercopithecus ascanius*	Uganda
	KF250656.1	*Oesophagostomum sp.*	*Homo sapiens*	Uganda
	KF250658.1	*Oesophagostomum sp.*	*Homo sapiens*	Uganda
	KF250659.1	*Oesophagostomum sp.*	*Homo sapiens*	Uganda
	KF250660.1	*Oesophagostomum sp.*	*Homo sapiens*	Uganda
	KR149658.1	*Oesophagostomum sp.*	*Papio anubis*	Uganda
38.	**KF319023.1**	*O. aculeatum*	*Macaca fascicularis*	China
	KF319022.1	*O. aculeatum*	*Macaca fascicularis*	China
39.	**LC063721.1**	*O. aculeatum*	*Macaca fuscata*	Japan
40.	**LC063722.1**	*O. aculeatum*	*Macaca fuscata*	Japan
41.	**LC428824.1***	*O. aculeatum*	*Pongo pygmaeus*	Malaysia

SAR – South African Republic

* - Even though the sequence is labeled as *O. aculeatum*, it is probably *Ternidens deminutus* and is not included in the final tree

Table S2-B
List of *Oesophagostumum* spp. ITS2 sequences generated in this study, their assignment to the haplogroups, and Genbank accesion numbers together with the information on host and locality. The sequences in bold are representatives for the given haplogroup and were used in the phylogenetic tree.

Haplotype	Sequence	Accession number	Host	Locality
OH1 (N=107)	**913_CHI_GAB**	MW528465	*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	762_CHI_CAM		*Pan troglodytes*	Cameroon, MB
	769_CHI_ CAM		*Pan troglodytes*	Cameroon, MB
	774_CHI_ CAM		*Pan troglodytes*	Cameroon, MB
	775_CHI_ CAM		*Pan troglodytes*	Cameroon, MB
	914_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	917_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	932_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	934_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	941_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	949_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	951_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	953_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	956_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	956_CHI_CAM		*Pan troglodytes*	Cameroon, SOM
	957_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	960_CHI_CAM		*Pan troglodytes*	Cameroon, SOM
	962_CHI_CAM		*Pan troglodytes*	Cameroon, SOM
	977_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	987_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	988_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	990_CHI_CAM		*Pan troglodytes*	Cameroon, SOM
	991_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	994_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	995_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	998_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	999_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	1000_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	1002_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	1008_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	1015_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	1022_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	1023_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	1024_CHI_GAB_B		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	1028_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	1029_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	1032_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	1169_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	1179_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	1188_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	1225_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	1226_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	1228_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	1236_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	1243_CHI_GAB_B		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	1250_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	1264_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	1284_CHI_GAB_A		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	1294_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT

	1295_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	1298_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	1299_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	1316_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	1330_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	1331_CHI_GAB_B		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	1340_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	1344_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	1345_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	1347_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	1369_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	1464_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	1468_CHI_GAB_A		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	1472_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	1508_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	1972_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	2307_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	2313_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	2347_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	2480_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	2492_CHI_GAB_A		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	2504_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	5149_AGILIS_CAM_A	MW621352	*Cercocebus agilis*	Cameroon, MB
	5150_AGILIS_CAM_A		*Cercocebus agilis*	Cameroon, MB
	4874_CHI_CAM	MW621348	*Pan troglodytes*	Cameroon, SOM
	4875_CHI_CAM		*Pan troglodytes*	Cameroon, SOM
	4876_CHI_CAM		*Pan troglodytes*	Cameroon, SOM
	4877_CHI_CAM		*Pan troglodytes*	Cameroon, SOM
	6945_CHI_CAM_A		*Pan troglodytes*	Cameroon, MB
	6948_CHI_CAM	MW621355	*Pan troglodytes*	Cameroon, MB
	6950_CHI_CAM		*Pan troglodytes*	Cameroon, MB
	6951_CHI_CAM		*Pan troglodytes*	Cameroon, MB
	6952_CHI_CAM		*Pan troglodytes*	Cameroon, MB
	6955_CHI_CAM		*Pan troglodytes*	Cameroon, MB
	6956_CHI_CAM		*Pan troglodytes*	Cameroon, MB
	6957_CHI_CAM		*Pan troglodytes*	Cameroon, MB
	6958_CHI_CAM_A		*Pan troglodytes*	Cameroon, MB
	6959_CHI_CAM_A		*Pan troglodytes*	Cameroon, MB
	8385_CHI_CAM_A		*Pan troglodytes*	Cameroon, MB
	5324_GOR_CAM_A		*Gorilla gorilla*	Cameroon, MB
	5333_GOR_CAM_A		*Gorilla gorilla*	Cameroon, MB
	5360_GOR_CAM_A		*Gorilla gorilla*	Cameroon, MB
	9818_GOR_CAM	MW621358	*Gorilla gorilla*	Cameroon, SOM
	9819_GOR_CAM		*Gorilla gorilla*	Cameroon, SOM
	9820_GOR_CAM		*Gorilla gorilla*	Cameroon, SOM
	9821_GOR_CAM		*Gorilla gorilla*	Cameroon, SOM
	9822_GOR_CAM		*Gorilla gorilla*	Cameroon, SOM
	9823_GOR_CAM		*Gorilla gorilla*	Cameroon, SOM
	9824_GOR_CAM		*Gorilla gorilla*	Cameroon, SOM
	9826_GOR_CAM		*Gorilla gorilla*	Cameroon, SOM
	9829_GOR_CAM		*Gorilla gorilla*	Cameroon, SOM
	9830_GOR_CAM		*Gorilla gorilla*	Cameroon, SOM
	9846_GOR_CAM		*Gorilla gorilla*	Cameroon, SOM
	9847_GOR_CAM		*Gorilla gorilla*	Cameroon, SOM
	9848_GOR_CAM		*Gorilla gorilla*	Cameroon, SOM
	9965_GOR_CAM	MW621361	*Gorilla gorilla*	Cameroon, LB
	10015_GOR_CAM_A	MW621363	*Gorilla gorilla*	Cameroon, MB
	10017_GOR_CAM_A		*Gorilla gorilla*	Cameroon, MB

OH2 (N=33)	**962_CHI_GAB**	MW528472	*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	989_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	988_CHI_CAM_R_B		*Pan troglodytes*	Cameroon, SOM
	989_CHI_CAM_R_A	MW621343	*Pan troglodytes*	Cameroon, SOM
	1003_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	1011_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	1214_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	1267_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	1277_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	1279_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	1296_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	1301_CHI_GAB_B		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	1305_CHI_GAB_B		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	1334_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	1342_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	2364_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	2366_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	2501_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	5134_CHI_CAM_B		*Pan troglodytes*	Cameroon, MB
	5136_CHI_CAM_B		*Pan troglodytes*	Cameroon, MB
	5137_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	5138_CHI_CAM	MW621350	*Pan troglodytes*	Cameroon, MB
	5147_CHI_GAB_B		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	5151_CHI_CAM_B		*Pan troglodytes*	Cameroon, MB
	5157_CHI_CAM_B		*Pan troglodytes*	Cameroon, MB
	5354_GOR_CAM		*Gorilla gorilla*	Cameroon, MB
	9805_GOR_CAM_A		*Gorilla gorilla*	Cameroon, SOM
	9827_GOR_CAM	MW621359	*Gorilla gorilla*	Cameroon, SOM
	9835_GOR_CAM		*Gorilla gorilla*	Cameroon, SOM
	9838_GOR_CAM_R_A		*Gorilla gorilla*	Cameroon, SOM
	9844_GOR_CAM_R_B		*Gorilla gorilla*	Cameroon, SOM
	10013_GOR_CAM	MW621362	*Gorilla gorilla*	Cameroon, MB
OH1 or OH2 (N=13)	944_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	950_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	965_CHI_CAM		*Pan troglodytes*	Cameroon, SOM
	966_CHI_CAM		*Pan troglodytes*	Cameroon, SOM
	984_CHI_CAM		*Pan troglodytes*	Cameroon, SOM
	1266_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	1291_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	1311_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	1350_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	5338_GOR_CAM		*Gorilla gorilla*	Cameroon, MB
	9801_GOR_CAM		*Gorilla gorilla*	Cameroon, SOM
	9802_GOR_CAM		*Gorilla gorilla*	Cameroon, SOM
	9825_GOR_CAM		*Gorilla gorilla*	Cameroon, SOM
OH3 (N=20)	**1024_CHI_GAB_A**	MW528473	*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	1220_CHI_GAB		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	1243_CHI_GAB_A		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	1284_CHI_GAB_B		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	1331_CHI_GAB_A		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	1468_CHI_GAB_B		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	2492_CHI_GAB_B		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	5149_AGILIS_CAM_B	MW621353	*Cercocebus agilis*	Cameroon, MB
	5150_AGILIS_CAM_B		*Cercocebus agilis*	Cameroon, MB
	6945_CHI_CAM_B	MW621354	*Pan troglodytes*	Cameroon, MB
	6958_CHI_CAM_B		*Pan troglodytes*	Cameroon, MB
	6959_CHI_CAM_B		*Pan troglodytes*	Cameroon, MB

	8385_CHI_CAM_B		*Pan troglodytes*	Cameroon, MB
	5324_GOR_CAM_B		*Gorilla gorilla*	Cameroon, MB
	5333_GOR_CAM_B		*Gorilla gorilla*	Cameroon, MB
	5360_GOR_CAM_B		*Gorilla gorilla*	Cameroon, MB
	9845_GOR_CAM	MW621360	*Gorilla gorilla*	Cameroon, SOM
	9849_GOR_CAM		*Gorilla gorilla*	Cameroon, SOM
	10015_GOR_CAM_B	MW621364	*Gorilla gorilla*	Cameroon, MB
	10017_GOR_CAM_B		*Gorilla gorilla*	Cameroon, MB
OH4 (N=9)	**1301_CHI_GAB_A**	MW528474	*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	1000_CHI_CAM_R_B	MW621345	*Pan troglodytes*	Cameroon, SOM
	1305_CHI_GAB_A		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	5134_CHI_CAM_A	MW621349	*Pan troglodytes*	Cameroon, MB
	5136_CHI_CAM_A		*Pan troglodytes*	Cameroon, MB
	5147_CHI_GAB_A		*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	5148_CHI_CAM_A		*Pan troglodytes*	Cameroon, MB
	5151_CHI_CAM_A		*Pan troglodytes*	Cameroon, MB
	5157_CHI_CAM_A		*Pan troglodytes*	Cameroon, MB
OH5 (N=7)	**939_CHI_GAB_A**	MW528466	*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
	988_CHI_CAM_R_A	MW621344	*Pan troglodytes*	Cameroon, SOM
	989_CHI_CAM_R_B		*Pan troglodytes*	Cameroon, SOM
	1000_CHI_CAM_R_A		*Pan troglodytes*	Cameroon, SOM
	5148_CHI_CAM_B	MW621351	*Pan troglodytes*	Cameroon, MB
	9805_GOR_CAM_B	MW621357	*Gorilla gorilla*	Cameroon, SOM
	9838_GOR_CAM_R_B		*Gorilla gorilla*	Cameroon, SOM
OH6 (N=1)	**954_CHI_GAB**	MW528468	*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
OH7 (N=1)	**9844_GOR_CAM_R_A**	MW528480	*Gorilla gorilla*	Cameroon, SOM
OH8 (N=3)	**9803_GOR_CAM**	MW528479	*Gorilla gorilla*	Cameroon, SOM
	9804_GOR_CAM		*Gorilla gorilla*	Cameroon, SOM
	9806_GOR_CAM		*Gorilla gorilla*	Cameroon, SOM
OH9 (N= 4)	**957_CHI_CAM_B**	MW528470	*Pan troglodytes*	Cameroon, SOM
	961_CHI_CAM_A		*Pan troglodytes*	Cameroon, SOM
	3342_CEB_CAM_A	MW621347	*Cercocebus torquatus*	Cameroon, DJ
	6954_CHI_CAM	MW621356	*Pan troglodytes*	Cameroon, MB
OH10 (N=2)	**957_CHI_CAM_A**	MW528469	*Pan troglodytes*	Cameroon, SOM
	958_CHI_CAM_A		*Pan troglodytes*	Cameroon, SOM
OH11 (N=2)	**958_CHI_CAM_B**	MW528471	*Pan troglodytes*	Cameroon, SOM
	961_CHI_CAM_B		*Pan troglodytes*	Cameroon, SOM
OH12 (N=1)	**3342_CEB_CAM_B**	MW528476	*Cercocebus torquatus*	Cameroon, DJ
OH13 (N=2)	**9800_CEB_CAM_A**	MW528477	*Cercocebus torquatus*	Cameroon, SOM
	3341_CEB_CAM	MW621346	*Cercocebus torquatus*	Cameroon, DJ
OH14 (N=1)	**9800_CEB_CAM_B**	MW528478	*Cercocebus torquatus*	Cameroon, SOM
OH15 (N=3)	**3335_MDR_CAM**	MW528475	*Mandrillus sphinx*	Cameroon, DJ
	3336_MDR_CAM		*Mandrillus sphinx*	Cameroon, DJ
	3337_MDR_CAM		*Mandrillus sphinx*	Cameroon, DJ
OH16 (N=1)	**939_CHI_GAB_B**	MW528467	*Pan troglodytes*	Gabon, MKT
OH17(N=4)*	8386_CHI_CAM	MW617066	*Pan troglodytes*	Cameroon, MB
	4879_CRP_CAM	MW617064	*Cercopithecus nictitans*	Cameroon, SOM
	4880_CRP_CAM	MW617064	*Cercopithecus nictitans*	Cameroon, SOM
	6960_CRP_CAM	MW617065	*Cercopithecus nictitans*	Cameroon, MB

DJ – Djoum; MB – Mambele NP; MKT – Makamangoye; LB – Lobéké NP; SOM – Somalomo
* - This haplotypes belong to *Ternidens deminutus* and this haplotype was not used in the phylogenetic tree

Table S3 Sequences of *Trichuris* spp. Downloaded from GenBank and used in phylogenetic analysis

Hap	Accession No.	Name	Host	Country
1	**GQ301554**	*T. trichiura*	*Papio hamadryas*	South Africa
2	**KP336482**	*Trichuris* sp.	*Chlorocebus aethiops*	Italy
3	**KJ588160**	*T. trichiura*	*Pan troglodytes*	Uganda
4	**KP336479**	*Trichuris* sp.	*Chlorocebus aethiops*	Italy
5	**KP336484**	*Trichuris* sp.	*Chlorocebus aethiops*	Italy
	KP336480	*Trichuris* sp.	*Chlorocebus aethiops*	Italy
	KP336478	*Trichuris* sp.	*Chlorocebus aethiops*	Italy
	KP336483	*Trichuris* sp.	*Chlorocebus aethiops*	Italy
	KP336481	*Trichuris* sp.	*Chlorocebus aethiops*	Italy
	KJ588153	*T. trichiura*	*Cercopithecus ascanius*	Uganda
	KJ588165	*T. trichiura*	*Cercopithecus mitis*	Uganda
	KJ588149	*T. trichiura*	*Colobus guereza*	Uganda
	KJ588148	*T. trichiura*	*Cercopithecus ascanius*	Uganda
	KJ588139	*T. trichiura*	*Colobus guereza*	Uganda
	KJ588146	*T. trichiura*	*Colobus guereza*	Uganda
	KJ588144	*T. trichiura*	*Procolobus rufonitratus*	Uganda
	KJ588138	*T. trichiura*	*Cercopithecus mitis*	Uganda
6	**KJ588142**	*T. trichiura*	*Procolobus rufonitratus*	Uganda
	KJ588166	*T. trichiura*	*Colobus guereza*	Uganda
	KJ588141	*T. trichiura*	*Cercopithecus mitis*	Uganda
7	**KJ588156**	*T. trichiura*	*Cercopithecus mitis*	Uganda
8	**GQ301555**	*T. trichiura*	*Homo sapiens*	Cameroon
9	**KJ588162**	*T. trichiura*	*Procolobus rufonitratus*	Uganda
10	**KJ588137**	*T. trichiura*	*Procolobus rufonitratus*	Uganda
11	**JF690944**	*Trichuris* sp.	*Chlorocebus aethiops salaeus*	Czech Republic
	JF690945	*Trichuris* sp.	*Macaca silenus*	Czech Republic
	KJ588135	*T. trichiura*	*Cercopithecus ascanius*	Uganda
	KJ588157	*T. trichiura*	*Colobus guereza*	Uganda
	KJ588158	*T. trichiura*	*Colobus guereza*	Uganda
	KJ588159	*T. trichiura*	*Homo sapiens*	Uganda
	KJ588161	*T. trichiura*	*Colobus guereza*	Uganda
	KJ588164	*T. trichiura*	*Cercopithecus lhoesti*	Uganda
	KJ588163	*T. trichiura*	*Cercopithecus lhoesti*	Uganda
	KJ588140	*T. trichiura*	*Procolobus rufonitratus*	Uganda
	KJ588150	*T. trichiura*	*Cercopithecus ascanius*	Uganda
	KJ588145	*T. trichiura*	*Cercopithecus ascanius*	Uganda
	KJ588152	*T. trichiura*	*Papio anubis*	Uganda
	KJ588154	*T. trichiura*	*Papio anubis*	Uganda
	KJ588147	*T. trichiura*	*Lophocebus albigena*	Uganda
	KJ588143	*T. trichiura*	*Cercopithecus mitis*	Uganda
	KJ588155	*T. trichiura*	*Papio anubis*	Uganda
	KJ588151	*T. trichiura*	*Homo sapiens*	Uganda
	KJ588136	*T. trichiura*	*Colobus guereza*	Uganda
12	**FM991955**	*T. colobae*	*Colobus guereza kikuyuensis*	Spain
	FM991956	*T. colobae*	*Nomascus gabriellae*	Spain
13	**AM993002**	*T. suis*	N/A	China
14	**AM993012**	*T. suis*	N/A	China

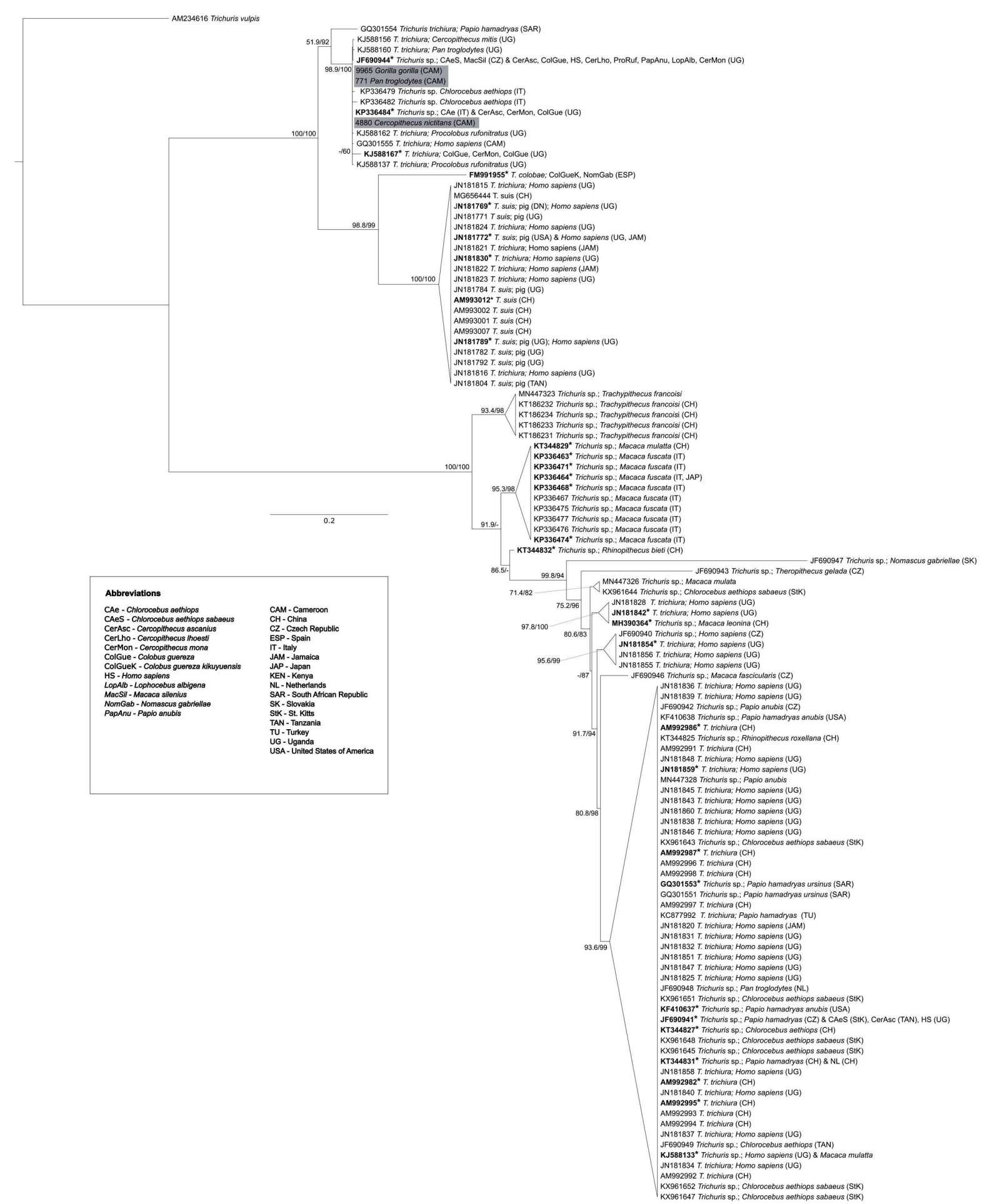
	AM993013	*T. suis*	N/A	China
15	**MG656444**	*T. suis*	N/A	China
16	**JN181822**	*T. trichiura*	*Homo sapiens*	Jamaica
17	**JN181823**	*T. trichiura*	*Homo sapiens*	Uganda
18	**AM993007**	*T. suis*	N/A	China
19	**AM993001**	*T. suis*	N/A	China
20	**JN181771**	*T. suis*	Pig	Uganda
21	**JN181830**	*T. trichiura*	*Homo sapiens*	Uganda
	JN181829	*T. trichiura*	*Homo sapiens*	Uganda
22	**JN181821**	*T. trichiura*	*Homo sapiens*	Jamaica
23	**JN181824**	*T. trichiura*	*Homo sapiens*	Uganda
24	**JN181772**	*T. suis*	Pig	USA
	JN181817	*T. trichiura*	*Homo sapiens*	Jamaica
	JN181818	*T. trichiura*	*Homo sapiens*	Jamaica
	JN181819	*T. trichiura*	*Homo sapiens*	Jamaica
	JN181826	*T. trichiura*	*Homo sapiens*	Uganda
25	**JN181815**	*T. trichiura*	*Homo sapiens*	Uganda
26	**JN181769**	*T. suis*	Pig	Denmark
	JN181814	*T. trichiura*	*Homo sapiens*	Uganda
27	**JN181782**	*T. suis*	Pig	Uganda
28	**JN181784**	*T. suis*	Pig	Uganda
29	**JN181816**	*T. trichiura*	*Homo sapiens*	Uganda
30	**JN181792**	*T. suis*	Pig	Uganda
31	**JN181804**	*T. suis*	Pig	Tanzania
32	**JN181789**	*T. suis*	Pig	Uganda
	JN181812	*T. trichiura*	*Homo sapiens*	Uganda
	JN181813	*T. trichiura*	*Homo sapiens*	Uganda
33	**JF690943**	*Trichuris* sp.	*Theropithecus gelada*	Czech Republic
34	**JN181856**	*T. trichiura*	*Homo sapiens*	Uganda
35	**JF690940**	*Trichuris* sp.	*Homo sapiens*	Czech Republic
36	**JN181855**	*T. trichiura*	*Homo sapiens*	Uganda
37	**JN181854**	*T. trichiura*	*Homo sapiens*	Uganda
	JN181852	*T. trichiura*	*Homo sapiens*	Uganda
	JN181853	*T. trichiura*	*Homo sapiens*	Uganda
38	**JN181842**	*T. trichiura*	*Homo sapiens*	Uganda
	JN181841	*T. trichiura*	*Homo sapiens*	Uganda
	JN181835	*T. trichiura*	*Homo sapiens*	Uganda
39	**JN181839**	*T. trichiura*	*Homo sapiens*	Uganda
40	**JN181836**	*T. trichiura*	*Homo sapiens*	Uganda
41	**JN181847**	*T. trichiura*	*Homo sapiens*	Uganda
42	**JN181825**	*T. trichiura*	*Homo sapiens*	Uganda
43	**JN181831**	*T. trichiura*	*Homo sapiens*	Uganda
44	**JN181832**	*T. trichiura*	*Homo sapiens*	Uganda
45	**JN181851**	*T. trichiura*	*Homo sapiens*	Uganda
46	**JN181820**	*T. trichiura*	*Homo sapiens*	Jamaica
47	**KF410637**	*Trichuris* sp.	*Papio hamadryas anubis*	USA
	KF410636	*Trichuris* sp.	*Papio hamadryas*	Denmark
	KF410635	*Trichuris* sp.	*Papio hamadryas anubis/ Papio h. cynocephalus*	USA
48	**KX961651**	*Trichuris* sp.	*Chlorocebus aethiops salaeus*	St. Kitt‘s
49	**JF690941**	*Trichuris* sp.	*Papio hamadryas*	Czech Republic
	JF690950	*Trichuris* sp.	*Chlorocebus aethiops*	Tanzania
	MH390360	*Trichuris* sp.	*Papio anubis*	China
	MH390361	*Trichuris* sp.	*Papio anubis*	China
	MH390359	*Trichuris* sp.	*Papio anubis*	China
	KT344826	*Trichuris* sp.	*Papio anubis*	China
	KX961646	*Trichuris* sp.	*Chlorocebus aethiops salaeus*	St. Kitts and Nevis
	KX961642	*Trichuris* sp.	*Chlorocebus aethiops salaeus*	St. Kitts and Nevis

	KX961649	*Trichuris* sp.	*Chlorocebus aethiops salaeus*	St. Kitts and Nevis
	KX961650	*Trichuris* sp.	*Chlorocebus aethiops salaeus*	St. Kitts and Nevis
	KX961653	*Trichuris* sp.	*Chlorocebus aethiops salaeus*	St. Kitts and Nevis
	JN181827	*T. trichiura*	*Homo sapiens*	Uganda
	JN181849	*T. trichiura*	*Homo sapiens*	Uganda
	JN181850	*T. trichiura*	*Homo sapiens*	Uganda
50	**JF690948**	*Trichuris* sp.	*Pan troglodytes*	Netherlands
51	**JN181838**	*T. trichiura*	*Homo sapiens*	Uganda
52	**JN181846**	*T. trichiura*	*Homo sapiens*	Uganda
53	**JN181848**	*T. trichiura*	*Homo sapiens*	Uganda
54	**JN181859**	*T. trichiura*	*Homo sapiens*	Uganda
	JN181857	*T. trichiura*	*Homo sapiens*	Uganda
55	**KF410638**	*Trichuris* sp.	*Papio hamadryas anubis*	USA
56	**JN181828**	*T. trichiura*	*Homo sapiens*	Uganda
57	**JN181858**	*T. trichiura*	*Homo sapiens*	Uganda
58	**MH390364**	*Trichuris* sp.	*Macaca leonina*	China
	MH390365	*Trichuris* sp.	*Trichuris* sp.	China
	KT344828	*Trichuris* sp.	*Trichuris* sp.	China
59	**JF690946**	*Trichuris* sp.	Macaca fascicularis	Czech Republic
60	**AM992994**	*T. trichiura*	N/A	China
	JN181837	*T. trichiura*	*Homo sapiens*	Uganda
61	**AM992996**	*T. trichiura*	N/A	China
62	**JF690942**	*Trichuris* sp.	*Papio anubis*	Czech Republic
63	**MN447326**	*Trichuris* sp.	*Macaca mulatta*	N/A
64	**JN181843**	*T. trichiura*	*Homo sapiens*	Uganda
65	**JN181860**	*T. trichiura*	*Homo sapiens*	Uganda
66	**KX961644**	*Trichuris* sp.	*Chlorocebus aethiops salaeus*	St. Kitt‘s
67	**JN181845**	*T. trichiura*	*Homo sapiens*	Uganda
68	**JN181840**	*T. trichiura*	*Homo sapiens*	Uganda
69	**AM992995**	*T. trichiura*	N/A	China
	AM992984	*T. trichiura*	N/A	China
70	**KX961647**	*Trichuris* sp.	*Chlorocebus aethiops salaeus*	St. Kitts and Nevis
71	**KX961652**	*Trichuris* sp.	*Chlorocebus aethiops salaeus*	St. Kitts and Nevis
72	**MN447328**	*Trichuris* sp.	*Papio anubis*	N/A
73	**KT344825**	*Trichuris* sp.	*Rhinopithecus roxellana*	China
74	**JF690949**	*Trichuris* sp.	*Chlorocebus aethiops*	Tanzania
75	**KT344827**	*Trichuris* sp.	*Chlorocebus aethiops*	China
	MH390370	*Trichuris* sp.	*Chlorocebus aethiops*	China
76	**KX961645**	*Trichuris* sp.	*Chlorocebus aethiops salaeus*	St. Kitts and Nevis
77	**KX961648**	*Trichuris* sp.	*Chlorocebus aethiops salaeus*	St. Kitts and Nevis
78	**KT344831**	*Trichuris* sp.	*Papio hamadryas*	China
	KT344830	*Trichuris* sp.	*Nomascus leucogenys*	China
	MH390366	*Trichuris* sp.	*Nomascus leucogenys*	China
	MH390363	*Trichuris* sp.	*Papio hamadryas*	China
79	GQ301553	*Trichuris* sp.	*Papio hamadryas ursinus*	South Africa
	GQ301552	*Trichuris* sp.	*Papio hamadryas ursinus*	South Africa
80	**GQ301551**	*Trichuris* sp.	*Papio hamadryas ursinus*	South Africa
81	**KX9616643**	*Trichuris* sp.	*Chlorocebus aethiops salaeus*	St. Kitts and Nevis
82	**KC877992**	*T. trichiura*	*Papio hamadryas*	Turkey
83	**AM992998**	*T. trichiura*	N/A	China
84	**AM992997**	*T. trichiura*	N/A	China
85	**AM992993**	*T. trichiura*	N/A	China
86	**AM992992**	*T. trichiura*	N/A	China
	AM992990	*T. trichiura*	N/A	China
87	**AM992991**	*T. trichiura*	N/A	China
88	**AM992987**	*T. trichiura*	N/A	China
	AM992988	*T. trichiura*	N/A	China
	AM992989	*T. trichiura*	N/A	China

89	**AM992986**	*T. trichiura*	N/A	China
	AM992985	*T. trichiura*	N/A	China
90	**AM992982**	*T. trichiura*	N/A	China
	AM992983	*T. trichiura*	N/A	China
	AM992981	*T. trichiura*	N/A	China
91	**JF690947**	*Trichuris* sp.	*Nomascus gabriellae*	Slovakia
92	**MN44732**	*Trichuris* sp.	*Trachypithecus francoisi*	China
93	**KT186233**	*Trichuris* sp.	*Trachypithecus francoisi*	China
94	**KT186232**	*Trichuris* sp.	*Trachypithecus francoisi*	China
95	**KT186231**	*Trichuris* sp.	*Trachypithecus francoisi*	China
96	**KT186234**	*Trichuris* sp.	*Trachypithecus francoisi*	China
97	**KJ588133**	*Trichuris* sp.	*Homo sapiens*	Uganda
	KJ588134	*Trichuris* sp.	*Homo sapiens*	Uganda
	JN181833	*T. trichiura*	*Homo sapiens*	Uganda
	JN181844	*T. trichiura*	*Homo sapiens*	Uganda
	MN447327	*Trichuris* sp.	*Macaca mulatta*	N/A
98	JN181834	*T. trichiura*	*Homo sapiens*	Uganda
99	**KT344832**	*Trichuris* sp.	*Rhinopithecus bieti*	China
	MH390367	*Trichuris* sp.	*Rhinopithecus bieti*	China
100	**KP336477**	*Trichuris* sp.	*Macaca fuscata*	Italy
101	**KP336467**	*Trichuris* sp.	*Macaca fuscata*	Italy
102	**KT344829**	*Trichuris* sp.	*Macaca mulatta*	China
	MH390367	*Trichuris* sp.	*Macaca mulatta*	China
	MH390368	*Trichuris* sp.	*Macaca mulatta*	China
	MH390369	*Trichuris* sp.	*Macaca mulatta*	China
103	**KP336476**	*Trichuris* sp.	*Macaca fuscata*	Italy
104	**KP336474**	*Trichuris* sp.	*Macaca fuscata*	Italy
	KP336473	*Trichuris* sp.	*Macaca fuscata*	Italy
105	**KP336475**	*Trichuris* sp.	*Macaca fuscata*	Italy
106	**KP336464**	*Trichuris* sp.	*Macaca fuscata*	Italy
	AB586133	*T. trichiura*	*Macaca fuscata*	Japan
107	**KP336463**	*Trichuris* sp.	*Macaca fuscata*	Italy
	KP336462	*Trichuris* sp.	*Macaca fuscata*	Italy
	KP336461	*Trichuris* sp.	*Macaca fuscata*	Italy
	KP336460	*Trichuris* sp.	*Macaca fuscata*	Italy
108	**KP336468**	*Trichuris* sp.	*Macaca fuscata*	Italy
	KP336465	*Trichuris* sp.	*Macaca fuscata*	Italy
	KP336466	*Trichuris* sp.	*Macaca fuscata*	Italy
	KP336469	*Trichuris* sp.	*Macaca fuscata*	Italy
	KP336470	*Trichuris* sp.	*Macaca fuscata*	Italy
	KP336472	*Trichuris* sp.	*Macaca fuscata*	Italy
109	**KP336471**	*Trichuris* sp.	*Macaca fuscata*	Italy
	KP336459	*Trichuris* sp.	*Macaca fuscata*	Italy
110	**KJ588167**	*T. trichiura*	*Colobus guereza*	Uganda

Our sequences:

9965_GOR_CAM	**MW528545**	*Trichuris* sp.	*Gorilla gorilla*	Cameroon
771_CHI_CAM	**MW528546**	*Trichuris* sp.	*Pan troglodytes*	Cameroon
4880_CRP_CAM	**MW528547**	*Trichuris* sp.	*Cercopithecus nictitans*	Cameroon


AM234616 Trichuris vulpis
GQ301554 Trichuris trichiura; Papio hamadryas (SAR)
KJ588156 T. trichiura; Cercopithecus mitis (UG)
KJ588160 T. trichiura; Pan troglodytes (UG)
JF690944* Trichuris sp.; CAeS, MacSil (CZ) & CerAsc, ColGue, HS, CerLho, ProRuf, PapAnu, LopAlb, CerMon (UG)
9965 Gorilla gorilla (CAM)
771 Pan troglodytes (CAM)
KP336479 Trichuris sp. Chlorocebus aethiops (IT)
KP336482 Trichuris sp. Chlorocebus aethiops (IT)
KP336484* Trichuris sp.; CAe (IT) & CerAsc, CerMon, ColGue (UG)
4880 Cercopithecus nictitans (CAM)
KJ588162 T. trichiura; Procolobus rufonitratus (UG)
GQ301555 T. trichiura; Homo sapiens (CAM)
KJ588167* T. trichiura; ColGue, CerMon, ColGue (UG)
KJ588137 T. trichiura; Procolobus rufonitratus (UG)
FM991955* T. colobae; ColGueK, NomGab (ESP)
JN181815 T. trichiura; Homo sapiens (UG)
MG656444 T. suis (CH)
JN181769* T. suis; pig (DN); Homo sapiens (UG)
JN181771 T suis; pig (UG)
JN181824 T. trichiura; Homo sapiens (UG)
JN181772* T. suis; pig (USA) & Homo sapiens (UG, JAM)
JN181821 T. trichiura; Homo sapiens (JAM)
JN181830* T. trichiura; Homo sapiens (UG)
JN181822 T. trichiura; Homo sapiens (JAM)
JN181823 T. trichiura; Homo sapiens (UG)
JN181784 T. suis; pig (UG)
AM993012* T. suis (CH)
AM993002 T. suis (CH)
AM993001 T. suis (CH)
AM993007 T. suis (CH)
JN181789* T. suis; pig (UG); Homo sapiens (UG)
JN181782 T. suis; pig (UG)
JN181792 T. suis; pig (UG)
JN181816 T. trichiura; Homo sapiens (UG)
JN181804 T. suis; pig (TAN)
MN447323 Trichuris sp.; Trachypithecus francoisi
KT186232 Trichuris sp.; Trachypithecus francoisi (CH)
KT186234 Trichuris sp.; Trachypithecus francoisi (CH)
KT186233 Trichuris sp.; Trachypithecus francoisi (CH)
KT186231 Trichuris sp.; Trachypithecus francoisi (CH)
KT344829* Trichuris sp.; Macaca mulatta (CH)
KP336463* Trichuris sp.; Macaca fuscata (IT)
KP336471* Trichuris sp.; Macaca fuscata (IT)
KP336464* Trichuris sp.; Macaca fuscata (IT, JAP)
KP336468* Trichuris sp.; Macaca fuscata (IT)
KP336467 Trichuris sp.; Macaca fuscata (IT)
KP336475 Trichuris sp.; Macaca fuscata (IT)
KP336477 Trichuris sp.; Macaca fuscata (IT)
KP336476 Trichuris sp.; Macaca fuscata (IT)
KP336474* Trichuris sp.; Macaca fuscata (IT)
KT344832* Trichuris sp.; Rhinopithecus bieti (CH)
JF690947 Trichuris sp.; Nomascus gabriellae (SK)
JF690943 Trichuris sp.; Theropithecus gelada (CZ)
MN447326 Trichuris sp.; Macaca mulata
KX961644 Trichuris sp.; Chlorocebus aethiops sabaeus (StK)
JN181828 T. trichiura; Homo sapiens (UG)
JN181842* T. trichiura; Homo sapiens (UG)
MH390364* Trichuris sp.; Macaca leonina (CH)
JF690940 Trichuris sp.; Homo sapiens (CZ)
JN181854* T. trichiura; Homo sapiens (UG)
JN181856 T. trichiura; Homo sapiens (UG)
JN181855 T. trichiura; Homo sapiens (UG)
JF690946 Trichuris sp.; Macaca fascicularis (CZ)
JN181836 T. trichiura; Homo sapiens (UG)
JN181839 T. trichiura; Homo sapiens (UG)
JF690942 Trichuris sp.; Papio anubis (CZ)
KF410638 Trichuris sp.; Papio hamadryas anubis (USA)
AM992986* T. trichiura (CH)
KT344825 Trichuris sp.; Rhinopithecus roxellana (CH)
AM992991 T. trichiura (CH)
JN181848 T. trichiura; Homo sapiens (UG)
JN181859* T. trichiura; Homo sapiens (UG)
MN447328 Trichuris sp.; Papio anubis
JN181845 T. trichiura; Homo sapiens (UG)
JN181843 T. trichiura; Homo sapiens (UG)
JN181860 T. trichiura; Homo sapiens (UG)
JN181838 T. trichiura; Homo sapiens (UG)
JN181846 T. trichiura; Homo sapiens (UG)
KX961643 Trichuris sp.; Chlorocebus aethiops sabaeus (StK)
AM992987* T. trichiura (CH)
AM992996 T. trichiura (CH)
AM992998 T. trichiura (CH)
GQ301553* Trichuris sp.; Papio hamadryas ursinus (SAR)
GQ301551 Trichuris sp.; Papio hamadryas ursinus (SAR)
AM992997 T. trichiura (CH)
KC877992 T. trichiura; Papio hamadryas (TU)
JN181820 T. trichiura; Homo sapiens (JAM)
JN181831 T. trichiura; Homo sapiens (UG)
JN181832 T. trichiura; Homo sapiens (UG)
JN181851 T. trichiura; Homo sapiens (UG)
JN181847 T. trichiura; Homo sapiens (UG)
JN181825 T. trichiura; Homo sapiens (UG)
JF690948 Trichuris sp.; Pan troglodytes (NL)
KX961651 Trichuris sp.; Chlorocebus aethiops sabaeus (StK)
KF410637* Trichuris sp.; Papio hamadryas anubis (USA)
JF690941* Trichuris sp.; Papio hamadryas (CZ) & CAeS (StK), CerAsc (TAN), HS (UG)
KT344827* Trichuris sp.; Chlorocebus aethiops (CH)
KX961648 Trichuris sp.; Chlorocebus aethiops sabaeus (StK)
KX961645 Trichuris sp.; Chlorocebus aethiops sabaeus (StK)
KT344831* Trichuris sp.; Papio hamadryas (CH) & NL (CH)
JN181858 T. trichiura; Homo sapiens (UG)
AM992982* T. trichiura (CH)
JN181840 T. trichiura; Homo sapiens (UG)
AM992995* T. trichiura (CH)
AM992993 T. trichiura (CH)
AM992994 T. trichiura (CH)
JN181837 T. trichiura; Homo sapiens (UG)
JF690949 Trichuris sp.; Chlorocebus aethiops (TAN)
KJ588133* Trichuris sp.; Homo sapiens (UG) & Macaca mulatta
JN181834 T. trichiura; Homo sapiens (UG)
AM992992 T. trichiura (CH)
KX961652 Trichuris sp.; Chlorocebus aethiops sabaeus (StK)
KX961647 Trichuris sp.; Chlorocebus aethiops sabaeus (StK)
51.9/92
98.9/100
100/100
-/60
98.8/99
100/100
93.4/98
100/100
95.3/98
91.9/-
0.2
86.5/-
99.8/94
71.4/82
75.2/96
97.8/100
80.6/83
95.6/99
-/87
91.7/94
80.8/98
93.6/99
Abbreviations
CAe - Chlorocebus aethiops
CAeS - Chlorocebus aethiops sabaeus
CerAsc - Cercopithecus ascanius
CerLho - Cercopithecus lhoesti
CerMon - Cercopithecus mona
ColGue - Colobus guereza
ColGueK - Colobus guereza kikuyuensis
HS - Homo sapiens
LopAlb - Lophocebus albigena
MacSil - Macaca silenius
NomGab - Nomascus gabriellae
PapAnu - Papio anubis
CAM - Cameroon
CH - China
CZ - Czech Republic
ESP - Spain
IT - Italy
JAM - Jamaica
JAP - Japan
KEN - Kenya
NL - Netherlands
SAR - South African Republic
SK - Slovakia
StK - St. Kitts
TAN - Tanzania
TU - Turkey
UG - Uganda
USA - United States of America

Parasites & Vectors

RESEARCH Open Access

Detection of DNA of filariae closely related to *Mansonella perstans* in faecal samples from wild non-human primates from Cameroon and Gabon

Colette Marie Gaillard[1], Sebastien David Pion[1], Hadjira Hamou[1], Constant Sirima[1], Charlotte Bizet[1], Thomas Lemarcis[1], Jules Rodrigues[2], Amandine Esteban[1], Martine Peeters[1], Eitel Mpoudi Ngole[3], Illich Mombo[4], Florian Liégeois[5], Coralie Martin[2], Michel Boussinesq[1] and Sabrina Locatelli[1*]

Abstract

Background: The Onchocercidae is a family of filarial nematodes with several species of medical or veterinary importance. Microfilariae are found in the blood and/or the dermis and are usually diagnosed in humans by microscopy examination of a blood sample or skin biopsy. The main objectives of this study were to evaluate whether filariae DNA can be detected in faecal samples of wild non-human primates (NHPs), whether the detected parasites were closely related to those infecting humans and whether filarial DNA detection in faeces is associated with co-infections with nematodes (*Oesophagostumum* sp. and *Necator* sp.) known to cause blood loss while feeding on the host intestinal mucosa.

Methods: A total of 315 faecal samples from 6 species of NHPs from Cameroon and Gabon were analysed. PCRs targeted DNA fragments of *cox*1 and *12S* rDNA genes, to detect the presence of filariae, and the internal transcribed spacer 2 (ITS2), to detect the presence of *Oesophagostomum* sp. and *Necator* sp. infections.

Results: Among the 315 samples analysed, 121 produced sequences with > 90% homology with Onchocercidae reference sequences. However, 63% of the *12S* rDNA and 78% of the *cox*1 gene sequences were exploitable for phylogenetic analyses and the amplification of the *12S* rDNA gene showed less discriminating power than the amplification of the *cox*1 fragment. Phylogenetic analyses showed that the *cox*1 sequences obtained from five chimpanzee DNA faecal samples from Gabon and two from Cameroon cluster together with *Mansonella perstans* with high bootstrap support. Most of the remaining sequences clustered together within the genus *Mansonella*, but the species could not be resolved. Among the NHP species investigated, a significant association between filarial DNA detection and *Oesophagostomum* sp. and *Necator* sp. infection was observed only in gorillas.

Conclusions: To our knowledge, this is the first study reporting DNA from *Mansonella* spp. in faecal samples. Our results raise questions about the diversity and abundance of these parasites in wildlife, their role as sylvatic reservoirs and their potential for zoonotic transmission. Future studies should focus on detecting variants circulating in both human and NHPs, and improve the molecular information to resolve or support taxonomy classification based on morphological descriptions.

Keywords: *Mansonella* spp., Anthropoids, Phylogeny, Africa, Faeces, Gastro-intestinal worms, Zoonosis

*Correspondence: sabrina.locatelli@ird.fr
[1] IRD UMI 233-INSERM U1175, University of Montpellier, Montpellier, France
Full list of author information is available at the end of the article

© The Author(s) 2020. This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Background

Onchocercidae nematodes form a family of parasitic worms comprising eight subfamilies and 88 genera [1, 2]. Species belonging to genera such as *Loa*, *Onchocerca*, *Wuchereria*, *Brugia* and *Mansonella* are responsible for human or animal diseases such as loiasis, onchocerciasis or lymphatic filariasis. Some of these species are found in both humans and non-human primates (NHPs) [2]. The diagnosis of filariasis is typically based on the detection of the adult stage of the parasite or, more often, of the larval stages produced by adult female worms, called microfilariae (mf). Several diagnostic methods are available to detect these parasites in humans. If one considers the main species parasitizing humans, mf are detected by light microscopy examination of a blood sample (*Loa loa*, *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* and *Mansonella perstans*), or of a skin biopsy (*Onchocerca volvulus* and *M. streptocerca*), or both (*M. ozzardi*) [3]. In addition to blood and dermis, mf can sometimes be found in the urine. Besides the microscopical identification of the parasites, various other techniques detecting antigens, antibodies or parasitic DNA are also available and used either for the individual diagnosis or to assess the infection endemicity levels in communities.

Molecular diagnostic methods, based on the amplification of parasite DNA by polymerase chain reaction (PCR) methods [4], or by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) [5–7] have the advantages of being more sensitive in detecting parasites than the usual microscopy methods, especially in case of low mf densities, as well as increased certainty in the identification to the species or even strain level [2, 8].

In the early 2010s, it was observed that *Plasmodium* DNA could be found in NHP faeces [9], despite the fact that these are blood-borne parasites. Similar results reporting detectable amounts of *P. falciparum* DNA in the faeces of infected humans have been recently reported [10, 11]. However, the mechanisms underlying how *Plasmodium* DNA ends up in the faeces remain unclear. These observations led us to the question of whether PCR techniques could also effectively detect filarial DNA in faecal samples.

The first goal of this study was to investigate the possibility to find filarial infections from DNA extracted from faecal samples of six species of NHPs living in forest regions of Cameroon and Gabon: the gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*), the chimpanzee (*Pan troglodyte troglodytes*), the mandrill (*Mandrillus sphinx*), the collared mangabey (*Cercocebus torquatus torquatus*, also known as red-capped mangabey), the agile mangabey (*Cercocebus agilis*) and the greater spot-nosed monkey (*Cercopithecus nictitans*). Secondly, we performed phylogenetic analysis of the filarial DNA fragments found in the faeces of these NHPs, as well as filarial DNA fragments identified in humans to characterise and compare the species. For these purposes, PCRs were carried out by targeting DNA fragments of mitochondrial (*12S* ribosomal DNA and cytochrome *c* oxidase subunit 1 (*cox*1) genes, followed by Sanger sequencing to discriminate parasite species. Lastly, and consequent to the successful amplification of filarial mitochondrial DNA in faeces, we investigated whether DNA presence was associated with co-infections with strongylid nematodes including hookworms [12, 13]. These parasites can cause significant blood loss when adults attach themselves to the intestinal mucosa and while feeding [14]. Despite the absence of impact of strongylid infections on the detection of *Plasmodium* spp. in faeces of western lowland gorillas and eastern chimpanzees [15], their presence and resulting bleeding in the intestine would be a plausible explanation for the detection of filarial DNA in faeces. Therefore, we ran nested PCRs targeting the internal transcribed spacer 2 (ITS2) to look for the presence of infections with *Oesophagostomum* sp. and *Necator* sp. to infer whether there was a positive association between these parasites and the detection of filarial DNA in faeces.

Methods

Study sites and faecal collection methods

A total of 315 faecal samples from wild-living, non-habituated NHPs were analysed. These samples were collected non-invasively around NHP nests, feeding places, or on traces at four study sites: the forests surrounding the villages of Djoum (DJ) (2° 40′ 00″ N, 12° 40′ 00″ E), Mambélé-Lobeké National Park (MB/LB) (2° 25′ 00″ N, 15° 24′ 00″ E) and Somalomo (SL) (3° 23′ 00″ N, 12° 44′ 00″ E) in Cameroon (collections between 2008 and 2010), and in remote primary forests and secondary forests surrounding the village of Matakamangoye II (0° 6′ 30″ S, 13° 41′ 57″ E, Gabon (collections between 2009 and 2013) (Fig. 1). These samples were characterized and analysed in previous studies to determine the prevalence and genetic diversity of simian immunodeficiency viruses (SIV) [16, 17]. Faecal samples were identified to be of likely chimpanzee, gorilla or Cercopithecidae monkey origin by experienced trackers and/or by the researchers. A 15–20 g sample was then placed into a 50 ml tube and mixed with an equal amount of RNAlater® (Ambion, Austin, TX, USA). The date, time, and location (longitude and latitude provided by global positioning system, GPS) of sample collection were recorded along with the collector's name. Faecal samples were generally kept at ambient temperature for no longer than 2 weeks and subsequently stored at − 20 °C once back in Yaoundé, Cameroon, or Franceville, Gabon. Samples were

shipped to Montpellier, France, at ambient temperature, and then stored at −80 °C upon reception. All samples were transported to France in full compliance with export and import regulations.

DNA extraction from NHP faecal samples

Faecal DNA was extracted using the QIAamp Stool DNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) following the manufacturer's instructions. Briefly, 1.5 ml of faecal RNAlater® mixture was re-suspended in stool lysis buffer and clarified by centrifugation. The supernatants were treated with an InhibitEx tablet, subjected to proteinase K digestion, and passed through a DNA binding column. Bound DNA was eluted in 100 µl elution buffer. To investigate the presence of gastro-intestinal parasites, a modified DNA extraction protocol was adopted, after the clarification. This step consisted of an additional homogenization in tubes containing silica beads of different size (lysis matrix E) in a FastPrep-24 mill (MP Biomedical, Eschwege, Germany) and an overnight incubation at 56 °C to better expose the parasite DNA in eggs.

Host species confirmation and identification of individual genotypes by microsatellite analyses

Each NHP species and the number of individual faecal samples collected were determined in previous studies, as mentioned before. DNA was extracted from all faecal samples collected in the field and host species were confirmed by PCR amplification and sequence analysis of a 460–500-bp mitochondrial DNA fragment spanning the *12S* rDNA region, using methods described in previous studies [18]. To determine the number of individuals sampled, the faeces collected from gorillas and chimpanzees were subjected to microsatellite analyses, as previously described [17, 19, 20]. Samples were genotyped at seven loci in two multiplex PCRs (amplifying D18s536, D4s243, D10s676, and D9s922 or D2s1326, D2s1333 and D4s1627), and for sex determination, a region of the amelogenin gene that contains a deletion in the X but not the Y chromosome was amplified using a *Taq* DNA polymerase core kit (MP Biomedical, Irvine, CA, USA) with 2 to 10 µl fecal DNA. Mandrills, collared and agile mangabeys and greater spot-nosed monkeys were subjected to mtDNA analyses but not to microsatellite analyses; to ascertain that we were not going to analyze more than one sample belonging to the same individual, we selected the samples among a wide range of samples previously collected and we applied discriminative criteria choices, such as exclusion of primates' territory ranges overlap and GPS coordinates of the collection locations.

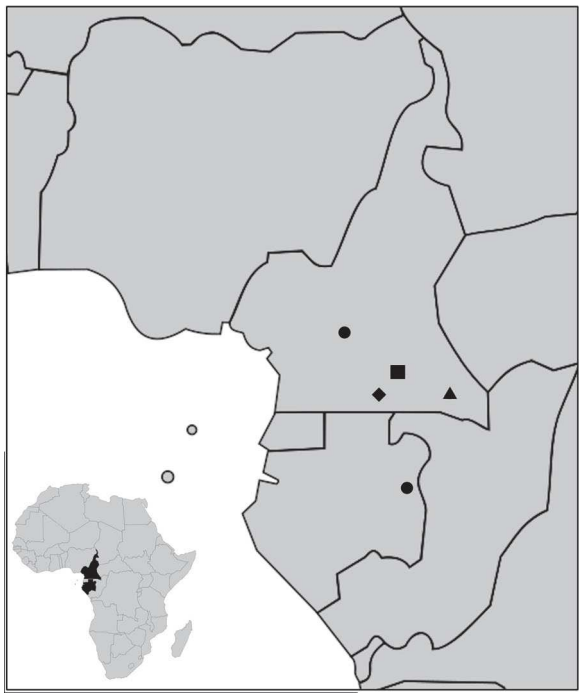


Fig. 1 Faecal samples collection sites in Cameroon and in Gabon. In Cameroon: Okola (dot), Djoum (diamond), Somalomo (square), Mambelé/Lobeké National Park (triangle); in Gabon: Matakamangoye (dot)

DNA extraction from human dried blood spots (DBS)

DBS collected from 20 human subjects with known *M. perstans* infection and living in the Okola health district (Cameroon) were shipped to Montpellier to be used as references for phylogenetic analyses [3]. DNA extraction from DBS was performed using the NucliSENS® kit (bioMérieux, Craponne, France) according to the manufacturer's instructions, as previously described [21]. DNA was eluted in 60 µl buffer. The PCR reactions on the *M. perstans* mf-positive human blood samples were carried on once all other samples had been tested.

PCR screening of filarial nematodes

A DNA barcoding approach based on either the *cox*1 marker or the *12S* rDNA marker was used to discriminate between filaroid species [2, 8, 22–24]. PCR screening of filarial DNA was based on partial sequences of two mitochondrial genes: *12S* rDNA (approximately 450 bp) and cytochrome *c* oxidase subunit 1 (*cox*1) (*c.*600 bp). Amplification of the *12S* rDNA and *cox*1 fragments was conducted according to Casiraghi et al. [25]. Primers and PCR programmes are shown in Table 1. PCRs were processed in a final volume of 50 µl. The amplification of the target fragments was carried out by nested PCR. Bovine serum albumin (BSA) was added at the

final concentration of 0.2 µg/ml to improve amplification success. All PCR reactions were performed using the Expand Long Template PCR system (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA), according to the manufacturer's instructions. Each PCR reaction was carried out on a Bio-Rad T100™ thermal cycler (Hercules, CA, USA) in the presence of a negative control. NHP samples were tested first in a human filaria-free environment. Once all NHP samples were tested, we proceeded with the *M. perstans* mf-positive human blood samples. Amplified fragments were visualized by horizontal electrophoresis on 1% agarose under a UV light. The PCR products of interest were subsequently purified and extracted using the GeneClean® Turbo Kit (Qbiogene Inc., Carslbad, CA, USA). Sequencing reactions were performed with the ABI PRISM® BigDye™ Terminators Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). DNA was then precipitated and sequenced according to the Sanger method (3500 Genetic Analyzer; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

PCR screening of *Oesophagostomum* sp. and *Necator* sp

We ran a semi-nested PCR targeting fragments of the ITS2 maker to determine the presence of *Oesophagostomum* sp. and *Necator* sp. The external PCR was performed using primers NC1 and NC2. Subsequently, a semi-nested internal PCR generating 260 to 350 bp amplicons was performed with primers NC2 and OesophITS2-21 [26–28]. Primers and PCR programs are shown in Table 1. The PCR reaction was performed in a 50 µl reaction volume containing 10 µl and 5 µl of template DNA for primary and semi-nested PCR, respectively, 10 pM of each primer, 25 µl HotStarTaq Master Mix (Qiagen, Courtaboeuf, France), providing a final concentration of 1.5 mM $MgCl_2$ and 200 µM of each dNTP. For the external PCR, bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was added at the final concentration of 0.2 µg/ml to improve amplification success. The reactions were performed on a Bio-Rad T100™ thermal cycler (Bio-Rad). Primer details and PCR conditions are listed in Additional file 1: Table S1. The amplicons were electrophoresed on 1% agarose gels stained with ethidium bromide. After purification (on a 2% agarose gel) using the GeneClean® Turbo Kit (Qbiogene), the PCR products were sequenced with the primers of the second step on an automated sequencer (3500 Genetic Analyzer; Applied Biosystems) and the resulting sequences analysed with SeqMan DNASTAR software (Lasergene; DNASTAR, Inc., Madison, WI, USA).

Molecular identification and phylogenetic analysis

The sequences obtained were assembled, aligned and corrected manually using the SeqMan DNASTAR software (Lasergene, DNASTAR Inc., Madison, WI) and then compared against reference sequences deposited in GenBank using the Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn) [29]. Sequences generated during the current study and previously published sequences from draft or complete genomes were aligned using MUSCLE 16 in MEGA 6.06, with minor

Table 1 Primers and PCR programs

Target organism	Gene	Primer name	Sequence (5′–3′)	Product size (bp)	Thermal profile*						
					Step 1		Step 2		Step3		N
					T	D	T	D	T	D	
Filariae	*12S* rDNA	12SdegF2/	ATTACYTATTYTTAGTTTA	~600	94	30	45	30	68	45	45[b]
		12SnemR2[a]	CTACCATACTACAACTTACGC								
		12SF/	GTTCCAGAATAATCGGCTA	~450	94	30	54	30	68	30	35
		12SdegR	ATTGACGGATGRTTTGTACC								
	*cox*1	FCo1extdF1	TATAATTCTGTTYTDACTA	~970	94	30	45	30	68	60	45[b]
		FCo1extdR1[a]	ATGAAAATGAGCYACWACATAA								
		COlintF/	TGATTGGTGGTTTTGGTAA	~650	94	30	54	30	68	45	35
		COlintR	ATAAGTACGAGTATCAATATC								
Hook/ Nodular worms	ITS2	NC1	ACGTCTGGTTCAGGGTTGTT	~900	94	30	50	30	72	45	45
		NC2	TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT								
		OesophITS2	TGTRACACTGTTTGTCGAAC	250–300	94	30	55	30	72	30	35
		NC2	TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT								

[a] ITS2 PCRs start with 95 °C for 15 min and finish by 72 °C for 10 min; *12S* rDNA and *cox*1 PCRs start with 94 °C for 3 min and finish with 68 °C for 10 min

[b] 35× for DBS and 45× for stool samples

Abbreviations: Step 1, denaturation; Step 2, annealing; Step 3, elongation; T, temperature (°C); D, duration (s); N, number of cycles

manual corrections [30]. Maximum Likelihood (ML) was used to infer *cox*1 and *12S* rDNA phylogenetic trees, and were executed with 1000 bootstrap replicates in MEGA 6.06. A partitioned model was implemented to estimate evolution parameters separately for each gene. Using the corrected version of the Akaike information criterion (AIC), JModelTest analysis [31] was performed to establish the evolutionary model best adapted to the sequences alignment for each individual gene and for the concatenation of the two genes. The general time-reversible plus invariant sites plus gamma distributed model (GTR+I+Γ) offered the best fit for *cox*1 and *12S* rRNA. To root the trees, *Filaria latala* (Spirurida: Filariidae) was included as the outgroup. Molecular species delimitation was evaluated using distance-based methods. Between-groups mean distance was calculated using MEGA 6.06.

Statistical analysis

A two-tailed Fisher's exact test was used to test for deviations from the null hypothesis, which assumed that there was no association between infection with intestinal parasites and detection of filarial DNA. The tests were applied to each of the different species of NHP separately, as well as to the pooled data across all NHP species.

Results

PCR-positive results and filariae homology in *cox*1 and *12S* rDNA fragments from six species of non-human primates

The 315 samples of NHP faeces included 65 samples from gorillas, 12 from mandrills, 222 from chimpanzees, 9 from red-capped mangabeys, 3 from agile mangabeys and 4 from greater spot-nosed monkeys. PCRs targeting the *12S* rDNA and *cox*1 mitochondrial genes of filariae were run for all samples selected. *12S* rDNA and *cox*1 sequences were also obtained from 20 human patients and 7 of them were added for comparisons to the phylogenetic trees. Among the 315 samples analysed, 121 were positive by PCR (38%): 31 samples were positive for *12S* rDNA only, 59 samples were positive for *cox*1 only, and 31 for both gene fragments (Table 2). The sequences obtained showed > 90% homology with reference filarial sequences available on GenBank (BLASTn). For the gorillas, sequences from 30 out of 65 samples (46%), for the mandrills, 2 sequences out of 12 (17%), for the chimpanzees 85 out of 222 (38%), for the *Cercocebus* only 1 (agile mangabey) out of 12 (8%), and for the greater spot-nosed monkeys 3 out of 4 (75%) showed high similarities (> 90% homology) within the family Onchocercidae.

Phylogenetic analyses of *cox*1 and *12S* rDNA gene fragments

Among these 121 samples, 39 out of 62 sequences were exploitable for phylogenetic analyses for the *12S* rDNA gene (corresponding to 63% of the sequences obtained) and 70 out of 90 for the *cox*1 gene (corresponding to 78% of the sequences obtained) (Table 3). The remaining sequences were not included in the alignments because they were of low quality (less than 250 bp) or displayed background noise with too many unresolved degenerated nucleotides.

Phylogenetic analyses of the 70 *cox*1 gene fragments depicted a tree composed of 5 monophyletic groups (Fig. 2). At the bottom (group 5), a group of three gorilla samples clustered together with *Protospirura muricula* (Nematoda: Spiruridae, a parasite of murid rodents) and 3 other samples from *Cercopithecus nictitans* branched out of the same node. The group just above, represented exclusively by chimpanzee faecal samples from Gabon (group 4) was not very highly supported, its robustness being < 70. Therefore, it remains difficult to associate these sequences to a given species. Then, three groups (1, 2 and 3) clustered together within the genus *Mansonella* with a bootstrap support > 70%. They all belong to the clade ONC5 as described in Lefoulon et al. [2] (Additional file 2: Figure S1). Parasite sequences from five chimpanzees from Matakamangoye (Gabon) and two chimpanzees from Somalomo (Cameroon) grouped together with *M. perstans* infecting humans from the Okola region (Cameroon) and with two *M. perstans* reference sequences infecting humans, retrieved from the GenBank (group 2). Sample homology was > 98%. Groups 1 and 3 were composed of nematodes of the genus *Mansonella* infecting gorillas, chimpanzees and mangabeys from different regions (Matakamangoye-Gabon, Somalomo and Mambele/Lobeke National Park-Cameroon), indicating the absence of phylogeographic clusters. In *cox*1, group 1 and group 2 sequences were genetically relatively closer than groups 2 and 3, with a mean interspecific divergence of 4.2%, and 6.8% respectively. Identification of filarial species using *cox*1 as a molecular marker was accurate, as previously indicated for other filarial species [2, 8, 22]. The *cox*1 divergence threshold value to discriminate between onchocercid species was previously established at 4.8% [22]. However, depending on the dataset and the number of analysed sequences, intraspecific distances between most of the studied onchocercid species were lower than 2% and interspecific distances were higher than 4.5%.

Phylogenetic analyses of the *12S* rDNA gene fragment showed less discriminating power compared to the analyses of the *cox*1 fragment and fewer sequences were available for analysis (Fig. 3, Table 3) as observed for the analysis

Table 2 PCR and BLASTn summary results according to NHP species and location

Country	Locality	Host species	*n*	Positive *12S* rDNA	Positive *cox*1	Positive *12S* rDNA and *cox*1	Positive individuals
Cameroon	Djoum	Chimpanzee	0	0	0	0	0
		Gorilla	0	0	0	0	0
		Mandrill	12	2	0	0	2
		Red-capped Mangabey	7	0	0	0	0
		Greater spot-nosed monkey	1	0	0	0	0
	Somalomo	Chimpanzee	23	4	9	2	11
		Gorilla	38	12	13	7	18
		Mandrill	0	0	0	0	0
		Red-capped Mangabey	2	0	0	0	0
		Greater spot-nosed monkey	2	0	2	0	2
	Mambelé/ Lobeke NP	Chimpanzee	59	26	20	15	31
		Gorilla	27	4	8	0	12
		Mandrill	0	0	0	0	0
		Agile Mangabey	3	1	1	1	1
		Greater spot-nosed monkey	1	1	1	1	1
Gabon	Matakamangoye	Chimpanzee	140	12	36	5	43
Total			315	62	90	31	121

Abbreviation: n, individuals tested

of the genus *Onchocerca* [8], therefore precise species identification remains unresolved. However, 6 samples (CAM_5149, CAM_9803, CAM_9838, CAM_5158, CAM_5160 and CAM_4874) within group 1 in the *cox*1 phylogenetic tree, have been successfully amplified for the *12S* rDNA fragment. Five out of these 6 samples amplified in both genes, clustered together with *M. perstans* samples infecting humans, although with a less robust bootstrap support; only sample CAM_9838, from a gorilla, branched outside this *M. perstans* group in the *12S* phylogenetic tree. Finally, 2 samples from Djoum in Cameroon (CAM_3337 from a mandrill and CAM_3338 from

Table 3 Summary results of positive individuals in phylogenetic trees according to NHP species and location

Country	Locality	Host species	*n*	*12S* rDNA phylogeny	*cox*1 phylogeny	*12S* rDNA and *cox*1 phylogeny	Positive individuals
Cameroon	Djoum	Chimpanzee	0	0	0	0	0
		Gorilla	0	0	0	0	0
		Mandrill	12	1	0	0	1
		Red-capped Mangabey	7	1	0	0	1
		Greater spot-nosed monkey	1	0	0	0	0
	Somalomo	Chimpanzee	23	4	7	1	10
		Gorilla	38	11	15	2	24
		Mandrill	0	0	0	0	0
		Red-capped Mangabey	2	0	0	0	0
		Greater spot-nosed monkey	2	0	2	0	2
	Mambelé/Lobeke NP	Chimpanzee	59	11	14	2	23
		Gorilla	27	1	9	0	10
		Mandrill	0	0	0	0	0
		Agile Mangabey	3	1	1	1	1
		Greater spot-nosed monkey	1	0	1	0	1
Gabon	Matakamangoye	Chimpanzee	140	9	21	0	30
Total			315	39	70	6	103

Abbreviation: n, individuals tested

a mangabey) branched together but outside of the known filariae and *Protospirura muricola* DNA references.

Filarial DNA detection in faeces and co-infections with gastro-intestinal nematodes

Regarding the intestinal nematodes, 106 of the 121 NHPs found to be positive for filariae (87.6%) were also infected either with *Oesophagostomum* sp., or *Necator* sp., or both. In contrast, among the 194 samples in which we could not detect any filariae signals, 151 (77.8%) were infected with *Oesophagostomum* sp., or *Necator* sp. or both. There was no statistically significant association between the presence of infection with these intestinal nematodes and detection of filarial DNA when all NHP species were analysed together or when *Cercopithecus* sp. and *Cercocebus* sp. monkeys, mandrills or chimpanzees were analysed separately. However, for the gorillas, we detected significantly more filarial infections when the animals were also infected with gastro-intestinal worms (two-tailed probability = 0.0125; Tables 2, 4, 5).

Discussion

To the best of our knowledge, this is the first study showing that filarial DNA can be detected in the faeces of NHPs using a molecular approach. Among the 315 samples analysed, 121 (38.4%) showed >90% homology with Onchocercidae reference sequences. The true infection rates are likely to be even higher, because filariae detection in faecal samples is probably less sensitive than detection in blood. Phylogenetic analyses on *cox*1 sequences obtained from five chimpanzee DNA faecal samples from Gabon and two from Cameroon show that these samples cluster together with *Mansonella perstans* with high bootstrap support. Most of the remaining sequences clustered together within the genus *Mansonella*, but the species could not be resolved. It has to be noted that most of the studies on filariae infecting NHPs are limited to morphological descriptions and taxonomic analyses at the molecular level are lacking. In wild-living NHPs, adult filariae have been recovered after extraction from lymphatic vessels during necropsies, but these findings remain rare [32]. Because of their localization in host tissues, *Mansonella* adult stages are difficult to collect and the diversity of this genus is far from being well investigated in animals. Up to now, seven species of *Mansonella* (*M. perstans*, *M. streptocerca*, *M. leopoldi*, *M. lopeensis*, *M. rodhaini*, *M. gorillae* and *M. vanhoofi*) have been described in anthropoids and humans from Africa, based on morphological characteristics only. They all belong to the subgenus *Esslingeria* [1]. Given the difficulty to recover adult filariae in NHPs, indirect approaches targeting microfilarial DNA could be helpful for their identification [33, 34]. In this study, *cox*1 phylogenetic analyses were more informative than *12S* rDNA, with sequence fragments of 480 and 280 bp, respectively. In this study, we found seven chimpanzee faecal samples infected with *M. perstans*, a filaria found in humans, while 29 samples of chimpanzees and 21 of gorillas were infected with a *Mansonella* sp. forming a separate cluster in the *cox*1 phylogenetic tree. Using also a DNA barcoding approach based on the ITS marker, a putative new *Mansonella* species/subspecies was detected exclusively in febrile children from Gabon [35]. However, by adopting a Sanger sequencing approach, the identification of co-infections with different *Mansonella* species cannot be resolved in a given individual. In a past morphological study, four *Mansonella* species were identified in a single male western lowland gorilla (*G. gorilla gorilla*) found dead in the Lopé Reserve, Gabon [32]. In this animal, female worms of two species of *Mansonella* (*M. lopeensis* and *Mansonella* sp.) were recovered from the deep tissues of the wounded thigh, a single *M. leopoldi* mf was found in the blood vessels of the liver, and a male of *Mansonella* sp. was situated in an afferent lymphatic vessel of an axillary lymph node. Future efforts using next-generation sequencing (NGS) could lower the threshold of detection and improve the sensitivity for detecting low-frequency variants. To date, 14 filarial genomes have been assembled by an NGS approach. A phylogenetic analysis of 41 nematode genomes has been performed, with a consensus tree including 11 out of 14 filarial assemblies. However, no *Mansonella* sp. assemblies are available yet [36]. Phylogenetic trees have also been constructed from filarial parasite mitogenome sequences [37, 38], comforting the clades described by Lefoulon et al. [2] and the presence of *Mansonella* sp. in ONC5. The NGS method would also be more suitable to discriminate between a possible multitude of *Mansonella* spp. parasites and mixed infections with multiple filarial species. Deep sequence analysis represents a potential tool to detect occult infections, as reported in a study where samples classified by traditional methods as *M. perstans* mono-infections were found, through rtPCR and deep sequencing, to also have occult *M. ozzardi* infections [38].

Mansonella perstans adult filariae are mainly found in in the serous cavities, the visceral adipose tissue or the subcutaneous tissue. However, the microfilariae thrive in the blood and the lymphatic system [39], therefore their detection (or the detection of filarial DNA fragments) in faecal samples, seems surprising. However, a few reports have shown that the adult parasites are usually found in the mesenteries and connective tissues of abdominal organs of humans, gorillas

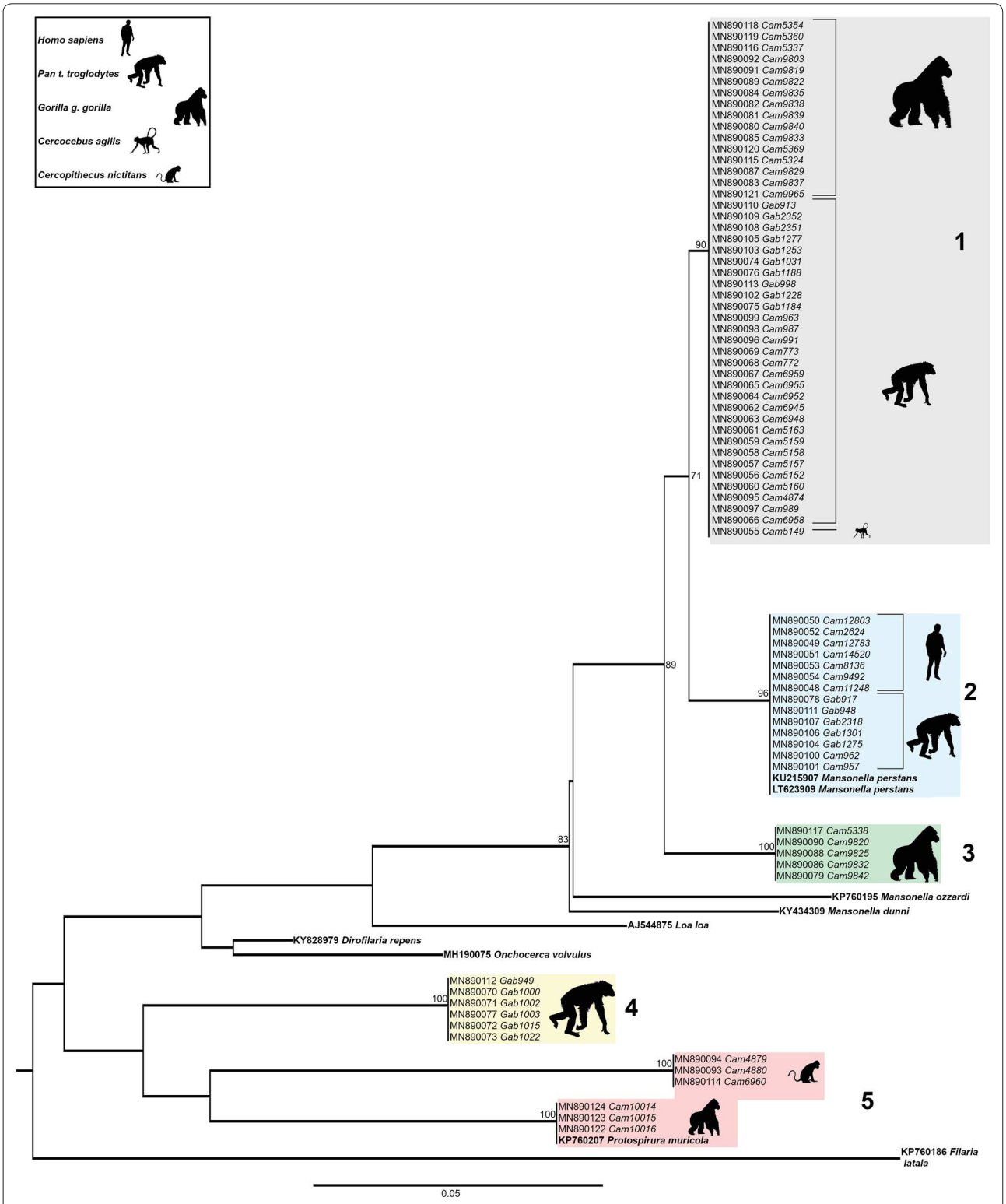


Fig. 2 Phylogenetic tree based on cytochrome *c* oxidase subunit 1 (*cox*1) gene sequences from 85 onchocercid specimens. The total length of the alignment is 474 bp. *Filaria latala* was included as the outgroup. The topology was inferred using Maximum Likelihood. Nodes are associated with bootstrap values based on 1000 replicates. Bootstrap support values < 70 are not shown. The scale-bar indicates the number of nucleotide substitutions. Reference specimens are in bold

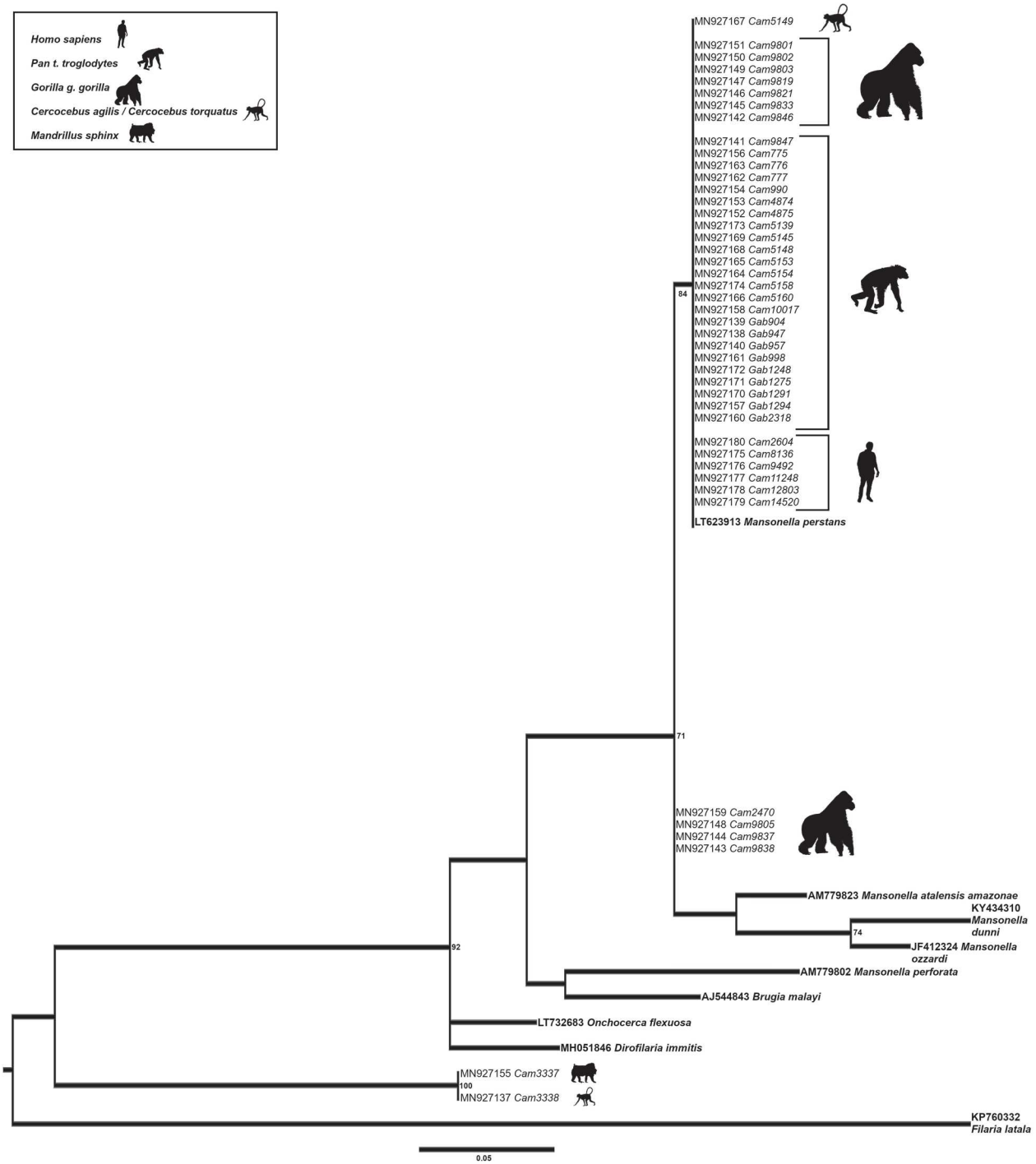


Fig. 3 Phylogenetic tree based on *12S* rDNA gene sequences from 52 onchocercid specimens. The total length of the alignment is 266 bp. *Filaria latala* was included as the outgroup. The topology was inferred using Maximum Likelihood. Nodes are associated with bootstrap values based on 1000 replicates. Bootstrap support values < 70 are not shown. The scale-bar indicates the number of nucleotide substitutions. Reference specimens are in bold

Table 4 Association between filariae detection (*12S* rDNA and *cox*1) and gastro-intestinal worm infection (ITS2)

NHP species	No. of samples tested	*12S*/*cox*1 pos/ITS2neg	*12S*/*cox*1 pos/ITS2pos	*12S*/*cox*1 neg/ITS2neg	12S/*cox*1 neg/ITS2pos
Cercopithecus nictitans	4	0	3	1	0
Cercobebus torquatus/agilis	12	0	1	5	6
Pan troglodytes	222	15	70	26	111
Gorilla gorilla	65	0	30	7	28
Mandrillus sphinx	12	0	2	4	6
Total	315	15	106	43	151

Abbreviations: neg, negative; pos, positive

and chimpanzees [34, 40–43]. In the present study, the detection of parasite DNA in the faecal samples seem not to be associated with the presence of gastrointestinal worms such as *Oesophagostomum* sp. or *Necator* sp., except possibly in the gorilla population analysed. The magnitude of *Necator* sp.-associated pathogenesis and blood loss is highly dependent on the number of adult worms, host immunity and concurrent infections with other nematodes [44]. To properly estimate infection intensity with a particular gastro-intestinal parasite species, invasive collection of adult parasites from the intestines of infected hosts is required, which is indeed impossible in wild endangered animals like apes, with exception of necropsies. Regarding the presence of *Oesophagostomum*, these infections are usually not associated with intestinal bleeding, although a study reports rectal bleeding due to *Oesophagostomum brumpti* in a human individual [45] and another study reported intestinal perforation in severe cases of oesophagostomiasis in gorillas [46]. In general, data about clinical manifestations and pathogenesis of any strongylid infections in wild NHPs are scarce [47]. Therefore, it remains difficult to draw any conclusion about the association of gastrointestinal worms and the detection of filarial DNA in faeces from gorillas. Studies investigating phytochemical and mechanical properties of plants consumed by NHPs suggest the existence of abrasive properties of certain foliage [47], which could favour the bleeding of the intestine wall and the release of mf in this body compartment [48]. Lastly, we cannot exclude that the successful detection of filarial DNA in faecal samples may be explained by the presence of cell-free DNA (cfDNA). CfDNA comprises fragments of DNA found extracellularly in the blood circulation but also in different body fluids and tissues. Despite different hypotheses having been presented, the precise origin of cfDNA and how it is distributed remains unclear [49, 50].

Finally, we detected the spirurid nematode *Protospirura muricola* in faecal samples from gorillas and greater spot-nosed monkeys. Eggs and fragments of the posterior body of an adult male of *P. muricola* have been found in chimpanzees' faecal samples [51]. *Protospirura muricola* is a relatively frequent parasite of rodents in Africa and Asia [52–55]. Adults are found in the stomach of the definitive hosts [56]. Dermapterans and most probably also scarabeid beetles are intermediate hosts in the life-cycle of the nematode [57]. Therefore, we cannot exclude with certainty that these faecal samples, laying on the ground before collection, could have been contaminated by *P. muricola* infecting dung beetles or by faecal samples from rodents (the gorilla samples were collected along a road about 500 m from a small house settlement (2° 26′ 15.828″ N, 15° 26′ 19.5″ E) and the *C. nictitans* sample in a cocoa plantation near the village of Mambele (2° 23′ 54.492″ N, 15° 30′ 43.524″ E). However, this parasite has been previously described also in wild NHPs from Nigeria [53] and the Congo [58], in re-introduced chimpanzees in Tanzania [51] and in captive NHPs from south America [59, 60]. Though *P. muricola* in rodents seems to be a relatively non-pathogenic parasite, it causes severe, sometimes fatal,

Table 5 Fisher exact test contingency table and two-tailed probability

Species	A B	C D	Two-tailed probability
Cercopithecus sp./*Cercobebus* sp.	0 6	4 6	0.233
Pan troglodytes	15 26	70 111	0.860
Gorilla gorilla	0 7	30 28	0.0125
Mandrillus sphinx	0 4	2 6	0.515
TOTAL	15 43	106 151	0.036

Abbreviations: A, positive for filariae and negative for GI worms; B, negative for filariae and negative for GI worms; C, positive for filariae and positive for GI worms; D, negative for filariae and positive for GI worms

disease in captive primates. However, the pathogenicity of the nematode in wild chimpanzees or gorillas remains unknown and it has not been reported in humans.

Conclusions

To the best of our knowledge, this study shows for the first time that filarial infections can be diagnosed from DNA extracted from faecal material in several NHP species. These preliminary results open up perspectives on the detection of Onchocercidae in samples other than blood and dermal tissues. Such non-invasive sampling, combined with molecular genetic analysis, could allow for investigations of these pathogens in wild animal populations that are difficult to access. Moreover, our results raise questions about the diversity and abundance of these parasites in wildlife and their possible role as sylvatic reservoirs. Similar to other pathogens, which have crossed the species barrier, zoonotic filariae transmission seems possible and could potentially increase [61], especially considering human encroachment into previously pristine territories and the growing proximity between humans and wild animals. Future studies should focus on improving the sensitivity of the tests in both human and NHPs, and improve and extend the molecular information to resolve or support taxonomy classification based on morphological descriptions. Finally, this non-invasive approach should be further tested as a diagnostic alternative in the human population, especially in situations where people are reluctant to undergo blood analysis or where blood tests would require people to engage in long journeys from remote villages to diagnostic centres. Health operators would collect faecal samples at domicile and test a single sample for multiple infections back in a centralized laboratory.

Supplementary information

Supplementary information accompanies this paper at https://doi.org/10.1186/s13071-020-04184-1.

Additional file 1: Table S1. Accession number (GenBank) list of new filarial species sequences and reference sequences for phylogenetic analyses (*cox*1 and *12S* rDNA).

Additional file 2: Figure S1. Phylogeny of Onchocercidae based on *cox*1 sequences using Maximum Likelihood inference. The total length of the dataset is 475 bp. A total of 86 onchocercid specimens (48 sequences from this study with 38 sequences from 38 species from Lefoulon et al. [2]) were analysed. *Filaria latala* was used as the outgroup. The topology was inferred using Maximum Likelihood, under the general time reversible model, including invariant sites and gamma distribution (GTR+I+Γ). Nodes are associated with bootstrap values based on 1000 replicates. The onchocercid subfamilies are indicated by color: blue for Onchocercinae, dark green for Dirofilariinae, purple for Splendidofilariinae, yellow for Waltonellinae. Although the *cox*1 gene is not informative enough for deeper phylogenies it is for species level phylogenies and onchocercid clades described in Lefoulon et al. [2] are identifiable, especially ONC5 to which belong the new sequences.

Abbreviations

AIC: Akaike information criterion; BLASTn: Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool; BSA: Bovine serum albumin; cfDNA: cell-free DNA; *cox*1: cytochrome *c* oxidase subunit 1; GTR+I+Γ: general time-reversible plus invariant sites plus gamma distributed model; ITS2: internal transcribed spacer 2; LAMP: loop-mediated isothermal amplification; ML: Maximum Likelihood; mf: microfilariae; NGS: next-generation sequencing; NHP: non-human primates; (rt)PCR: (real time) polymerase chain reaction; SIV: simian immunodeficiency virus.

Acknowledgements

We are grateful to the staff of the SIV team from PRESICA, Hugues Nana Djeunga and Joseph Kamgno from CFilMT, Cédric Chesnais and Luc Abate (IRD) for samples and logistical support in Cameroon and the Cameroonian Ministries of Public Health and of Environment and Forestry. We thank Alain-Prince Okouga, Philippe Engandja and Vanina Boué for technical and logistic support in Gabon, and the Ministry of Water and Forests of Gabon, and also to Laetitia Serrano and Maxime Doret for technical support with DBS DNA extraction and analysis. The authors would like to thank the editor and reviewer for their valuable comments and suggestions on an earlier version of the manuscript.

Authors' contributions

SL conceived and designed the experiments. CMG, HH, CS, CB, TL, AE and SL performed the experiments. CMG, SDP, JR, CM and SL analysed the data. IM, FL, MP and EMN contributed reagents/materials/analysis tools. CMG, SDP, CM, MB and SL wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This work was supported in part by grants from the National Institute of Health (RO1 AI 50529), the Agence Nationale de Recherches sur le SIDA (ANRS 12125/12182/12325), by the Centre International de Recherches Médicales de Franceville (CIRMF) and the Institut de Recherche pour le Développement (IRD).

Availability of data and materials

All data generated or analysed during this study are included in this article and its additional files. We deposited all newly generated sequences from this study in the GenBank database under the accession numbers: MN890048-MN890124 (*cox*1) and MN927137-MN927180 (*12S* rDNA) (Additional file 1: Table S1). The datasets on *Oesophagostomum* spp. and *Necator* spp. used and/or analysed during the present study are available from the corresponding author on reasonable request.

Ethics approval and consent to participate

Non-human faecal samples were collected non-invasively, around nests, food sites, or on traces, on the forest floor. Human blood positive samples for ***M. perstans*** were included as controls, but collected specifically for a different study (unpublished). They were provided by third parties, collected in the Okola Health District, in the Centre region of Cameroon, under the approval of the regional ethical committee (No. 00828).

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors have declared that they have no competing interests.

Author details

[1] IRD UMI 233-INSERM U1175, University of Montpellier, Montpellier, France. [2] Unité Molécules de Communication et Adaptation des Microorganismes (MCAM UMR7245), Muséum national d'Histoire naturelle, CNRS, Paris, France. [3] Projet Prévention du Sida au Cameroun (PRESICA) and Virology Laboratory IMPM/IRD, Yaoundé, Cameroon. [4] Centre International de Recherches Médicales, BP 769 Franceville, Gabon. [5] Laboratoire Maladies Infectieuses et Vecteurs: Ecologie, Génétique, Evolution, Contrôle, UMR 224 IRD/CNRS/UM1, 34394 Montpellier, France.

Received: 15 January 2020 Accepted: 12 June 2020
Published online: 16 June 2020

References

1. Bain O, Mutafchiev Y, Junker K, Guerrero R, Martin C, Lefoulon E, et al. Review of the genus *Mansonella* Faust, 1929 *sensu lato* (Nematoda: Onchocercidae), with descriptions of a new subgenus and a new subspecies. Zootaxa. 2015;3918:151–93.
2. Lefoulon E, Bain O, Bourret J, Junker K, Guerrero R, Canizales I, et al. Shaking the tree: multi-locus sequence typing usurps current onchocercid (filarial nematode) phylogeny. PLoS Negl Trop Dis. 2015;9:e0004233.
3. Kamgno J, Pion SD, Chesnais CB, Bakalar MH, D'Ambrosio MV, Mackenzie CD, et al. A test-and-not-treat strategy for onchocerciasis in *Loa loa*-endemic areas. N Engl J Med. 2017;377:2044–52.
4. Drame PM, Montavon C, Pion SD, Kubofcik J, Fay MP, Nutman TB. Molecular epidemiology of blood-borne human parasites in a *Loa loa*-, *Mansonella perstans*-, and *Plasmodium falciparum*-endemic region of Cameroon. Am J Trop Med Hyg. 2016;94:1301–8.
5. Poole CB, Li Z, Alhassan A, Guelig D, Diesburg S, Tanner NA, et al. Colorimetric tests for diagnosis of filarial infection and vector surveillance using non-instrumented nucleic acid loop-mediated isothermal amplification (NINA-LAMP). PLoS One. 2017;12:e0169011.
6. Deng MH, Zhong LY, Kamolnetr O, Limpanont Y, Lv ZY. Detection of helminths by loop-mediated isothermal amplification assay: a review of updated technology and future outlook. Infect Dis Poverty. 2019;8:20.
7. Lagatie O, Merino M, Batsa Debrah L, Debrah AY, Stuyver LJ. An isothermal DNA amplification method for detection of *Onchocerca volvulus* infection in skin biopsies. Parasit Vectors. 2016;9:624.
8. Lefoulon E, Giannelli A, Makepeace BL, Mutafchiev Y, Townson S, Uni S, et al. Whence river blindness? The domestication of mammals and host-parasite co-evolution in the nematode genus Onchocerca. Int J Parasitol. 2017;47(8):457–70.
9. Prugnolle F, Durand P, Neel C, Ollomo B, Ayala FJ, Arnathau C, et al. African great apes are natural hosts of multiple related malaria species, including *Plasmodium falciparum*. Proc Natl Acad Sci USA. 2010;107:1458–63.
10. Abkallo HM, Liu W, Hokama S, Ferreira PE, Nakazawa S, Maeno Y, et al. DNA from pre-erythrocytic stage malaria parasites is detectable by PCR in the faeces and blood of hosts. Int J Parasitol. 2014;44:467–73.
11. Jirku M, Pomajbikova K, Petrzelkova KJ, Huzova Z, Modry D, Lukes J. Detection of *Plasmodium* spp. in human feces. Emerg Infect Dis. 2012;18:634–6.
12. Hasegawa H, Modry D, Kitagawa M, Shutt KA, Todd A, Kalousova B, et al. Humans and great apes cohabiting the forest ecosystem in central african republic harbour the same hookworms. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8:e2715.
13. Makouloutou P, Mbehang Nguema PP, Fujita S, Takenoshita Y, Hasegawa H, Yanagida T, et al. Prevalence and genetic diversity of *Oesophagostomum stephanostomum* in wild lowland gorillas at Moukalaba-Doudou National Park, Gabon. Helminthologia. 2014;51:83–93.
14. Hotez PJ, Brooker S, Bethony JM, Bottazzi ME, Loukas A, Xiao S. Hookworm infection. N Engl J Med. 2004;351:799–807.
15. Mapua MI, Pafco B, Burgunder J, Profousova-Psenkova I, Todd A, Hashimoto C, et al. No impact of strongyloides infections on the detection of *Plasmodium* spp. in faeces of western lowland gorillas and eastern chimpanzees. Malar J. 2017;16:175.
16. Neel C, Etienne L, Li Y, Takehisa J, Rudicell RS, Bass IN, et al. Molecular epidemiology of simian immunodeficiency virus infection in wild-living gorillas. J Virol. 2010;84:1464–76.
17. Boue V, Locatelli S, Boucher F, Ayouba A, Butel C, Esteban A, et al. High rate of simian immunodeficiency virus (SIV) infections in wild chimpanzees in northeastern Gabon. Viruses. 2015;7:4997–5015.
18. van der Kuyl AC, Kuiken CL, Dekker JT, Goudsmit J. Phylogeny of African monkeys based upon mitochondrial *12S* rRNA sequences. J Mol Evol. 1995;40:173–80.
19. Etienne L, Locatelli S, Ayouba A, Esteban A, Butel C, Liegeois F, et al. Noninvasive follow-up of simian immunodeficiency virus infection in wild-living nonhabituated western lowland gorillas in Cameroon. J Virol. 2012;86:9760–72.
20. Sullivan KM, Mannucci A, Kimpton CP, Gill P. A rapid and quantitative DNA sex test: fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin. Biotechniques. 1993;15:636–41.
21. Monleau M, Aghokeng AF, Eymard-Duvernay S, Dagnra A, Kania D, Ngo-Giang-Huong N, et al. Field evaluation of dried blood spots for routine HIV-1 viral load and drug resistance monitoring in patients receiving antiretroviral therapy in Africa and Asia. J Clin Microbiol. 2014;52:578–86.
22. Ferri G, Alu M, Corradini B, Licata M, Beduschi G. Species identification through DNA "barcodes". Genet Test Mol Biomarkers. 2009;13:421–6.
23. Casiraghi M, Labra M, Ferri E, Galimberti A, De Mattia F. DNA barcoding: a six-question tour to improve users' awareness about the method. Brief Bioinform. 2010;11:440–53.
24. Lefoulon E, Gavotte L, Junker K, Barbuto M, Uni S, Landmann F, et al. A new type F *Wolbachia* from Splendidofilariinae (Onchocercidae) supports the recent emergence of this supergroup. Int J Parasitol. 2012;42:1025–36.
25. Casiraghi M, Anderson TJ, Bandi C, Bazzocchi C, Genchi C. A phylogenetic analysis of filarial nematodes: comparison with the phylogeny of *Wolbachia* endosymbionts. Parasitology. 2001;122:93–103.
26. Ghai RR, Chapman CA, Omeja PA, Davies TJ, Goldberg TL. Nodule worm infection in humans and wild primates in Uganda: cryptic species in a newly identified region of human transmission. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8:e2641.
27. Gasser RB, Chilton NB, Hoste H, Beveridge I. Rapid sequencing of rDNA from single worms and eggs of parasitic helminths. Nucleic Acids Res. 1993;21:2525–6.
28. Romstad A, Gasser RB, Monti JR, Polderman AM, Nansen P, Pit DS, et al. Differentiation of *Oesophagostomum bifurcum* from *Necator americanus* by PCR using genetic markers in spacer ribosomal DNA. Mol Cell Probes. 1997;11:169–76.
29. Nucleotide BLAST: search nucleotide databases using a nucleotide query. https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch. Accessed 12 Jan 2020.
30. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Res. 2004;32:1792–7.
31. Posada D. jModelTest: phylogenetic model averaging. Mol Biol Evol. 2008;25:1253–6.
32. Bain O, Moisson P, Huerre M, Landsoud-Soukate J, Tutin C. Filariae from a wild gorilla in Gabon with description of a new species of *Mansonella*. Parasite. 1995;2:315–22.
33. Chabaud AG, Bain O. La lignée *Dipetalonema*. Nouvel essai de classification Ann Parasitol Hum Comp. 1976;51:365–97.
34. Van den Berghe L, Chardome M, Peel E. *Dipetalonema gorillae* n. sp., filaire de *Gorilla gorilla* au Congo Belge. Folia Sci Afr Cent. 1957;3:87.
35. Mourembou G, Fenollar F, Lekana-Douki JB, Ndjoyi Mbiguino A, Maghendji Nzondo S, Matsiegui PB, et al. *Mansonella*, including a potential new species, as common parasites in children in Gabon. PLoS Negl Trop Dis. 2015;9:e0004155.
36. Senanayake KS, Soderberg J, Polajev A, Malmberg M, Karunanayake EH, Tennekoon KH, et al. The genome of *Setaria digitata*: a cattle nematode closely related to human filarial parasites. Genome Biol Evol. 2020;12:3971–6.
37. Crainey JL, Marin MA, Silva T, de Medeiros JF, Pessoa FAC, Santos YV, et al. *Mansonella ozzardi* mitogenome and pseudogene characterisation provides new perspectives on filarial parasite systematics and CO-1 barcoding. Sci Rep. 2018;8:6158.
38. Crainey JL, Costa CHA, de Oliveira Leles LF, Ribeiro da Silva TR, de Aquino Narzetti LH, Serra Dos Santos YV, et al. Deep-sequencing reveals occult mansonellosis co-infections in residents from the Brazilian Amazon village of Sao Gabriel da Cachoeira. Clin Infect Dis. 2020:ciaa082.
39. Ta-Tang TH, Crainey JL, Post RJ, Luz SL, Rubio JM. Mansonellosis: current perspectives. Res Rep Trop Med. 2018;9:9–24.
40. WHO. Bench aids for the diagnosis of filarial infections. Geneva: World Health Organization; 1997.
41. Berghe L, Van den Chardome M, Peel E. *Microfilaria leopoldi* n. sp. chez *Gorilla gorilla* au Congo Belge. Folia Scientif Afr Centr. 1957;3:87.
42. Baird JK, Neafie RC, Lanoie L, Connor DH. Adult *Mansonella perstans* in the abdominal cavity in nine Africans. Am J Trop Med Hyg. 1987;37:578–84.
43. Peel E, Chardome M. Sur les Filaridés de Chimpanzés *Pan paniscus* et *Pan satyrus* au Congo Belge. Ann Soc Belge de Med Trop. 1946;26:117–56.
44. Cabaret J, Gasnier N, Jacquiet P. Faecal egg counts are representative of digestive-tract strongyle worm burdens in sheep and goats. Parasite. 1998;5:137–42.
45. Leoutsakos B, Agnadi N, Kolisiatis S. Rectal bleeding due to *Oesophagostomum brumpti*: report of a case. Dis Colon Rectum. 1977;20:632–4.
46. Van den Berghe L, Chardome M, Peel E. The filarial parasites of the eastern gorilla in the Congo. J Helminthol. 1964;38:349–68.

47. Krief S, Jamart A, Mahe S, Leendertz FH, Matz-Rensing K, Crespeau F, et al. Clinical and pathologic manifestation of oesophagostomosis in African great apes: does self-medication in wild apes influence disease progression? J Med Primatol. 2008;37:188–95.
48. Huffman MA, Gotoh S, Turner L, Yoshida K. Seasonal trends in intestinal nematode infection and medicinal plant use among chimpanzees in the Mahale Mountains, Tanzania. Primates. 1997;38:111–25.
49. Weerakoon KG, McManus DP. Cell-Free DNA as a diagnostic tool for human parasitic infections. Trends Parasitol. 2016;32:378–91.
50. Oi M, Sato Y, Nakagaki K, Nogami S. Detection of *Dirofilaria immitis* DNA in host serum by nested PCR. Parasitol Res. 2015;114:3645–8.
51. Petrzelkova KJ, Hasegawa H, Moscovice LR, Kaur T, Issa M, Huffman MH. Parasitic nematodes in the chimpanzee population on Rubondo Island, Tanzania. Int J Primatol. 2006;27:767.
52. Gedoelst L. Notes sur la faune parasitaire du Congo Belge Rev Zool Afr. 1916;5:1–90.
53. Baylis HA. On a collection of nematodes from Nigerian mammals (chiefly rodents). Parasitology. 1928;20:208–304.
54. Morel PC. Les helminthes des animaux domestiques de l'Afrique occidentale. Rev Elev Med Vet Pays Trop. 1959;12:153–74.
55. Tubangui MA. Worm parasites of the brown rat (*Mus norvegicus*) in the Philippine Islands with a special reference to those forms that may be transmitted to human beings. Philippine J Sci. 1931;46:537–92.
56. Tenora F, Barus V, Prokes M, Sumbera R, Koubkova B. Helminths parasitizing the silvery mole-rat *Heliophobius argenteocinereus* (Rodentia: Bathyergidae) from Malawi. Helminthologia. 2003;40:153–60.
57. Anderson RC. Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission. 2nd ed. Wallingford: CABI Publishing; 2000.
58. Vuylsteke A. Note sur quelques Nématodes parasites avec description de neuf especes nouvelles. Rev Zool Bot Afr. 1956;53:441–77.
59. Foster AO, Johnson CM. A preliminary note on identity, life cycle, and pathogenicity of an important parasite of captive monkeys. Am J Trop Med Hyg. 1939;19:265–77.
60. Dollfus RP, Chabaud AG. Cinq especes de nématodes chez un atele [*Ateles ater* (G. Cuvier 1823)] mort a la ménagerie du museum. Arch Mus Hist Nat. 1955;3:27–40.
61. Nelson GS. Filarial infections as zoonoses. J Helminthol. 1965;39:220–50.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



Additional file 1: Table S1

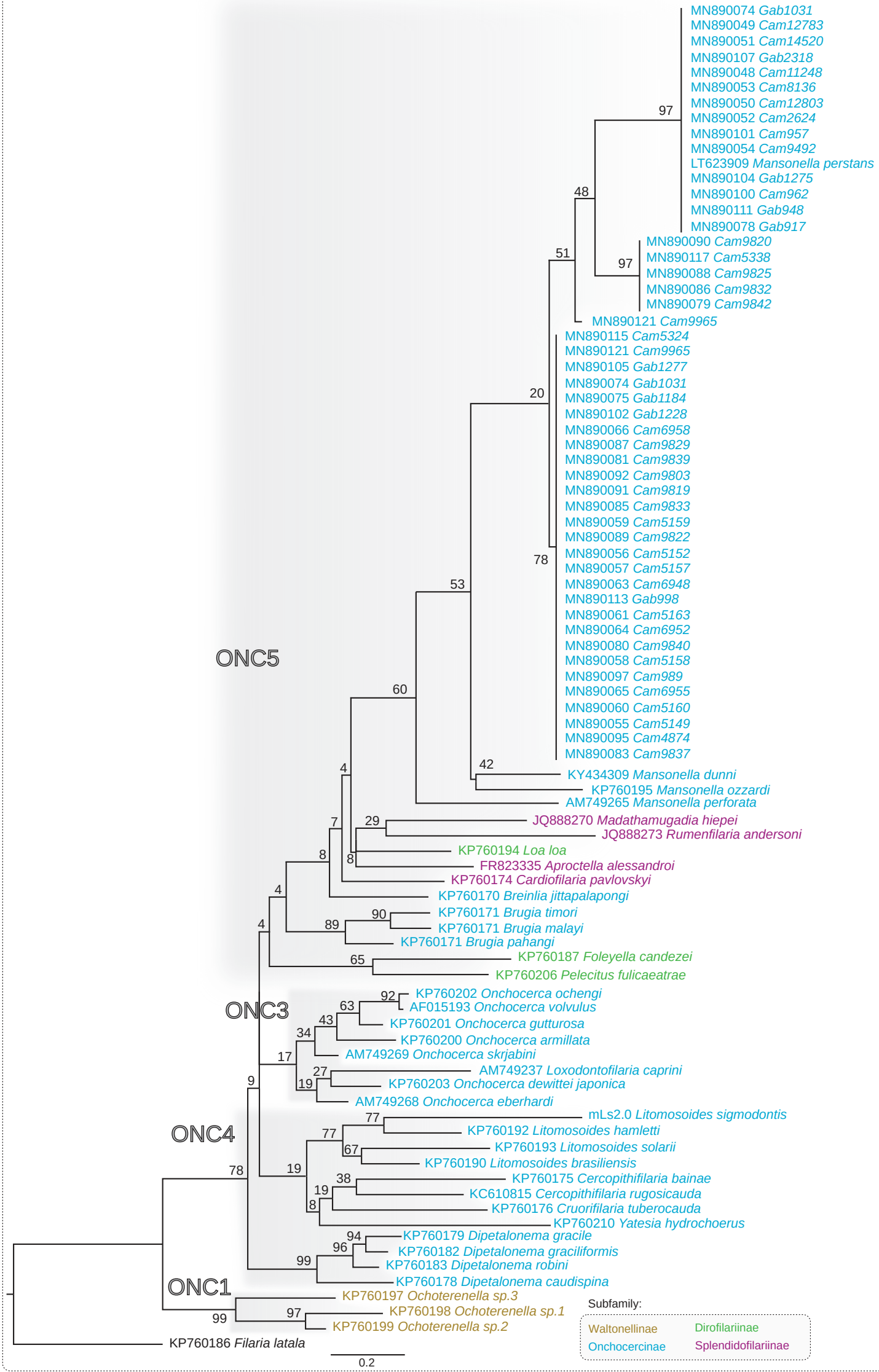
Host species	Sequence ID	#Accession (*cox*1)
H.sapiens	*Cam11248*	MN890048
H.sapiens	*Cam12783*	MN890049
H.sapiens	*Cam12803*	MN890050
H.sapiens	*Cam14520*	MN890051
H.sapiens	*Cam2624*	MN890052
H.sapiens	*Cam8136*	MN890053
H.sapiens	*Cam9492*	MN890054
C.agilis	*Cam5149*	MN890055
P.t.troglodytes	*Cam5152*	MN890056
P.t.troglodytes	*Cam5157*	MN890057
P.t.troglodytes	*Cam5158*	MN890058
P.t.troglodytes	*Cam5159*	MN890059
P.t.troglodytes	*Cam5160*	MN890060
P.t.troglodytes	*Cam5163*	MN890061
P.t.troglodytes	*Cam6945*	MN890062
P.t.troglodytes	*Cam6948*	MN890063
P.t.troglodytes	*Cam6952*	MN890064
P.t.troglodytes	*Cam6955*	MN890065
P.t.troglodytes	*Cam6958*	MN890066
P.t.troglodytes	*Cam6959*	MN890067
P.t.troglodytes	*Cam772*	MN890068
P.t.troglodytes	*Cam773*	MN890069
P.t.troglodytes	*Gab1000*	MN890070
P.t.troglodytes	*Gab1002*	MN890071
P.t.troglodytes	*Gab1015*	MN890072
P.t.troglodytes	*Gab1022*	MN890073
P.t.troglodytes	*Gab1031*	MN890074
P.t.troglodytes	*Gab1184*	MN890075
P.t.troglodytes	*Gab1188*	MN890076
P.t.troglodytes	*Gab1003*	MN890077
P.t.troglodytes	*Gab917*	MN890078
G.g.gorilla	*Cam9842*	MN890079
G.g.gorilla	*Cam9840*	MN890080
G.g.gorilla	*Cam9839*	MN890081
G.g.gorilla	*Cam9838*	MN890082
G.g.gorilla	*Cam9837*	MN890083
G.g.gorilla	*Cam9835*	MN890084
G.g.gorilla	*Cam9833*	MN890085
G.g.gorilla	*Cam9832*	MN890086
G.g.gorilla	*Cam9829*	MN890087
G.g.gorilla	*Cam9825*	MN890088
G.g.gorilla	*Cam9822*	MN890089
G.g.gorilla	*Cam9820*	MN890090
G.g.gorilla	*Cam9819*	MN890091
G.g.gorilla	*Cam9803*	MN890092
C. nictitans	*Cam4880*	MN890093

C. nictitans	*Cam4879*	MN890094
P.t.troglodytes	*Cam4874*	MN890095
P.t.troglodytes	*Cam991*	MN890096
P.t.troglodytes	*Cam989*	MN890097
P.t.troglodytes	*Cam987*	MN890098
P.t.troglodytes	*Cam963*	MN890099
P.t.troglodytes	*Cam962*	MN890100
P.t.troglodytes	*Cam957*	MN890101
P.t.troglodytes	*Gab1228*	MN890102
P.t.troglodytes	*Gab1253*	MN890103
P.t.troglodytes	*Gab1275*	MN890104
P.t.troglodytes	*Gab1277*	MN890105
P.t.troglodytes	*Gab1301*	MN890106
P.t.troglodytes	*Gab2318*	MN890107
P.t.troglodytes	*Gab2351*	MN890108
P.t.troglodytes	*Gab2352*	MN890109
P.t.troglodytes	*Gab913*	MN890110
P.t.troglodytes	*Gab948*	MN890111
P.t.troglodytes	*Gab949*	MN890112
P.t.troglodytes	*Gab998*	MN890113
C. nictitans	*Cam6960*	MN890114
G.g.gorilla	*Cam5324*	MN890115
G.g.gorilla	*Cam5337*	MN890116
G.g.gorilla	*Cam5338*	MN890117
G.g.gorilla	*Cam5354*	MN890118
G.g.gorilla	*Cam5360*	MN890119
G.g.gorilla	*Cam5369*	MN890120
G.g.gorilla	*Cam9965*	MN890121
G.g.gorilla	*Cam10016*	MN890122
G.g.gorilla	*Cam10015*	MN890123
G.g.gorilla	*Cam10014*	MN890124
H.sapiens	*Mansonella perstans*	KU215907
H.sapiens	*Mansonella perstans*	LT623909
H.sapiens	*Mansonella ozzardi*	KP760195
Not specified	*Mansonella dunni*	KY434309
Not specified	*Loa loa*	AJ544875
Canis lupus familiaris	*Dirofilaria repens*	KY828979
H.sapiens	*Onchocerca volvulus*	MH190075
Gorilla sp.	*Protospirura muricola*	KP760207
Panthera leo	*Filaria lalata*	KP760186
Agama agam	*Foleyella candezei*	KP760187
Ateles sp.	*Dipetalonema caudispina*	KP760178
Bos taurus	*Onchocerca armillata*	KP760200
B. taurus	*Onchocerca gutturosa*	KP760201
B. taurus	*Onchocerca ochengi*	KP760202
Canis familiaris	*Cercopithifilaria bainae*	KP760175
Capreolus capreolus	*Cercopithifilaria rugosicauda*	KC610815
Cariollia perspicillata	*Litomosoides brasiliensis*	KP760190
Cebus olivaceus	*Dipetalonema gracile*	KP760179
Cervus nippon	*Mansonella perforata*	AM749265

C. nippon	*Onchocerca eberhardi*	AM749268
C. nippon	*Onchocerca skrjabini*	AM749269
Glossophaga soricina	*Litomosoides hamletti*	KP760192
H.sapiens	*Brugia timori*	KP760171
H.sapiens	*Loa loa*	KP760194
Hydrochoerus hydrochaeris	*Cruorifilaria tuberocauda*	KP760176
H. hydrochaeris	*Yatesia hydrochoerus*	KP760210
Lagothrix peoppigi	*Dipetalonema robini*	KP760183
Meriones unguiculatus	*Brugia malayi*	KP760171
M. unguiculatus	*Brugia pahangi*	KP760171
M. unguiculatus	*Litomosoides sigmodontis*	mLs2.0
Naemorhedus crispus	*Loxodontofilaria caprini*	AM749237
Not specified	*Onchocerca volvulus*	AF015193
Oriolus oriolus	*Cardiofilaria pavlovskyi*	KP760174
Pachycactylus turneri	*Madathamugadia hiepei*	JQ888270
Phyllomedusa bicolor	*Ochoterenella sp.3*	KP760197
Podiceps nigricollis	*Pelecitus fulicaeatrae*	KP760206
Rangifer tarandus	*Rumenfilaria andersoni*	JQ888273
Rattus tanezumi	*Breinlia jittapalapongi*	KP760170
Rhinella granulosa	*Ochoterenella sp.1*	KP760198
R. marina	*Ochoterenella sp.2*	KP760199
Saltator similis	*Aproctella alessandroi*	FR823335
Samiris scuireus	*Dipetalonema graciliformis*	KP760182
Sus scrofa	*Onchocerca dewittei japonica*	KP760203
Trachops cirrhosus	*Litomosoides solarii*	KP760193

Host species	**Sequence ID**	**#Accession *12S* rDNA**
C.torquatus	*Cam3338*	MN927137
P.t.troglodytes	*Gab947*	MN927138
P.t.troglodytes	*Gab904*	MN927139
P.t.troglodytes	*Gab957*	MN927140
G.g.gorilla	*Cam9847*	MN927141
G.g.gorilla	*Cam9846*	MN927142
G.g.gorilla	*Cam9838*	MN927143
G.g.gorilla	*Cam9837*	MN927144
G.g.gorilla	*Cam9833*	MN927145
G.g.gorilla	*Cam9821*	MN927146
G.g.gorilla	*Cam9819*	MN927147
G.g.gorilla	*Cam9805*	MN927148
G.g.gorilla	*Cam9803*	MN927149
G.g.gorilla	*Cam9802*	MN927150
G.g.gorilla	*Cam9801*	MN927151
P.t.troglodytes	*Cam4875*	MN927152
P.t.troglodytes	*Cam4874*	MN927153
P.t.troglodytes	*Cam990*	MN927154
Mandrillus sphinx	*Cam3337*	MN927155
P.t.troglodytes	*Cam775*	MN927156
P.t.troglodytes	*Gab1294*	MN927157
P.t.troglodytes	*Cam10017*	MN927158
G.g.gorilla	*Cam2470*	MN927159
P.t.troglodytes	*Gab2318*	MN927160
P.t.troglodytes	*Gab998*	MN927161
P.t.troglodytes	*Cam777*	MN927162
P.t.troglodytes	*Cam776*	MN927163
P.t.troglodytes	*Cam5154*	MN927164
P.t.troglodytes	*Cam5153*	MN927165
P.t.troglodytes	*Cam5160*	MN927166
C. agilis	*Cam5149*	MN927167
P.t.troglodytes	*Cam5148*	MN927168
P.t.troglodytes	*Cam5145*	MN927169
P.t.troglodytes	*Gab1291*	MN927170
P.t.troglodytes	*Gab1275*	MN927171
P.t.troglodytes	*Gab1248*	MN927172
P.t.troglodytes	*Cam5139*	MN927173
P.t.troglodytes	*Cam5158*	MN927174
H.sapiens	*Cam8136*	MN927175
H.sapiens	*Cam9492*	MN927176
H.sapiens	*Cam11248*	MN927177
H.sapiens	*Cam12803*	MN927178
H.sapiens	*Cam14520*	MN927179
H.sapiens	*Cam2604*	MN927180
Not specified	*Mansonella perstans*	LT623913

C. olivaceus	*Mansonella_atalensis_amazonae*	AM779823
Not specified	*Mansonella_dunni*	KY434310
H.sapiens	*Mansonella_ozzardi*	JF412324
Cervus nippon	*Mansonella_perforata*	AM779802
Not specified	*Brugia_malayi*	AJ544843
Cervus elaphus	*Onchocerca_flexuosa*	LT732683
Lutra lutra	*Dirofilaria_immitis*	MH051846
Panthera leo	*Filaria_lalata*	KP760332


MN890074 Gab1031
MN890049 Cam12783
MN890051 Cam14520
MN890107 Gab2318
MN890048 Cam11248
MN890053 Cam8136
MN890050 Cam12803
MN890052 Cam2624
MN890101 Cam957
MN890054 Cam9492
LT623909 Mansonella perstans
MN890104 Gab1275
MN890100 Cam962
MN890111 Gab948
MN890078 Gab917
MN890090 Cam9820
MN890117 Cam5338
MN890088 Cam9825
MN890086 Cam9832
MN890079 Cam9842
MN890121 Cam9965
MN890115 Cam5324
MN890121 Cam9965
MN890105 Gab1277
MN890074 Gab1031
MN890075 Gab1184
MN890102 Gab1228
MN890066 Cam6958
MN890087 Cam9829
MN890081 Cam9839
MN890092 Cam9803
MN890091 Cam9819
MN890085 Cam9833
MN890059 Cam5159
MN890089 Cam9822
MN890056 Cam5152
MN890057 Cam5157
MN890063 Cam6948
MN890113 Gab998
MN890061 Cam5163
MN890064 Cam6952
MN890080 Cam9840
MN890058 Cam5158
MN890097 Cam989
MN890065 Cam6955
MN890060 Cam5160
MN890055 Cam5149
MN890095 Cam4874
MN890083 Cam9837
KY434309 Mansonella dunni
KP760195 Mansonella ozzardi
AM749265 Mansonella perforata
JQ888270 Madathamugadia hiepei
JQ888273 Rumenfilaria andersoni
KP760194 Loa loa
FR823335 Aproctella alessandroi
KP760174 Cardiofilaria pavlovskyi
KP760170 Breinlia jittapalapongi
KP760171 Brugia timori
KP760171 Brugia malayi
KP760171 Brugia pahangi
KP760187 Foleyella candezei
KP760206 Pelecitus fulicaeatrae
KP760202 Onchocerca ochengi
AF015193 Onchocerca volvulus
KP760201 Onchocerca gutturosa
KP760200 Onchocerca armillata
AM749269 Onchocerca skrjabini
AM749237 Loxodontofilaria caprini
KP760203 Onchocerca dewittei japonica
AM749268 Onchocerca eberhardi
mLs2.0 Litomosoides sigmodontis
KP760192 Litomosoides hamletti
KP760193 Litomosoides solarii
KP760190 Litomosoides brasiliensis
KP760175 Cercopithifilaria bainae
KC610815 Cercopithifilaria rugosicauda
KP760176 Cruorifilaria tuberocauda
KP760210 Yatesia hydrochoerus
KP760179 Dipetalonema gracile
KP760182 Dipetalonema graciliformis
KP760183 Dipetalonema robini
KP760178 Dipetalonema caudispina
KP760197 Ochoterenella sp.3
KP760198 Ochoterenella sp.1
KP760199 Ochoterenella sp.2
KP760186 Filaria latala
ONC5
ONC3
ONC4
ONC1
0.2
Subfamily:
Waltonellinae
Onchocercinae
Dirofilariinae
Splendidofilariinae