

**Superintendência de Controle de Endemias**

**MALÁRIA SÍMIA: DETECÇÃO DE *PLASMODIUM* EM FEZES DE PRIMATAS NÃO  
HUMANOS**

**Aline Carmo Vieira**

**Curso Especialização:**

**Vigilância e Controle de Vetores e Hospedeiros Intermediários**

**Orientadora:**

**Dra. Ana Maria Ribeiro de Castro Duarte**

**São Paulo**

**Fevereiro 2021**

**Aline Carmo Vieira**

**MALÁRIA SÍMIA: DETECÇÃO DE *PLASMODIUM* EM FEZES DE PRIMATAS NÃO  
HUMANOS**

Trabalho de conclusão de curso de especialização apresentado a Superintendência de Controle de Endemias, unidade do Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP “Doutor Antônio Guilherme de Souza”, como requisito parcial para a obtenção do título de Especialista em Vigilância e Controle de Vetores e Hospedeiros Intermediários.

Orientador (a): Dra. Ana Maria Ribeiro de Castro Duarte

**São Paulo**

**2021**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Vieira, Aline Carmo

Malária Símia: detecção de plasmodium em fezes de primatas não humanos / Aline Carmo Vieira. – 2021.

Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Superintendência de Controle de Endemias, São Paulo, 2021.

Área de concentração: Vigilância e Controle de Vetores e Hospedeiros Intermediários .

Orientação: Prof(a). Dr(a). Ana Maria Ribeiro de Castro Duarte.

1. Malária. 2. Plasmodium. 3. Reação em cadeia da polimerase. 4. Fezes. 5. Primatas. 6. Anopheles.

SES/CCD/SUCEN - 106/2021

Elaborada por Renan Matheus Predasoli 8/9275

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, pela oportunidade de chegar até aqui.

A minha família por todo apoio e suporte que me foi dado.

A minha orientadora Dra. Ana Maria Ribeiro de Castro Duarte, pela oportunidade, pelos ensinamentos que me foram passados e por sua paciência.

Agradeço também a minha colega Thaysa C. C. Figueredo, por me ensinar as técnicas laboratoriais de biologia molecular e pelo auxílio na produção deste trabalho.

Agradeço aos meus colegas Jomar Fagundes e Lucas Mendes, pela oportunidade de trabalharmos juntos e pelos ensinamentos que me foram dados.

E a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

## RESUMO

Vieira, Aline Carmo. **MALÁRIA SÍMIA: DETECÇÃO DE *PLASMODIUM* EM FEZES DE PRIMATAS NÃO HUMANOS**. 2021. 41p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Vigilância e Controle de Vetores e Hospedeiros Intermediários) – Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP; SUCEN, São Paulo, 2021.

**Introdução.** A malária é uma doença infecciosa vetorial sendo atualmente considerada uma das maiores protozooses do mundo, mantendo-se endêmica principalmente na África, na região Amazônica da América do Sul e no Sudeste Asiático. Essa doença é causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, sendo que cinco espécies são capazes de infectar humanos: *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* e o mais recente, *P. knowlesi*, que é considerado como um parasito zoonótico. Há fatos que demonstram que esses parasitas que hoje infectam humanos, descendem de *Plasmodium* símios, e as infecções de símios continuam ocorrendo até os dias atuais. No Brasil os principais agentes de malária símia são *Plasmodium brasilianum* e *Plasmodium simium* (similar com *P. malariae* e *P. vivax*, respectivamente), sendo que esses dois parasitos estão envolvidos em situações zoonóticas no bioma Mata Atlântica, sendo o seu vetor o *Anopheles cruzii*. Tendo em vista esse cenário epidemiológico da malária residual, foi verificada a importância de realizar uma revisão sobre os principais estudos baseados e detecção de *Plasmodium* em fezes de primatas não humanos. **Objetivo.** Realizar uma revisão bibliográfica e atualização das principais técnicas existentes de detecção de *Plasmodium* em fezes de primatas não humanos descritas na literatura; bem como conhecer e realizar as técnicas de extração de DNA de fezes de primatas não humanos e técnicas de PCR em tempo real e PCR convencional para rastreamento de DNA de primatas não humanos e de plasmódios. **Materiais e Métodos.** Foi realizado levantamento bibliográfico nas bases de dados da *SciELO*, *Lilacs*, *PubMed*, *MedLine* e na Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), de artigos e livros que descrevam a utilização de técnicas de detecção de *Plasmodium* em fezes de primatas não humanos, utilizando um total de 46 artigos publicados entre os anos de 1951 a 2021. **Resultados.** No delineamento

da revisão foram selecionados 46 artigos que apresentassem menção explícita sobre as técnicas de detecção de *Plasmodium*, fezes e/ou menção explícita sobre malária e/ou malária símia. Na prática laboratorial, foram realizadas extrações de DNA e realizadas reações de PCR em Tempo real (TaqMan 18S rRNA) e PCR para amplificação de fragmento de cyt b de gênero Plasmodium em trinta e cinco amostras fecais de *Alouatta guariba clamitans* do Parque Estadual da Cantareira, município de São Paulo (Projeto FAPESP 2014/10.919-4, coordenado pela Dra. Ana Maria R. de C. Duarte). **Discussão/Conclusão.** Após a realização da revisão e das práticas laboratoriais, foi possível conhecer a abrangência do uso da técnica não invasiva e diagnóstico de plasmódios em fezes de primatas não humanos no mundo, em especial na África e Sudeste Asiático, e também levantar as principais vantagens e desvantagens da utilização de fezes para detecção de *Plasmodium*. Diante disso, conclui-se que a utilização das técnicas PCR utilizando DNA oriundo das fezes podem trazer relevantes benefícios nos estudos de malária símia e humana em situações zoonóticas, bem como auxiliar nas atividades de Vigilância e Controle.

**Palavras-chave:** Malária, Plasmodium, Reação em cadeia da polimerase, Fezes, Primatas e Anopheles.

## ABSTRACT

Vieira, Aline Carmo. **SIMIAN MALÁRIA: DETECTION OF *PLASMODIUM* IN NON-HUMANS PRIMATE FECES**. 2021. 41p. Monograph (Specialization in Vector Surveillance and Control and Intermediate Hosts) – Human Resources Training Center for the SUS/SP; SUCEN, São Paulo, 2021.

**Introduction.** Malaria is an infectious vector disease and is currently considered one of the largest protozooses in the world, remaining endemic mainly in Africa, the Amazon region of South America and Southeast Asia. This disease is caused by protozoa of the genus *Plasmodium*, with five species capable of infecting humans: *P. vivax*, *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* and the most recent, *P. knowlesi*, which is considered as a parasite zoonotic. There are facts that demonstrate that these parasites that infect humans, are descended from simians *Plasmodium*, and simian infections continue to occur today. In Brazil the main agents of simian malaria are *Plasmodium brasilianum* and *Plasmodium simium* (similar with human *P. malariae* and *P. vivax*, respectively) and these two parasites are involved in zoonotic situations in the Atlantic forest biome, its vector being *Anopheles cruzii*. In view of this epidemiological scenario of residual malaria, the importance of conducting a review of the main studies based on and detection of *Plasmodium* in feces of non-human primates was verified. **Objectives.** Perform a literature review and update the main existing techniques for detecting *Plasmodium* in feces of non-human primates described in the literature; as well as know and perform the techniques of DNA extraction from feces of non-human primates and techniques of real-time PCR and conventional PCR for tracking DNA of non-human primates and plasmodia. **Materials and methods.** A bibliographic survey was conducted in the databases of SciELO, Lilacs, PubMed, MedLine and in the Virtual Health Library (VHL), of articles and books describe the use of *Plasmodium* detection techniques in non-human primate feces, using a total of 46 articles published between the years 1951 to 2021. **Results.** In the outline of the review, 46 articles were selected that had an explicit mention of the techniques for detecting *Plasmodium*, feces and/or an explicit mention of simian malaria. In laboratory practice, DNA extractions and real-time PCR reactions (TaqMan 18S rRNA) and PCR were performed to amplify a *Plasmodium* cyt b fragment in thirty-

five fecal samples of *Alouatta guariba clamitans* from Cantareira State Park, municipality of São Paulo (Projeto FAPESP 2014/10.919-4, coordinated by Dra. Ana Maria R. de C. Duarte). **Discussion/Conclusion.** After conducting the review and laboratory practices, it was possible to know the scope of the use of the non-invasive technique and diagnosis of plasmodia in feces of non-human primates in the world, especially in Africa and Southeast Asia, and also to raise the main advantages and disadvantages the use of feces to detect *Plasmodium*. Therefore, it is concluded that the use of PCR techniques using DNA from feces can bring relevant benefits in studies of simian and human malaria in zoonotic situations, as well as assisting in Surveillance and Control activities.

**Keywords:** Malaria, Plasmodium, Polymerase chain reaction, Feces, Primates, Anopheles.

## LISTA DA TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Distribuição dos casos autóctones de malária segundo município provável de infecção e ano de sintomas, Estado de São Paulo, 2018 a 2020. ....	<b>12</b>
<b>Tabela 2.</b> Plasmódios símios: espécie, hospedeiro e distribuição geográfica. ....	<b>16</b>
<b>Tabela 3.</b> Principais artigos consultados para elaboração da revisão, com enfoque na detecção de plasmódios nas fezes de primatas não humanos. ....	<b>24</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Eletroforese em gel de agarose a 2%. .....	<b>27</b>
<b>Figura 2.</b> PCR em tempo real de fezes de <i>Alouatta guariba clamitans</i> para detecção de <i>P. vivax</i> .....	<b>28</b>
<b>Figura 3.</b> PCR em tempo real de fezes de <i>Alouatta guariba clamitans</i> para detecção de <i>P. malarie</i> . .....	<b>29</b>
<b>Figura 4.</b> Eletroforese em gel de agarose a 2%. .....	<b>30</b>

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
1.1 A Doença.....	11
1.2 Epidemiologia .....	12
1.3 Plasmódios e vetores.....	13
1.4 Ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> .....	14
1.5 Malária Símia .....	14
1.6 Técnicas de detecção (sangue, urina e fezes).....	17
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>19</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>19</b>
3.1 Geral .....	19
3.2 Específicos .....	20
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>20</b>
4.1 Delineamento da revisão .....	20
4.2 Prática das técnicas associadas.....	21
4.2.1 Extração de DNA.....	21
4.2.2 PCR para detecção de DNA de macacos nas amostras de fezes .....	21
4.2.3 PCR para detecção de DNA de macacos nas amostras de fezes e detecção de DNA de plasmódio .....	22
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>23</b>
5.1 Artigos agregados para revisão bibliográfica .....	23
5.2 Resultado das reações de PCR para detecção de <i>Plasmodium</i> nas fezes .	26
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>31</b>
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	<b>34</b>
<b>8 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>35</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 A DOENÇA

A malária é uma doença infecciosa, cujo agente etiológico é um protozoário pertencente ao gênero *Plasmodium*, transmitida por vetores anofelinos, que pode infectar além de humanos, outros mamíferos, répteis e pássaros. Caracterizada por um quadro febril agudo, que pode se apresentar a cada 3 dias (malária terçã) ou a cada 4 dias (malária quartã), a depender do ciclo reprodutivo do agente etiológico, tendo como principais sintomas, além da hipertermia, calafrios, tremores, sudorese e cefaleia (ASSIS *et al.*, 2016; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

Geralmente, a malária se apresenta de forma assintomática ou com sintomas consideráveis leves (MILNER JR., 2018), porém, a gravidade da doença dependerá da vulnerabilidade do hospedeiro (onde crianças e gestantes possuem maior risco de evoluírem para formas mais graves da doença) e do parasita, levando em conta aspectos como sua patogenicidade e a densidade parasitaria no hospedeiro (GOMES *et al.*, 2011). Mesmo possuindo menor probabilidade de ocorrerem, algumas das complicações consideráveis comuns da malária grave são: acometimento do sistema nervoso central (SNC), anemia grave, insuficiência renal aguda (IRA), disfunção pulmonar, hipotensão e choque, coagulação intravascular disseminada, hipoglicemia, acidose metabólica e disfunção hepática (GOMES *et al.*, 2011).

A escolha do tratamento adequado da malária, deve ser realizada após serem analisados aspectos importantes do paciente, como a gravidade da doença, a espécie de *Plasmodium* infectante, a idade do paciente, além do histórico de suscetibilidade e resistência desta espécie aos antimaláricos habituais. Atualmente são utilizados os fármacos da família das quinolinas, associados a outros quimioterápicos (PIMENTEL *et al.*, 2007).

## 1.2 EPIDEMIOLOGIA

A malária é considerada como a protozoose de maior impacto no mundo, colocando sob risco aproximadamente 40% da população mundial, essa doença é distribuída principalmente em regiões tropicais e subtropicais do mundo, ocorrendo principalmente na África, na região Amazônica da América do Sul e no Sudeste Asiático. No Brasil, foram registrados 194.271 casos em 2018 onde cerca de 99% dos casos se concentram na região Amazônica, contudo algumas regiões apresentam casos esporádicos e somente o Estado do Rio Grande do Sul, o Distrito Federal e a ilha de Fernando de Noronha não apresentam casos, pois não possuem condições para transmissão da doença (TAUIL *et al.*, 1985; GOMES *et al.*, 2011; OMS, 2019).

No Estado de São Paulo, a transmissão autóctone da malária, ocorre em duas regiões distintas. Sendo uma na região oeste do estado, contemplando as bacias hidrográficas dos rios Paraná, Paranapanema e São José dos Dourados e a outra é a região da Serra do Mar, litoral norte e sul do estado, no Bioma Mata Atlântica. Na tabela 1 é possível observar a distribuição de casos autóctones de malária no Estado de São Paulo entre os anos de 2018 a 2020 (CVE, 2020).

Tabela 1. Distribuição dos casos autóctones de malária segundo município provável de infecção e ano de sintomas, Estado de São Paulo, 2018 a 2020.

Município Provável de Infecção	2018*		2019*		2020*	
	n° de casos	%	n° de casos	%	n° de casos	%
Bertioga	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Biritiba-Mirim	1	11,1	0	0,0	0	0,0
Cananeia	0	0,0	1	7,7	0	0,0
Caraguatatuba	1	11,1	2	15,4	0	0,0
Eldorado	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Iporanga	0	0,0	1	7,7	1	20,0
Juquitiba	1	11,1	0	0,0	0	0,0
Miracatu	0	0,0	2	15,4	0	0,0
Mongagua	0	0,0	0	0,0	1	20,0
Natividade da Serra	1	11,1	3	23,1	0	0,0
Paraibuna	0	0,0	1	7,7	0	0,0
Salesópolis	1	11,1	0	0,0	0	0,0
São Paulo	0	0,0	1	7,7	0	0,0
São Sebastião	4	44,4	2	15,4	3	60,0
Ubatuba	0	0,0	0	0,0	0	0,0
<b>Total</b>	<b>9</b>	<b>100,0</b>	<b>13</b>	<b>100,0</b>	<b>5</b>	<b>100,0</b>

Fonte: SINANNET/Divisão de Zoonoses – CVE 2020.

### 1.3 PLASMÓDIOS E VETORES

Atualmente, são consideradas cinco espécies de *Plasmodium*, capazes de infectar os seres humanos, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* e o mais recente *Plasmodium knowlesi*, sendo o *P. vivax* o mais frequente e o *P. falciparum* o de maior relevância, causando milhões de casos de malária e mais de um milhão de óbitos por ano (OLLOMO *et al.*, 2009).

O *P. knowlesi*, considerado anteriormente apenas como plasmódio restrito à malária símia no Sudeste Asiático, e que possui como hospedeiros principais as espécies *Macaca fascicularis*, *Macaca nemestrina* e *Presbytis melalophos*, atualmente é considerado uma espécie zoonótica, após o primeiro surto de casos em seres humano na Malásia, onde originalmente foi erroneamente identificado como *P. malariae*, já que ambos possuem uma difícil distinção microscópica. Hoje vemos que o *P. knowlesi* se tornou um dos principais agentes etiológicos de malária humana, principalmente na Ilha de Bornéu, na Malásia, sendo considerada a quinta espécie conhecida causadora de malária humana (COX-SINGH *et al.* 2008; LEE *et al.*, 2011; AMIR *et al.*, 2018).

As formas infectantes de *Plasmodium* são transmitidas pela picada do vetor, fêmea de mosquito do gênero *Anopheles*. Existem aproximadamente, 40 espécies do gênero com capacidade vetorial para transmissão da malária, sendo 18 encontradas na América do Sul (SUCEN, 2020).

No Brasil, possuímos dois cenários completamente particulares entre si, temos os vetores da região Amazônica, sendo o principal deles o *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi*, capaz de manter a malária endêmica nessa região, mesmo se apresentando em baixa densidade (TADEI e THATCHER, 2000), e no bioma Mata Atlântica do sul e sudeste brasileiros, a transmissão da malária, dá-se pela picada de fêmeas de *Anopheles (Kerteszia) cruzii*, que mantém o ciclo da malária humana e símia nessa região (DEANE, 1992). A malária nesse bioma é chamada de malária-bromélia, uma vez que as fêmeas anofelinas ovipõem na água acumulada nos verticilos destas plantas (MARQUES *et al.*, 2008).

#### 1.4 CICLO DE VIDA DO *PLASMODIUM*

A fêmea de *Anopheles* injeta as formas infectantes, os esporozoítos, durante o repasto sanguíneo realizado em um hospedeiro humano sadio, dá-se início a fase esquizogônica. A partir da infecção, o parasita invade as células do fígado (hepatócitos) onde ocorre a esquizogonia (multiplicação por processo de divisão múltipla), originando esquizontes teciduais (ciclo exoeritrocítico). Após alguns dias, se originam milhares de merozoítos a partir de cada esquizonte, que invadirão os eritrócitos. No interior dos eritrócitos, sofrerão outra transformação, os trofozoítos, que crescerão e sofrerão divisão tornando-se esquizontes sanguíneos, que originarão novos merozoítos (ciclo eritrocítico). Há então a ruptura celular e extravasamento dos merozoítos, que iniciarão um novo ciclo. Algumas formas se diferenciam em microgametócitos e macrogametócitos, que poderão ser ingeridos durante repasto de fêmeas anofelinas (NOGUEIRA e ROSÁRIO, 2010; GOMES *et al.*, 2011).

No vetor, o sangue chegará ao trato digestivo do inseto, onde as hemácias se romperão e liberarão os gametócitos. Os gametócitos masculinos sofrem um processo de exflagelação. Após a fecundação entre os gametas, forma-se então o zigoto, que será diferenciado em oocineto, forma capaz de atravessar a membrana do epitélio. O oocineto forma uma cápsula protetora, se diferenciando em oocisto. Inicia-se então o processo de multiplicação esporogônica, tendo sua primeira divisão em meiose, seguida de múltiplas mitoses, que liberam esporozoítos na hemolinfa do inseto. Estes esporozoítos, se deslocam até as glândulas salivares do inseto, onde poderão infectar novos indivíduos, uma vez infectada a fêmea com o *Plasmodium*, ela permanecerá infectada pelo resto de sua vida (TADEI e THATCHER, 2000; REY, 2008; SUCEN, 2020).

#### 1.5 MALÁRIA SÍMIA

Os continentes Africano e Asiático contemplam cerca de 80% das infecções por *Plasmodium* no Mundo (MUELLER *et al.*, 2009), algo considerável se levarmos em conta que a história evolutiva de *P. falciparum* está associada aos gorilas africanos (*Gorila gorila*), já o *P. vivax* pode ter se originado de uma mutação de *Plasmodium* que infectava humanos, gorilas e chimpanzés da África, até a mutação de Duffy

negativo, (quimiocinas utilizadas pelos merozoítos do *P. vivax* para invadir os glóbulos vermelhos) erradicar as infecções humanas pelo *P. vivax* (LIU *et al.*, 2010; 2014).

Existem cerca de 27 espécies de plasmódios que infectam primatas não humanos no mundo (Tabela 2). Nos macacos do Novo Mundo foram encontradas, até hoje, apenas duas espécies de plasmódios: o *Plasmodium brasilianum*, comumente encontrado em macacos de diversas espécies na floresta Amazônica, Panamá, Venezuela, Peru e na Mata Atlântica das regiões Sul e Sudeste brasileiras, e o *Plasmodium simium*, de ocorrência restrita, predominantemente em macacos bugios (*Alouatta guariba clamitans*) na Mata Atlântica das regiões Sul e Sudeste do Brasil, cujas primeiras descrições foram feitas por Fonseca (1951), seguido de estudos sobre esse parasito realizados por Deane (1992), e estudos mais atuais sobre a distribuição geográfica e detecção de infecções sanguíneas pela técnica de PCR (DUARTE *et al.*, 2008; YAMASAKI *et al.*, 2011, ABREU *et al.*, 2020).

Acreditava-se que o parasita que causava a malária humana, infectava apenas humanos, não tendo importância epidemiológica em relação a outros reservatórios (TAUIL *et al.*, 1985; CUROTTO *et al.*, 2012), contudo estudos vem mostrando que os parasitas símios não possuem especificidade de hospedeiro e são muito mais diversos do que os parasitas humanos, tendo em vista esses aspectos não podemos afirmar que plasmódios de símios só infectam símios e plasmódios de humanos, só infectam humanos, pois sabemos que o *P. simium* e o *P. brasilianum* não possuem distinção morfológica, genética ou imunológica com os *P. vivax* e *P. malariae*, respectivamente (COATNEY, 1987; DEANE, 1992; DUARTE *et al.*, 2006, 2008; LIU *et al.*, 2014; ALVARENGA *et al.* 2015; ASSIS *et al.*, 2016;).

Estudos atuais têm discutido calorosamente as diferenças e similaridades em diferentes marcadores moleculares na tentativa, nos níveis do DNA genômico e mitocondrial visando estabelecer a origem do *P. simium* (BRASIL *et al.*, 2017; RODRIGUES *et al.*, 2018), sendo que Alvarenga *et al.* (2018) propôs uma técnica de PCR que permite a diferenciação de *P. simium*, baseada em polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) no DNA mitocondrial.

Tabela 2. Plasmódios símios: espécie, hospedeiro e distribuição geográfica.

Região (nº)	Espécie	Subgênero	Hospedeiro (descrição)
Ásia (13)	<i>Plasmodium</i>	<i>Plasmodium</i>	Orangotango ( <i>Pongo pygmaeus</i> )
	<i>Plasmodium inui</i>	<i>Plasmodium</i>	Rhesus ( <i>Macaca fascicularis</i> )
	<i>Plasmodium</i>	<i>Plasmodium</i>	Rhesus ( <i>Macaca fascicularis</i> )
	<i>Plasmodium eylesi</i>	<i>Plasmodium</i>	Gibão ( <i>Hylobates lar</i> )
	<i>Plasmodium</i>	<i>Plasmodium</i>	Gibão ( <i>Hylobates leuciscus</i> )
	<i>Plasmodium</i>	<i>Plasmodium</i>	Gibão ( <i>Hylobates lar</i> )
	<i>Plasmodium</i>	<i>Plasmodium</i>	Gibão ( <i>Symphalangus syndactylus</i> )
	<i>Plasmodium fieldi</i>	<i>Plasmodium</i>	Rhesus ( <i>Macaca nemestrina</i> )
	<i>Plasmodium</i>	<i>Plasmodium</i>	Rhesus ( <i>Macaca sinica</i> )
	<i>Plasmodium</i>	<i>Plasmodium</i>	Rhesus ( <i>Macaca mulatta</i> )
	<i>Plasmodium</i>	<i>Plasmodium</i>	Rhesus ( <i>Macaca radiata</i> )
	<i>Plasmodium</i>	<i>Plasmodium</i>	Rhesus ( <i>Macaca fascicularis</i> )
	<i>Plasmodium</i>	<i>Plasmodium</i>	Orangotango ( <i>Pongo pygmaeus</i> )
África (10)	<i>Plasmodium</i>	<i>Plasmodium</i>	Mangaby ( <i>Cercocebus atys</i> )
	<i>Plasmodium</i>	<i>Plasmodium</i>	Chimpanzé ( <i>Pan troglodytes</i> )
	<i>Plasmodium</i>	<i>Plasmodium</i>	Chimpanzé ( <i>Pan troglodytes</i> )
	<i>Plasmodium</i>	<i>Plasmodium</i>	Chimpanzé ( <i>Pan troglodytes</i> )
	<i>Plasmodium</i>	<i>Laverania</i>	Chimpanzé ( <i>Pan troglodytes</i> )
	<i>Plasmodium</i>	<i>Laverania</i>	Chimpanzé ( <i>Pan troglodytes</i> )
	<i>Plasmodium</i>	<i>Laverania</i>	Chimpanzé ( <i>Pan troglodytes</i> )
	<i>Plasmodium</i>	<i>Laverania</i>	Gorila ( <i>Gorilla gorilla</i> )
	<i>Plasmodium adleri</i>	<i>Laverania</i>	Gorila ( <i>Gorilla gorilla</i> )
<i>Plasmodium</i>	<i>Laverania</i>	Gorila ( <i>Gorilla gorilla</i> )	
América (2)	<i>Plasmodium</i>	<i>Plasmodium</i>	Macaco inglês ( <i>Cacajao calvus</i> )
	<i>Plasmodium</i>	<i>Plasmodium</i>	Bugio ( <i>Alouatta fusca</i> )
Madagascar	<i>Plasmodium</i>	<i>Vinckeia</i>	Lêmure ( <i>Lemur collaris</i> )
	<i>Plasmodium</i>	<i>Vinckeia</i>	Lêmure ( <i>Lemur fulvus rufus</i> )

Fonte: Martinelli e Culleton, 2018

## 1.6 TÉCNICAS DE DETECÇÃO (SANGUE, URINA E FEZES)

O diagnóstico da malária pelo método de esfregaço de gota espessa, que realiza a identificação dos parasitos presentes no sangue periférico do paciente ainda é amplamente utilizado e adotado como padrão ouro no programa de controle da malária, tendo em vista seu baixo custo e considerando também a infraestrutura das regiões em que a malária se apresenta endêmica, essa técnica acaba se mostrando a melhor opção (COSTA *et al.*, 2008; FIGUEIREDO *et al.*, 2018). Porém, esta técnica pode apresentar resultados falso negativo, a depender dos níveis de parasitemia, da existência de infecções mistas e da habilidade do microscopista (VIANA *et al.*, 2010). Contudo, identificar métodos diagnósticos mais precisos e rápidos é uma das maiores preocupações dos pesquisadores e profissionais que trabalham com a malária, considerando o fato de ainda não existir um protocolo padrão para diagnósticos sorológicos e moleculares que possuam uma alta especificidade (FIGUEIREDO *et al.*, 2018).

A detecção de plasmódios tem sido realizada por meio da análise de amostras de sangue humano ou em amostras de sangue de hospedeiros animais, contudo se trata de um método invasivo, que possui limitações em situações de campo, principalmente em estudos epidemiológicos que envolvam animais silvestres. Dentre os fatores de risco estão ferimentos e/ou morte do animal no processo de captura, anestesia e manejo e o stress causado até o momento de soltura. Além de ser mais difícil a detecção do *Plasmodium*, devido as baixas parasitemias que geralmente acomete os macacos (COATNEY, 1971), e considerado a limitação por se obter para análise uma única e pequena amostra de sangue do macaco. Mesmo diante destas dificuldades os estudos realizados em macacos silvestres no Brasil até o momento agregam importantes conhecimentos sobre a malária símia (DEANE, 1992; DUARTE *et al.*, 2006; DUARTE *et al.*, 2008; YAMASAKI *et al.*, 2011; ASSIS *et al.*, 2016; RODRIGUES *et al.*, 2017; BRASIL *et al.*, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2018; BUERY *et al.*, 2018; ABREU *et al.*, 2019; MONTEIRO *et al.*, 2020).

Diante deste cenário, novas técnicas mais avançadas que permitem um diagnóstico mais sensível e específico da malária vem sendo desenvolvidas, baseadas em técnicas imunocromatográficas (que partem da detecção de antígenos, a partir de anticorpos monoclonais) e técnicas moleculares, em especial a PCR (OSORIO *et al.*,

2018), que consiste na replicação do material genético celular, através da enzima DNA-Polimerase, esta enzima tem a função de sintetizar uma sequência complementar de DNA, a partir de “primers” ou iniciadores específicos que se ligam em uma das fitas, limitando a sequência a ser amplificada milhões de vezes (VALONES *et al.*, 2009).

Tendo em vista as dificuldades na obtenção de amostras de sangue em situações específicas, seja em animais ou em humanos, estudos com urina e fezes tem avançado, podendo se tornar um substituto eficaz e mais seguro em estudos epidemiológicos, visto que são técnicas não invasivas para a coleta do material.

A detecção de plasmódios por meio das fezes está alicerçada em estudos que demonstraram a presença de DNA de plasmódio nas fezes, sendo constatado que esse DNA era oriundo das formas parasitárias do fígado. O desenvolvimento pré-eritrocítico na malária em mamíferos ocorre no fígado, onde é possível que os parasitas cheguem até as fezes através da bile (KAWAI *et al.*, 2014; SIREGAR *et al.*, 2015). Em alguns casos o DNA do parasita em estágios sanguíneos pode se apresentar nas fezes de animais infectados no ciclo eritrocítico, a forma parasitária eritrocítica pode ocorrer após algum sangramento intestinal, diferente da detecção do DNA na urina, que provavelmente provem de parasitas circulantes livre nas células sanguíneas periféricas (ABKALLO *et al.*, 2014; SIREGAR *et al.*, 2015; DIXIT *et al.*, 2018).

Diversos estudos realizados com macacos da África e da Ásia rastrearam com êxito o DNA de plasmódios em fezes utilizando diferentes métodos como a amplificação de sequências do citocromo B do parasita (cyt b) ou de 18S rRNA do DNA fecal de símios oferecendo uma alternativa não invasiva factível e com resultados satisfatórios para trabalhos de campo (JIRKU *et al.*, 2012; KAWAI *et al.*, 2012, 2014; LIU *et al.*, 2010, 2014; SIREGAR *et al.*, 2015; DIXIT *et al.*, 2018).

Segundo Jirku *et al.* (2012), as fezes podem ser utilizadas com êxito para o diagnóstico de malária, mostrando resultados satisfatórios e, em algumas situações, substituir as coletas de sangue.

Mesmo a PCR de urina e fezes se mostrando menos sensível para a detecção do DNA de *Plasmodium* se comparado com a sensibilidade da PCR sanguínea, esta

técnica não invasiva tem uma imensa vantagem por ser mais fácil e acessível. Nessa perspectiva, se o DNA pode ser encontrado em meio ao material fecal de macacos selvagens, isso significa um grande avanço para pesquisas epidemiológicas de campo e para estudos de malária zoonótica (KAWAI *et al.*, 2014).

## **2. JUSTIFICATIVA**

Tendo em vista que o atual cenário epidemiológico da malária pode mudar, e áreas de malária residual podem apresentar dificuldades para efetuar o controle de casos em uma situação de potencial transmissão zoonótica, envolvendo macacos, é relevante manter os conhecimentos atualizados sobre as técnicas de detecção de *Plasmodium* em símios e a necessidade de discussão e aplicação de metodologias alternativas mais avançada e de mais fácil aplicabilidade para o estudo, monitoramento e vigilância dos reservatórios símios.

A presente monografia pretende apresentar uma revisão e atualização sobre a detecção de plasmódios por método não invasivo, apresentar os métodos mais comumente utilizados e discutir a importância e viabilidade de adoção de novas metodologias que auxiliem as atividades de vigilância e controle da malária.

## **3. OBJETIVOS**

### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Realizar uma revisão bibliográfica e atualização das principais técnicas existentes de detecção de *Plasmodium* em fezes de primatas não humanos descritas na literatura, conhecer e aplicar os métodos de detecção de plasmódios em fezes de PNH e com isso, propor uma discussão sobre o uso da técnica alternativa, seus benefícios e limitações, bem como sua utilização como técnica auxiliar nas atividades de vigilância e controle.

### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar pesquisa bibliográfica para verificação do potencial do uso de técnicas não invasivas como uma alternativa para o diagnóstico da malária símia.

Realizar técnica de extração de DNA de fezes de primatas não humanos (PNH), por meio de kit específico;

Realizar técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), de acordo com protocolo utilizados no laboratório, para detecção de DNA do hospedeiro e DNA de *Plasmodium* nas fezes de primatas não humanos (PCR convencional e PCR em Tempo Real).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 DELINEAMENTO DA REVISÃO

No presente estudo foi realizada uma pesquisa bibliográfica utilizando as bases de dados da *SciELO*, *Lilacs*, PubMed, MedLine e na Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), de artigos e livros que descrevam as técnicas de detecção de *Plasmodium* em fezes de primatas não humanos. O levantamento dos artigos foi realizado no segundo semestre de 2020. Foi selecionado um total de 46 artigos publicados entre os anos de 1951 a 2021 em inglês e português, os critérios para seleção dos artigos foram primeiramente a avaliação dos títulos e dos resumos (abstracts), após foram analisados os textos completos, observando se atendem os objetivos do estudo e os artigos selecionados apresentaram menção explícita sobre as técnicas de detecção de *Plasmodium*, fezes e/ou menção explícita sobre malária e/ou malária símia.

Foram utilizadas as seguintes palavras-chave: Malária, *Plasmodium*, Reação em cadeia da polimerase, Fezes, Primatas e *Anopheles*.

## 4.2 PRÁTICA DAS TÉCNICAS ASSOCIADAS

### 4.2.1 Extração de DNA

As amostras testadas foram provenientes de pesquisas da orientadora, Dra. Ana Maria Duarte (projeto FAPESP 2014/10.919-4). As amostras estavam conservadas em álcool 70% ou RNAlater (Qiagen) (SIREGAR *et al.*, 2015).

A extração de DNA foi realizada por meio do “QIAamp Stool kit” (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de fezes foram previamente lisadas, em agitação intermitente “overnight”, com tampão ASL (kit) de acordo procedimento descrito em Siregar *et al.* (2015).

E também foi utilizado o “ZymoBIOMCS DNA mini prep Kit” (indicado para extração de DNA de fezes) (Zymo Research), como um kit alternativo, uma vez que o kit Qiagen saiu de linha.

### 4.2.2 PCR para detecção de DNA de macacos nas amostras de fezes

Cada amostra de DNA de fezes obtida foi testada para verificação da presença do hospedeiro (confirmação). Para tanto, um par de primers foi desenhado para amplificação de um fragmento do gene de citocromo B (cyt b), dos gêneros *Alouatta* e *Brachyteles*, com 580 pares de bases (bp) (“primers” desenhados pela Dra. Licia Natal Fernandes, Lab. Protozoologia):

**PF ALBr** (frente): 5 'TCAACTGCYTTCTCCTCAGTCGC 3'

**PR ALBr** (reverso): 5 'GGTCGGTTAGAAGGTCAGGTG 3'

A amplificação de PCR foi realizada em 25 µl de volume de reação usando 5,0 µl de amostra de DNA, 50 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de mistura de dNTP, 10 mM para o iniciador PF Al Br, 10 mM para o iniciador PR Al Br, 5 U / µl de Taq (Platinum/Invitrogen) e água ultrapura para completar a solução final.

As condições de PCR foram: desnaturação inicial a 94 ° C por 2 min, seguida por 35 ciclos (94 ° C por 30 s, 60 ° C por 30 s e 72 ° C por 30 s), extensão final a 72 ° C por 10 min. O equipamento utilizado foi Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems).

#### 4.2.3 PCR para detecção de DNA de macacos nas amostras de fezes e detecção de DNA de plasmódio

Foram realizados dois testes para a detecção de plasmódios, sendo reações de PCR convencional e PCR em tempo real, de acordo com protocolos já utilizados nas pesquisas da Dra. Ana Maria Duarte.

PCR tempo real em real para amplificação de 18SrNA de *Plasmodium* no sistema TaqMan®, Protocolo “Bickersmith”

O protocolo foi descrito por Bickersmith *et al.* (2015), para amplificação de fragmentos 18S *ssrRNA* gênero-plasmódio com aproximadamente 100 pares de base (pb), de *P. vivax* e *P. falciparum*. Essa região específica é escolhida por conter regiões altamente conservadas e variáveis do DNA. As amostras de DNA foram testadas separadamente com cada par de primers e sondas. Os primers e sondas para *P. malariae* foram descritos por Rougemont *et al.* (2004), mas foram utilizadas as mesmas condições de reação descritas abaixo.

Essa reação foi realizada em placa, especificamente, e consistiu de 5,0 µl de DNA, e 12,5µl de TaqMan Universal Master Mix II, com UNG (Applied Biosystems) (2X), 0,75 µl de Plasm2-R e para cada sonda 0,25 µl (10uM) e “primer” 0,75 µl (10uM), respectivamente, água destilada para completar o volume de 25µl. O equipamento utilizado para esta reação foi o Step One Plus (Applied Biosystems), no Laboratório de Protozoologia, IMT/USP. Utilizando os parâmetros de 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, 50 ciclos de 95°C por 15 min, e 60°C por 1 min.

Nested-PCR para amplificação de fragmento de DNA mitocondrial (*cyt b*) de *Plasmodium*, Protocolo “Siregar”

O protocolo foi descrito por Siregar *et al.*, (2015). A reação para amplificação de fragmento de citocromo b (*cyt b*) utilizou os primers **PfF3700 /PfR4615**, que produziu um fragmento de 915 pb na primeira reação. A segunda reação de PCR utilizou o

primeiro produto em conjunto com **PfF 3700 / PFr4102**, e produziu um fragmento de **402 pb**. A primeira reação de PCR foi feita com 2 µl de DNA, enquanto a segunda foi executada com 1 µl de produto da primeira reação.

A reação consistiu em duas etapas, a primeira, com 14ul de DNA, 5 ul de água destilada, 2,5 de tampão, 1ul de cloreto, 0,25ul de dNTP mix, 1 ul de primer Pff 3700, 1 ul de primer PFr 4615 e 0,25 ul de Taq. Na segunda etapa são utilizados 2 ul de DNA, 17 ul de água, 2,5ul de tampão, 1 ul de cloreto, 0,25ul de dNTP mix, 1ul de primer Pff 3700, 1ul de primer PFr 4102 e 0,25ul de Taq. O equipamento utilizado para esta reação de PCR foi o Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems) no Laboratório de Protozoologia, IMT/USP. Utilizando os parâmetros de 94°C por 5 minutos, 94°C por 15 segundos, 50°C por 15 segundos, 72°C por 45 segundos e 72°C por 5 minutos em um ciclo de 30 vezes.

Gel de Eletroforese para visualização dos produtos amplificados nas reações de PCR

A eletroforese foi realizada em gel de agarose (Sigma), 2,0% (p/v) contendo 0,5 µl/ml de brometo de etídio (p/v) em tampão TBE 1x (Tris borato 0,09M; EDTA 0,0002M) utilizando Electrophoresis Power Supply – EPS 200 (Pharmacia Biotech) como fonte a uma voltagem constante de 90 V Para visualização dos produtos amplificados foi utilizada solução de Brometo de Etídeo. Foi utilizado marcador de peso molecular de 50 bp (Fermentas).

Todas as medidas de proteção e equipamentos de proteção individual (EPIs) foram utilizadas durante a realização dos experimentos.

## **5. RESULTADOS**

### **5.1 ARTIGOS AGREGADOS PARA A REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Após a escolha dos 46 artigos, os mesmos foram organizados por ordem cronológica. Estes artigos estão demonstrados na Tabela 3.

Tabela 3. Principais artigos consultados para elaboração da revisão, com enfoque na detecção de plasmódios nas fezes de primatas não humanos.

Art. n.	Título	Autor/Ano
1	Plasmódio de primata do Brasil.	FONSECA, 1951
2	The simian malarias: zoonoses, anthroponoses, or both?	COATNEY, 1971
3	A malária no Brasil.	TAUIL, 1985
4	Simian Malaria in Brazil.	DEANE, 1992
5	Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: Helicobacter pylori model.	MONTEIRO <i>et al.</i> , 1997
6	Malaria vectors in the Brazilian Amazon: Anopheles of the subgenus <i>Nyssorhynchus</i> .	TADEI, 2000
7	Widespread occurrence of antibodies against circumsporozoite protein and against blood forms of <i>Plasmodium vivax</i> , <i>P. falciparum</i> and <i>P. malariae</i> in Brazilian wild monkeys.	DUARTE <i>et al.</i> , 2006
8	Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária.	PIMENTEL, 2007
9	Natural <i>Plasmodium</i> infections in Brazilian wild monkeys: Reservoirs for human infections?.	DUARTE <i>et al.</i> , 2008
10	Aspectos epidemiológicos de malária autóctone na Mata Atlântica, litoral norte, Estado de São Paulo, 1985 – 2006.	MARQUES <i>et al.</i> , 2008
11	Molecular diagnosing of malaria in a tertiary care center in the Brazilian Amazon region.	COSTA <i>et al.</i> , 2008
12	Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review.	VALONES <i>et al.</i> , 2009
13	Key gaps in the knowledge of <i>Plasmodium vivax</i> , a neglected human malaria parasite.	MUELLER <i>et al.</i> , 2009
14	<i>Plasmodium knowlesi</i> Malaria in Humans Is Widely Distributed and Potentially Life Threatening.	COX- SINGH <i>et al.</i> , 2008
15	African great apes are natural hosts of multiple related malaria species, including <i>Plasmodium falciparum</i> .	PRUGNOLLE <i>et al.</i> , 2009
16	A New Malaria Agent in African Hominids.	OLLOMO <i>et al.</i> , 2009
17	Comparação de dois métodos de obtenção de DNA como protocolos alternativos para a detecção de parasitas da malária humana por nested PCR.	VIANA <i>et al.</i> , 2010
18	Origin of the human malaria parasite <i>Plasmodium falciparum</i> in gorillas.	LIU <i>et al.</i> , 2010

19	Métodos para avaliação da atividade antimalárica nas diferentes fases do ciclo de vida do <i>Plasmodium</i> .	NOGUEIRA <i>et al.</i> , 2010
20	Malária grave por <i>Plasmodium falciparum</i> .	GOMES <i>et al.</i> , 2011
21	Detection of etiological agents of malaria in howler monkeys from Atlantic Forests, rescued in regions of São Paulo city, Brazil.	YAMASAKI <i>et al.</i> , 2011
22	Detection of <i>Plasmodium</i> spp. in Human Feces.	JIRKU <i>et al.</i> , 2012
23	Malária em mamíferos silvestres.	CUROTTO <i>et al.</i> , 2012
24	Age-related effects on malaria parasite infection in wild chimpanzés.	DE NYS <i>et al.</i> , 2013
25	African origin of the malaria parasite <i>Plasmodium vivax</i> .	LIU <i>et al.</i> , 2014
26	Detection of <i>Plasmodium knowlesi</i> DNA in the urine and faeces of a Japanese macaque ( <i>Macaca fuscata</i> ) over the course of an experimentally induced infection.	KAWAI <i>et al.</i> , 2014
27	Simian malaria in the Brazilian Atlantic forest: first description of natural infection of capuchin monkeys (Cebinae subfamily) by <i>Plasmodium simium</i> .	ALVARENGA <i>et al.</i> , 2015
28	Diversity of malaria parasites in great apes in Gabon.	BOUDENGA <i>et al.</i> , 2015
29	Non-invasive surveillance for <i>Plasmodium</i> in reservoir macaque species.	SIREGAR <i>et al.</i> , 2015
30	Detection of <i>Plasmodium</i> in faeces of the New World primate <i>Alouatta clamitans</i> .	ASSIS <i>et al.</i> , 2016
31	Non-human primate malaria parasites: out of the forest and into the laboratory.	MARTINELLI, 2016
32	Outbreak of human malaria caused by <i>Plasmodium simium</i> in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation.	BRASIL <i>et al.</i> , 2017
33	Wild bonobos host geographically restricted malaria parasites including a putative new <i>Laverania</i> species.	LIU <i>et al.</i> , 2017
34	Malaria pathogenesis.	MILNER, 2018
35	Human migration and the spread of malaria parasites to the New World.	RODRIGUES <i>et al.</i> , 2018
36	Ecological characterisation and infection of Anophelines (Diptera: Culicidae) of the Atlantic Forest in the southeast of Brazil over a 10 year period: has the behaviour of the autochthonous malaria vector changed?	BUERY <i>et al.</i> , 2018
37	Serological and molecular techniques applied for identification of <i>Plasmodium</i> spp. in blood samples from nonhuman primates.	FIGUEIREDO <i>et al.</i> , 2018

38	A scoping review on the field validation and implementation of rapid diagnostic tests for vector-borne and other infectious diseases of poverty in urban areas.	OSORIO <i>et al.</i> , 2018
39	Reinvestigating the status of malaria parasite ( <i>Plasmodium</i> sp.) in Indian non-human primates.	DIXIT <i>et al.</i> , 2018
40	An assay for the identification of <i>Plasmodium simium</i> infection for diagnosis of zoonotic malaria in the Brazilian Atlantic Forest.	ALVARENGA <i>et al.</i> , 2018
41	Investigating zoonotic infection barriers to ape <i>Plasmodium</i> parasites using faecal DNA analysis.	LOY <i>et al.</i> , 2018
42	<i>Plasmodium knowlesi</i> malaria: current research perspectives.	AMIR <i>et al.</i> , 2018
43	Prevalence of <i>Plasmodium</i> parasites in non-human primates and mosquitoes in areas with different degrees of fragmentation in Colombia.	RONDON <i>et al.</i> , 2019
44	Howler monkeys are the reservoir of malarial parasites causing zoonotic infections in the Atlantic forest of Rio de Janeiro.	ABREU <i>et al.</i> , 2019
45	Naturally Acquired Humoral Immunity against Malaria Parasites in Non-Human Primates from the Brazilian Amazon, Cerrado and Atlantic Forest.	MONTEIRO <i>et al.</i> , 2020
46	Atlantic Forest Malaria: A Review of More than 20 Years of Epidemiological Investigation.	BUERY <i>et al.</i> , 2021

## 5.2 RESULTADOS DAS REAÇÕES DE PCR PARA DETECÇÃO DE PLASMODIUM NAS FEZES.

Para o treinamento, foram realizadas extrações de DNA de trinta e cinco amostras de fezes de macacos de Bugios (*Alouatta guariba clamitans*), oriundos do Parque Estadual da Cantareira e do Centro de Manejo da Animais Silvestres, do Departamento de Parques e Áreas Verdes de São Paulo, Prefeitura Municipal de São Paulo (CEMACAS/PMSP), de pesquisa coordenada pela Dra. Ana Maria (Projeto FAPESP 2014/10.919-4).

Trinta amostras foram submetidas à extração com o “Qiagen kit”, kit já padronizado e utilizado, e cinco amostras com o “Zymo Kit”, para verificar a qualidade de DNA obtido e a possível adoção desse kit.

Todas as amostras foram submetidas à reação para a identificação/confirmação do DNA do hospedeiro, sendo que todas foram positivas quanto a presença de DNA do hospedeiro.

Na figura 1 estão demonstradas as bandas amplificadas de cinco amostras com 580 pb correspondentes ao cyt b de *Alouatta*. Essas amostras foram extraídas com o Zymo kit” e permitiu verificar que o apresentou kit apresentou bom desempenho.

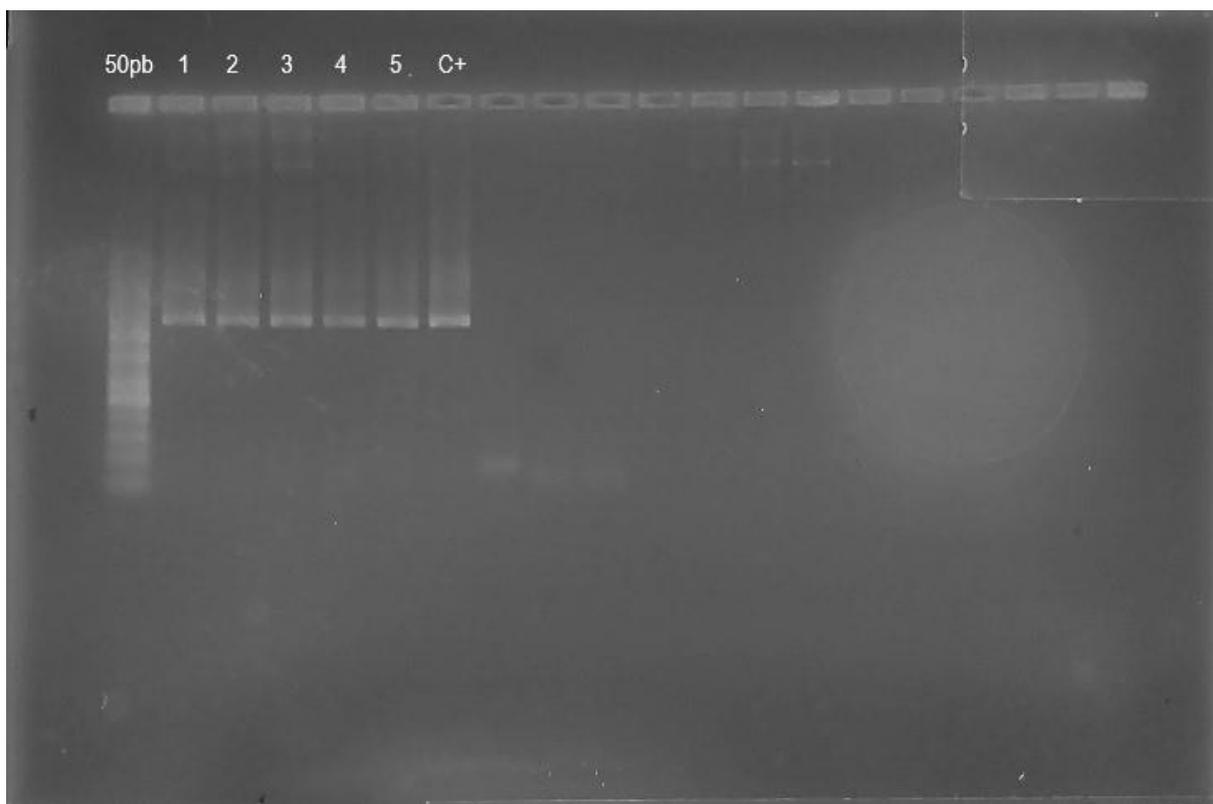


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose a 2%. Técnica de PCR para amplificação de fragmentos de cyt b de *Alouatta g. clamitans* (580 pb) em fezes de bugios do Pq. Estadual da Cantareira, na imagem descritas como 1, 2, 3, 4 e 5 respectivamente. C+: Controle positivo de sangue de bugio (amostra de sangue) e Br: controle negativo (mix com todos os reagentes, sem amostra de DNA). Padrão de peso molecular: 50 pares de bases (pb). DNA extraído com o Zymo kit

Posteriormente, as amostras de DNA foram submetidas ao teste para detecção de plasmódios: técnica PCR tempo real (Sistema TaqMan) para amplificação de 18S rRNA de *Plasmodium*. As trinta amostras extraídas com o “Qiagen kit” apresentaram resultados negativos para *P. vivax*, *P. malariae* e *P. falciparum*.

Os resultados das reações para detecção de plasmódio nas amostras extraídas com o “Zymo Kit” podem ser observados nas figuras 2 e 3, PCR TaqMan para *P. vivax* e *P. malariae*, respectivamente.

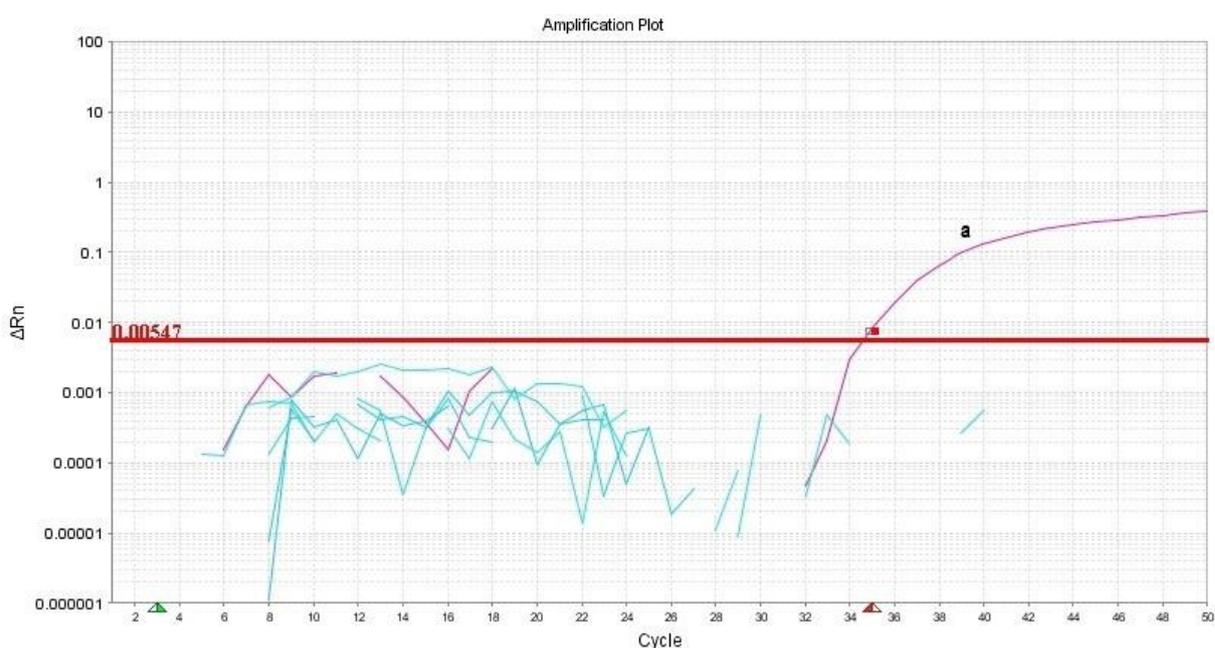


Figura 2. PCR em tempo real de fezes de *Alouatta guariba clamitans* para detecção de *P. vivax*. Reação para amplificação do fragmento do gene 18S rRNA de *P. vivax* em amostras de fezes cedidas pelo DEPAVE. A curva (a), a primeira a ficar ascendente, representa o controle positivo para *Plasmodium vivax*. O controle negativo e as amostras negativas ficaram abaixo do limiar de reatividade (linha horizontal).

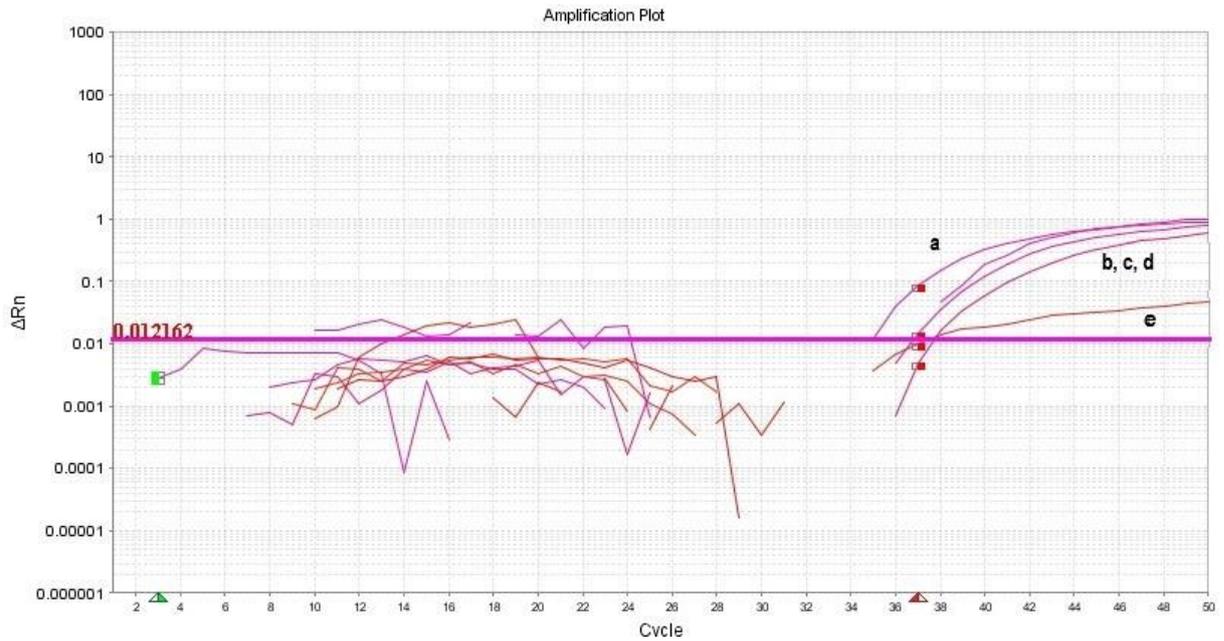


Figura 3. PCR em tempo real de fezes de *Alouatta guariba clamitans* para detecção de *P. malariae*, reação para amplificação do fragmento do gene 18S rRNA de *P. malariae* em amostras de fezes cedidas pelo DEPAVE. A curva (a), a primeira a ficar ascendente, representa o controle positivo para *P. malariae*. As curvas (b, c, d), são controles positivos usados na reação. A curva (e), amostra “3”, positiva para *P. malariae*. O controle negativo e as amostras negativas ficaram abaixo do limiar de reatividade (linha horizontal).

Na figura 4 é possível observar algumas amostras DNA de fezes testadas na reação para amplificação de fragmento de cyt b de plasmódio, na qual se visualiza uma amostra positiva e o controle positivo com o tamanho de 402 pb.

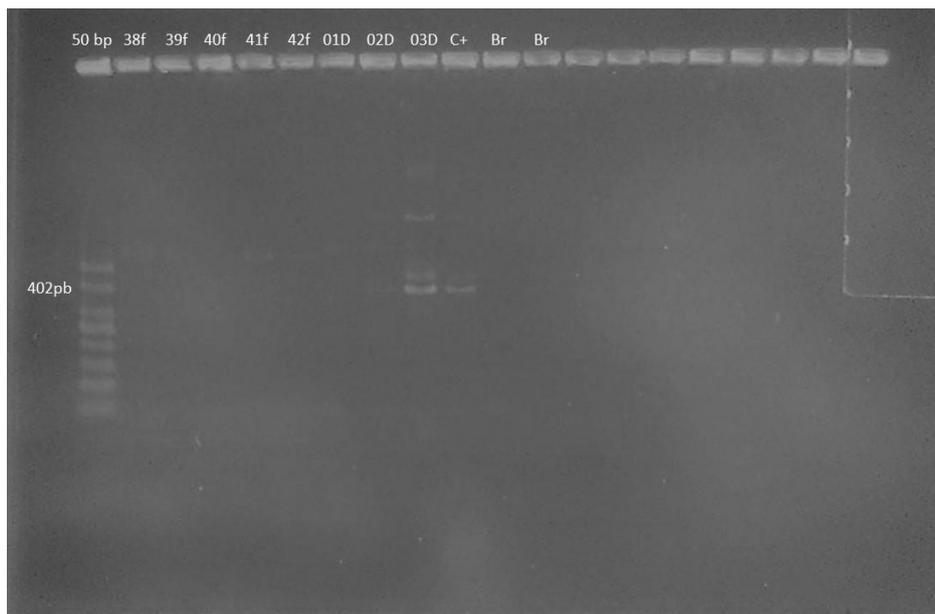


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose a 2%. Técnica de PCR para amplificação de fragmentos de cyt b de gênero *Plasmodium* (402pb) em algumas amostras de DNA de fezes de bugios do Pq. Estadual da Cantareira, Amostra positiva 3D. C+: Controle positivo de plasmódio Parelheiros (amostra de sangue de bugio positiva) e Br: controle negativo (mix com todos os reagentes, sem amostra de DNA). Padrão de peso molecular: 50 pares de bases (pb). Amostras 01, 02 e 03 extraídas com o Zymo kit.

O produto obtido na reação de PCR para amplificação de fragmento cyt b foi purificado e submetido a reação de sequenciamento para identificação molecular de plasmódios, porém não houve tempo para acompanhar essa etapa.

Ao finalizar as práticas laboratoriais, fui convidada a acompanhar uma equipe da Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) em coleta culicídeos, em busca de vetores da Febre Amarela e pude conhecer a técnica de coleta com a armadilha CDC, que é amplamente utilizada em coletas de anofelinos também.

## 6. DISCUSSÃO

A prática laboratorial das técnicas permitiu observar que é possível identificar a origem das fezes, por meio da PCR de detecção de DNA do hospedeiro, e identificar infecção por plasmódios, por meio de duas técnicas sensíveis e específicas e utilizando dois marcadores tradicionalmente usados, 18S rRNA e cyt b. O kit Zymo Research foi testado, seguindo as orientações do fabricante, como alternativa ao kit anteriormente utilizado (Qiagen) e apresentou bom resultado, contudo esses kits geralmente são para 50 extrações e o preço é bem caro, em comparação aos kits de extração mais comuns.

Após a realização deste trabalho, foi possível identificar as principais vantagens e desvantagens da utilização de fezes de primatas não humanos para detecção de DNA de Plasmódios que infectam macacos por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Dentre as principais limitações observadas na utilização de fezes para detecção de *Plasmodium* estão a presença de bactérias e produtos da alimentação que podem ser potenciais inibidores da amplificação, outro ponto negativo é a menor sensibilidade em amostras fecais, se comparado com amostras de sangue, isso porque as amostras fecais possuem uma carga parasitária menor que amostras sanguíneas, tendo em vista que o ciclo parasitário ocorre no fígado e hemácias. A detecção de DNA do parasita pode se mostrar menos eficaz pela degradação do mesmo onde encontramos fragmentos deste, a ausência de uma ligação explícita entre parasitemia do indivíduo e a presença do parasita nas amostras fecais também dificulta a utilização das fezes como método de detecção do *Plasmodium*. Tendo isso em vista, torna-se necessária a utilização dos métodos de extração de DNA robustos e a amplificação de segmentos mais curtos e específicos do mesmo. (MONTEIRO *et al.*, 1997; LIU *et al.*, 2014; SIREGAR *et al.*, 2015; RONDON *et al.*, 2019).

Mesmo com as dificuldades relatadas sobre a degradação do DNA em materiais biológicos dessa natureza, pode-se utilizar das sequências mitocondriais para detectar o parasita nas fezes, esse tipo de técnica apresenta vantagens pois o DNA mitocondrial possui múltiplas cópias no organismo do parasita, diferente do DNA genômico e quando escolhido corretamente porções de aproximadamente 200pb são

capazes de informações filogenéticas substanciais para identificação das espécies de *Plasmodium*. Essa técnica já foi capaz de identificar ao menos 6 espécies distintas do parasita. O fato de ser uma técnica não invasiva, onde não é necessário submeter o animal a ser examinado, a captura e sedação, tornando-se, portanto, um método de custo imensamente mais baixo para as atividades de campo, e por outro lado, a confiabilidade dos resultados obtidos, torna esse método extremamente viável. Esta técnica também contribui positivamente para pesquisas epidemiológicas, considerando o fato de técnicas moleculares possuírem uma sensibilidade significativamente maior, comparada aos esfregaços sanguíneos (JIRKU *et al.*, 2012; DE NYS *et al.*, 2012; KAWAI *et al.*, 2014; BOUDENGA *et al.*, 2015; SIREGAR *et al.*, 2015; MONTEIRO *et al.*, 2020).

Contudo, estudos recentes realizados no Brasil e na Colômbia utilizando técnicas de detecção de *Plasmodium* em fezes de primatas não humanos, mostraram a capacidade da utilização deste método para detecção e monitorização de variações genéticas e da dinâmica do parasita, além de demonstrar a importância da técnica para compreendermos de maneira mais profunda a prevalência, dinâmica de transmissão e diversidade deste parasita (ASSIS *et al.*, 2016; RONDON *et al.*, 2019).

Alguns dos trabalhos de suma importância utilizando esta vertente, foi realizado na África, no qual foram analisados um número expressivo de amostras de fezes de chimpanzés, gorilas e bonobos, sendo possível nestes estudos a identificação de espécies do subgênero *Laverania* e a discussão da origem de *P. falciparum* que infecta humanos *Laverania* (LIU *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2017).

Prugnolle e colaboradores (2009), afirmam que a relação cada vez mais estreita entre humanos e os primatas não humanos, seja por desmatamento, invasão das florestas e exploração da madeira, tem tornado mais frágil a troca de patógenos humanos para símios e de símios para humanos. A perda de áreas de mata verde, também pode acarretar desequilíbrios entre as populações de vetores e dos hospedeiros naturais, podendo assim, alterar toda a dinâmica da doença (BUERY *et al.*, 2021).

Para entendermos a fundo a origem, evolução, transmissão e diversidade deste patógeno nos humanos, em âmbito de saúde pública, necessitamos estudá-los para ampliar a compreensão de suas dinâmicas nos seus hospedeiros e vetores naturais, bem como contribuindo na possível descoberta de novas espécies de *Plasmodium*

que futuramente possam se tornar capazes de infectar humanos (DIXIT *et al.*, 2018). Com uma melhor compreensão da genética das espécies de *Plasmodium*, seremos capazes de desenvolver medidas preventivas mais eficazes de controle e até vacinas (BUERY *et al.*, 2021).

Uma vez que a análise molecular para detecção de *Plasmodium* em amostras fecais só se torna possível pois o desenvolvimento pré-eritrocítico assintomático do patógeno ocorre no fígado (órgão também responsável por degradar e remover os glóbulos vermelhos infectados da circulação sanguínea), onde o parasito pode ser então expelido pela bile à luz do intestino e atingir as fezes, se torna possível a detecção pré-eritrocítica do patógeno, ou seja, podendo evidenciar o parasito antes da infecção eritrocítica. Neste cenário é possível inferir que níveis mais altos de parasitemia estão associados a taxas de detecção de *Plasmodium* mais altas em amostras fecais (DIXIT *et al.*, 2018; LOY *et al.*, 2018).

As perspectivas apontadas pelo uso da técnica não invasiva podem contribuir no manejo dos desafios associados às ações de controle e vigilância em áreas de floresta levando a melhor compreensão de situações potenciais de zoonoses envolvendo a circulação dos plasmódios entre reservatórios símios, em sinergia com a transmissão silenciosa humana, envolvendo portadores assintomáticos.

Buery *et al.* (2021) discutem que “uma vez que a eliminação se tornasse uma realidade, manchas da doença sustentadas por variáveis incomuns, como reservatórios não humanos, podem se tornar santuários de transmissão. As áreas de malária residual podem atuar como uma fonte para reintroduzir a doença a longo prazo. Por isso é necessário entender todos os elementos envolvidos nesses cenários de transmissão incomum e desenhar estratégias específicas para sua contenção. Para combater uma doença complexa como malária, é de extrema importância não subestimar sua capacidade de resistir à eliminação”.

Os laboratórios de saúde pública que estejam de algum modo envolvidos nas atividades de vigilância deverão ser estruturados, da melhor forma possível para a realização de técnicas moleculares com diferentes níveis de complexidade, e capacitação contínua de seus técnicos nas atividades de campo e laboratoriais, e isso envolve fortes políticas e gestão para atender essas necessidades.

A necessidade de rastreamento das doenças e parasitas nos animais silvestres é de nossa responsabilidade, temos atualmente nos deparado com situações nas quais a adoção dessa atividade poderá mitigar situações graves de doença e morte de pessoas e animais, como por exemplo, a epizootia da Febre Amarela e o próprio COVID-19. Quanto mais nos aproximamos e convivemos com a vida selvagem, mais precisaremos estudá-la e cuidá-la. E tendo a possibilidade de explorar os parasitas em seus hospedeiros naturais, teremos a possibilidade de melhorar a compreensão da relação parasito – humano, conseqüentemente isso terá seu reflexo na saúde pública, podendo ter reflexos positivos no controle da malária residual.

## **7. CONCLUSÕES**

Foi possível verificar o potencial do uso de técnicas não invasivas como uma alternativa para o diagnóstico da malária símia, levando em conta a facilidade na aquisição das amostras biológicas; e o fato de estar sendo adotada nos países onde a malária residual possa estar relacionada com a malária símia e isso possa ser um problema no controle da malária (África, Sudeste asiático e Índia).

O custo ainda será um desafio a ser superado pois as técnicas de PCR ainda são caras, considerando que essas técnicas venham a ser adotadas nas atividades de vigilância do serviço de saúde.

Estudos adicionais sobre essa vertente poderão ampliar os conhecimentos da malária símia e poderão elucidar a circulação de plasmódios em áreas de Mata Atlântica.

Diante de todas as observações apresentadas, podemos concluir que a técnica de PCR utilizando DNA obtido de fezes pode trazer grandes benefícios e avanços nos estudos de malária símia e humana, mostrando-se indispensável para confirmação zoonótica e análises de perfil epidemiológico da doença.

## 8. REFERÊNCIAS

Abreu, FVS *et al.* Howler monkeys are the reservoir of malarial parasites causing zoonotic infections in the Atlantic forest of Rio de Janeiro. PLoS Negl. Trop. Dis. Vol. 13, dec. 2019.

Alvarenga, DAM *et al.* Simian malaria in the Brazilian Atlantic forest: first description of natural infection of capuchin monkeys (Cebinae subfamily) by *Plasmodium simium*. Malaria Journal, Vol. 14,81, feb. 2015.

Alvarenga, DAM *et al.* An assay for the identification of *Plasmodium simium* infection for diagnosis of zoonotic malaria in the Brazilian Atlantic Forest. Sci Rep. Vol. 8,8 jan. 2018.

Amir, A *et al.* *Plasmodium knowlesi* malaria: current research perspectives. Infect. Drug. Resist., Vol. 11, aug, 2018.

Assis, GMP *et al.* Detection of *Plasmodium* in faeces of the New World primate *Alouatta clamitans*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 111, sep. 2016.

Boudenga, L *et al.* Diversity of malaria parasites in great apes in Gabon. Malaria Journal. Vol. 14,111. 2015.

Brasil, P *et al.* Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. Lancet Glob. Health. Vol. 5, 2017.

Buery, JC *et al.* Ecological characterisation and infection of Anophelines (Diptera: Culicidae) of the Atlantic Forest in the southeast of Brazil over a 10 year period: has the behaviour of the autochthonous malaria vector changed?. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Vol. 113, 2018.

Buery, JC *et al.* Atlantic Forest Malaria: A Review of More than 20 Years of Epidemiological Investigation. *Microorganisms* vol. 9,1 132. jan. 2021

Coatney, GR. The simian malarias: zoonoses, anthroponoses, or both?. *Am J Trop Med Hyg.* nov. 1971.

Costa, MRF *et al.* Molecular diagnosing of malaria in a tertiary care center in the Brazilian Amazon region. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Uberaba, Vol. 41, aug. 2008.

Curotto, SM *et al.* Malária em mamíferos selvagens. *Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR*, Umuarama, Vol. 15, jun. 2012.

CVE – Centro de vigilância epidemiológica do Estado de São Paulo. Disponível em <[http://portal.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/dados/malaria/malaria1820\\_dados.pdf](http://portal.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/dados/malaria/malaria1820_dados.pdf)>. Acesso em: 19 de set. de 2020.

Cox-Singh, J *et al.* *Plasmodium knowlesi* Malaria in Humans Is Widely Distributed and Potentially Life Threatening. *Clinical Infectious Diseases*, Vol. 46, jan. 2008.

De Nys, HM *et al.* Age-related effects on malaria parasite infection in wild chimpanzees. *Rev. Biology Letters*, Vol. 9, may 2013.

Deane, LM. Simian Malaria in Brazil. Mem. Inst.Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 87, 1992.

Dixit, J *et al.* Reinvestigating the status of malaria parasite (*Plasmodium* sp.) in Indian non-human primates. PLOS Neglected Tropical Diseases, dec. 2018.

Duarte, AMRC *et al.* Widespread occurrence of antibodies against circumsporozoite protein and against blood forms of *Plasmodium vivax*, *P. falciparum* and *P. malariae* in Brazilian wild monkeys. J. Med. Primatol, São Paulo, Vol. 35,2, 2006.

Duarte, AMRC *et al.* Natural *Plasmodium* infections in Brazilian wild monkeys: Reservoirs for human infections?. Rev, Acta Tropical, São Paulo, Vol. 107,2, may 2008.

Figueiredo, MAP *et al.* Serological and molecular techniques applied for identification of *Plasmodium* spp. in blood samples from nonhuman primates. Rev. Bras. Parasitol. Vet., Jaboticabal, Vol. 27, sep. 2018.

Fonseca, F. Plasmódio de primata do Brasil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1951

Gomes, AP *et al.* Malária grave por *Plasmodium falciparum*. Rev. bras. ter. intensiva, São Paulo, Vol. 23, sep. 2011.

Jirku, M *et al.* Detection of *Plasmodium* spp. in Human Feces. Emerging Infectious Diseases, Vol. 18, apr. 2012.

Kawai, S *et al.* Detection of *Plasmodium knowlesi* DNA in the urine and faeces of a Japanese macaque (*Macaca fuscata*) over the course of an experimentally induced infection. *Malaria Journal*. Vol. 13, 2014.

Liu, W *et al.* Origin of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in gorillas. *Rev. Nature*, Vol. 23, sep. 2010.

Liu, W *et al.* African origin of the malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Rev. Nature Communications*, Vol. 5, feb. 2014.

Liu, W *et al.* Wild bonobos host geographically restricted malaria parasites including a putative new *Laverania* species. *Nature Communications*. Vol. 8, 16, nov. 2017.

Loy, DE *et al.* Investigating zoonotic infection barriers to ape *Plasmodium* parasites using faecal DNA analysis. *Int J. Parasitol.* Vol. 48,7, jun. 2018.

Marques, GRAM *et al.* Aspectos epidemiológicos de malária autóctone na Mata Atlântica, litoral norte, Estado de São Paulo, 1985 – 2006. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Uberaba, Vol. 41, ago. 2008.

Martinelli, A; Culleton, R. Non-human primate malaria parasites: out of the forest and into the laboratory. *Japan*, jun. 2016.

Milner, DA. Malaria pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med.*, Vol. 8, jan. 2018.

Ministério da Saúde (BR), 2020. Malária: o que é, causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção. Disponível em: <<https://saude.gov.br/saude-de-a-z/malaria>>. Acesso em: 06 de set. de 2020.

Monteiro, EF *et al.* Naturally Acquired Humoral Immunity against Malaria Parasites in Non-Human Primates from the Brazilian Amazon, Cerrado and Atlantic Forest. *Rev. Pathogens*, Vol. 9,7 jun. 2020.

Monteiro, L *et al.* Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. *J Clin Microbiol*, Vol 35, 1997.

Mueller, I *et al.* Key gaps in the knowledge of *Plasmodium vivax*, a neglected human malaria parasite. *Lancet Infect Dis*, Vol. 9, sep. 2009.

Nogueira, F; Rosario, VE. Métodos para avaliação da atividade antimalárica nas diferentes fases do ciclo de vida do *Plasmodium*. *Rev Pan-Amaz Saude, Ananindeua*, Vol. 1, sep. 2010.

Ollomo, B *et al.* A New Malaria Agent in African Hominids. *PLoS Pathogens*, Vol. 5, may 2009.

Organização Mundial da Saúde. *Relatório Mundial da Malária*. Organização Mundial da Saúde; Genebra, Suíça: 2019. 232p

Osorio, L *et al.* A scoping review on the field validation and implementation of rapid diagnostic tests for vector-borne and other infectious diseases of poverty in urban areas. *Infectious Diseases of Poverty*, Vol. 7, sep. 2018.

Pimentel, LF *et al.* Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 43, dec. 2007.

Prugnolle, F *et al.* African great apes are natural hosts of multiple related malaria species, including *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol. 107, jan. 2010.

Rey, L. *Parasitologia Rey: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais*, 4ª ed. - Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

Rodrigues, PT *et al.* Human migration and the spread of malaria parasites to the New World. *Rev. Scientific Reports*, Vol. 8, jan. 2018.

Rondon, S *et al.* Prevalence of *Plasmodium* parasites in non-human primates and mosquitoes in areas with different degrees of fragmentation in Colombia. *Malaria Journal*. Vol. 18, 2019

Siregar, JE *et al.* Non-invasive surveillance for *Plasmodium* in reservoir macaque species. *Malária Journal*. Princeton, Vol.14, oct. 2015.

Sucen – Superintendência de Controle de Endemias (BR). *Malaria Doença*. Disponível em: <<http://www.saude.sp.gov.br/sucen-superintendencia-de-controle-de-endemias/programas/malaria/doenca>>. Acesso em: 18 de set. de 2020.

Sucen – Superintendência de Controle de Endemias (BR). *Malaria Vetores*. Disponível em: <<http://www.saude.sp.gov.br/sucen-superintendencia-de-controle-de-endemias/programas/malaria/vetores>>. Acesso em: 06 de set. de 2020.

Tadei, WP; Thatcher, BD. Malaria vectors in the Brazilian Amazon: Anopheles of the subgenus Nyssorhynchus. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, Vol. 42, apr. 2000.

Tauil P *et al.* A malária no Brasil. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, Vol. 1, mar. 1985.

Valones, MAA *et al.* Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. Braz. J. Microbiol., São Paulo, Vol. 40, mar. 2009.

Viana, GMR *et al.* Comparação de dois métodos de obtenção de DNA como protocolos alternativos para a detecção de parasitas da malária humana por nested PCR. Rev Pan-Amaz Saude, Ananindeua, Vol. 1, jun. 2010.

Yamasaki, T *et al.* Detection of etiological agents of malaria in howler monkeys from Atlantic Forests, rescued in regions of São Paulo city, Brazil. J. Med. Primatol. Vol. 40,6 sep. 2011.