

**UNIVERSIDAD NACIONAL**  
**SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO**  
**POSGRADO REGIONAL EN CIENCIAS VETERINARIAS TROPICALES**



**Detección molecular de especies de *Plasmodium* y bacterias del complejo  
*Mycobacterium tuberculosis* en primates no humanos, en cautiverio, de Costa Rica**

**Alicia Claribel Fuentes Ramírez**

**Universidad Nacional, Heredia, Abril de 2016**

**Tesis sometida a consideración del Tribunal Examinador del Posgrado Regional en  
Ciencias Veterinarias Tropicales, Maestría en Enfermedades Tropicales para optar al  
grado de *Magister Scientiae***

**Detección molecular de especies de *Plasmodium* y bacterias del complejo  
*Mycobacterium tuberculosis* en primates no humanos de Costa Rica**

**Alicia Claribel Fuentes Ramírez**

**Tesis sometida a consideración del Tribunal Examinador del Posgrado Regional en  
Ciencias Veterinarias Tropicales, Maestría en Enfermedades Tropicales para optar al  
grado de *Magister Scientiae***

## **Miembros del Tribunal Examinador**

---

**Dra. Mayela Coto Chotto**  
**Representante Consejo Central de Posgrado**

---

**Bernardo Vargas Leitón, Ph.D.**  
**Coordinador PCVET**

---

**Gaby Dolz, Ph.D.**  
**Tutora**

---

**Juan José Romero, Ph.D.**  
**Lector**

---

**Mauricio Jiménez Soto, MSc.**  
**Lector**

---

**Alicia Claribel Fuentes Ramírez**  
**Sustentante**

## RESUMEN GENERAL

Con el objetivo de determinar la presencia de especies de *Plasmodium* en primates no humanos mediante gota gruesa, reacción en cadena de la polimerasa multiplex semi anidado (SnM-PCR, por sus siglas en inglés) para diferenciación de especies y secuenciación, se analizaron 152 muestras sanguíneas de monos de trece centros de rescate de Costa Rica. En gota gruesa, se determinaron dos muestras con el parásito *Plasmodium malariae*, en el SnM-PCR, un total de cinco (3.3%) muestras resultaron positivas a *P. malariae*, y una muestra fue secuenciada, confirmando los resultados obtenidos microscópicamente y mediante SnM-PCR. La secuenciación y construcción de un árbol filogenético reveló que el parásito *P. malariae/P. brasilianum* (GenBank KU999995) encontrado en un mono congo (*Alouatta palliata*) es idéntico al reportado recientemente en cuatro casos en humanos que se produjeron en Costa Rica en los años 2012 – 2013. El parásito *P. malariae/P. brasilianum* fue encontrado en diferentes especies de primates no humanos en cautiverio y en diversas regiones del Sur de Costa Rica. La similitud de las secuencias de los parásitos encontrados en humanos y un mono sugiere, que estos últimos podrían estar actuando como reservorios de *P. malariae/P. brasilianum*, por lo que es importante incluirlos en los programas de control y erradicación.

Con el objetivo de determinar la presencia de bacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis* mediante PCR, se analizaron un total de 138 hisopados bucales de primates no humanos de trece centros de rescate de Costa Rica. Ninguno de los animales analizados presentó sintomatología ni antecedentes sugestivos de enfermedad pulmonar al momento del muestreo. En el PCR, un total de cinco muestras mostraron banda de amplificación entre

600–800 pb, sin embargo, la secuenciación no logró confirmar que fuera material genético de micobacterias patógenas. Este trabajo constituye un primer registro de la probable ausencia de micobacterias patógenas en PNH, sin embargo, se recomienda no desatender la enfermedad en esta población.

Palabras claves:

Primates del Nuevo Mundo, malaria, tuberculosis, diagnóstico, gota gruesa, PCR, zoonosis, hisopados bucales, hemoparásitos

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por darme la oportunidad, la fortaleza y la salud para alcanzar esta meta en mi desarrollo profesional.

Al Servicio Alemán de Intercambio Académico (DAAD) por brindarme el soporte económico durante todo este tiempo para poder llevar a cabo mis estudios de maestría.

A la Dra. Gaby Dolz por guiarme durante todo el proceso, por su tiempo, por su dedicación, por el apoyo, por sus consejos y su comprensión.

A mis lectores Dr. Juan José Romero por brindarme su ayuda y orientación en el desarrollo del proyecto de investigación y al Dr. Mauricio Jiménez por brindarme su apoyo y acompañarme a todas las giras para realizar la toma de muestras.

A las Dras. Nidia Calvo y Jessica Morera del Centro Nacional de Referencia de Parasitología; y a los Dres. Carlos Trabado y Estela Cordero del Centro Nacional de Referencia de Tuberculosis de Costa Rica, por proporcionar los controles positivos de ADN para la realización de la técnica de PCR.

A los Centros de Rescate por su valiosa participación, a los Médicos Veterinarios y personal de cada centro por su ayuda y colaboración en el muestreo.

A mis compañeros Nineth Mendoza, Milena Arguello, Rocío González y Roderico Hernández por el apoyo durante el desarrollo del proyecto y por su amistad incondicional a lo largo de mis estudios en Costa Rica.

Al Posgrado Regional en Ciencias Veterinarias Tropicales (PCVET) por su colaboración constante.

## **DEDICATORIA**

A mi familia y en especial a mis padres: Ángel Fuentes y Alicia Ramírez por su apoyo moral, por brindarme siempre un amor incondicional, por sus oraciones y por mantener su confianza en mí.

## ÍNDICE

Resumen general	iv
Agradecimientos	vi
Dedicatoria	vii
Índice de Cuadros	x
Índice de Figuras	xi
Introducción general	
Malaria	xii
Tuberculosis	xvi
Referencias bibliográficas	xxi
<b>Artículo I</b>	
Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	3
2. Materiales y métodos	6
2.1 Población, diseño de estudio y método de muestreo	6
2.2 Toma y manejo de la muestra	6
2.3 Diagnóstico microscópico	7
2.4 Análisis Molecular	7
2.4.1 Extracción de ADN	7
2.4.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa multiplex semi anidado (SnM-PCR) para detección de <i>P. vivax</i> , <i>P. malariae</i> y <i>P. falciparum</i>	8
2.4.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para género	9
2.4.4 Electroforesis en gel de agarosa	9
2.4.5 Secuenciación y construcción de árbol genético	10
3. Análisis estadístico	11
4. Resultados	12
4.1 Población analizada y recolección de muestras	12
4.2 Gota gruesa	14
4.3 Resultados del SnM-PCR	14

4.4 Resultados del PCR para el género <i>Plasmodium</i>	14
4.5 Resultados secuenciación y árbol genético	16
5. Discusión	17
6. Conclusiones	20
7. Recomendaciones	21
8. Referencias bibliográficas	21
<b>Artículo II</b>	
Resumen	26
Abstract	27
1. Introducción	28
2. Metodología	31
2.1 Población, diseño de estudio y método de muestreo	31
2.2 Toma y manejo de la muestra	32
2.3 Análisis molecular	32
2.3.1 Extracción de ADN	32
2.3.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa	33
2.3.3 Electroforesis en gel de agarosa	33
2.3.4 Secuenciación	34
3. Análisis estadístico	34
4. Resultados	35
4.1 Población analizada y recolección de muestras	35
4.2 Resultados PCR para complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	37
5. Discusión	38
6. Conclusiones	40
7. Recomendaciones	40
8. Referencias bibliográficas	41
Discusión General	45
Conclusiones Generales	50
Recomendaciones Generales	50
Anexo 1	52

## ÍNDICE DE CUADROS

### Artículo I

<b>Cuadro 1.</b>	10
Secuencias de cebadores utilizados en el SnM-PCR y PCR de género para detección de especies de <i>Plasmodium</i> .	
<b>Cuadro 2.</b>	12
Número de primates no humanos analizados por especie y por centro de rescate.	
<b>Cuadro 3.</b>	13
Descripción de la población de monos analizada en trece centros de rescate de Costa Rica, en base a la ficha clínica.	
<b>Cuadro 4.</b>	16
Análisis descriptivo de los animales positivos al SnM-PCR para <i>P. malariae</i> .	

### Artículo II

<b>Cuadro 1.</b>	35
Número de primates no humanos analizados por especie y por centro de rescate.	
<b>Cuadro 2.</b>	36
Descripción de la población de monos muestreada en trece centros de rescate de Costa Rica, en base a la ficha clínica.	
<b>Cuadro 3.</b>	38
Análisis descriptivo de los animales sospechosos a tuberculosis (PCR).	

## ÍNDICE DE FIGURAS

### Artículo I

**Figura 1.** 15  
Ubicación geográfica de los Centros de Rescate y casos positivos de *P. malariae* detectado mediante PCR multiplex semi anidado (SnM-PCR), Gota Gruesa (GG) y secuenciación.

**Figura 2.** 15  
Electroforesis en gel de agarosa de los productos del SnM-PCR para especies de *Plasmodium*. (M: marcador de peso molecular; 1: muestra A1; 2: muestra B1, 3: muestra B2; 4: muestra E1; C -: control negativo; C+: control positivo de *P. malariae*)

**Figura 3.** 17  
Árbol filogenético generado para la secuencia amplificada con el gen 18S rDNA por máxima verosimilitud, modelo de sustitución y distanciamiento evolutivo de Tamura-Nei. El análisis de remuestreo (con porcentaje de 1,000 replicaciones) está representado por números en cada uno de los nodos. CR: Costa Rica; BRA: Brasil; VEN: Venezuela; GF: Guyana Francesa; PNG: Papúa Nueva Guinea.  
\* Especies reportadas en primates no humanos, las restantes fueron reportadas en humanos.

### Artículo II

**Figura 1.** 37  
Ubicación geográfica de los Centros de Rescate y casos sospechosos de tuberculosis.

## INTRODUCCION GENERAL

### MALARIA

La malaria es una enfermedad vectorial causada por protozoos del género *Plasmodium*, y transmitida al humano y otros vertebrados, a través de la picadura de mosquitos hembras hematófagas del género *Anopheles* (Coatney et al., 1971). La endemicidad de esta enfermedad es generalmente determinada por la distribución geográfica de su mosquito vector el cual se encuentra principalmente en zonas con climas tropicales (CDC, 2010).

Aproximadamente 150 especies de mamíferos, reptiles y aves pueden actuar como potenciales hospedadores (Perkins y Austin, 2009). A pesar de tener un gran número de hospedadores, en general, los parásitos de malaria tienden a ser específicos para cada especie. Las especies reconocidas por causar enfermedad en el humano son: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* y recientemente *Plasmodium knowlesi*. Las dos especies de mayor frecuencia a nivel global son: *P. falciparum* (más común en África), la cual es considerada como la especie más agresiva por causar la muerte principalmente por coma o anemia, y *P. vivax* la cual puede causar infecciones debilitantes y recurrentes, pero rara vez la muerte (Ávila-Agüero, 2008).

En Costa Rica, históricamente, la mayoría de los casos se han concentrado en la Región Huetar Atlántica, específicamente en el cantón de Matina (Ávila-Agüero, 2008). Desde 1957-2012 se han notificado más de 93 mil casos de malaria, el 98.34% de estos casos han sido causados por la especie parasitaria *P. vivax*, 1.63% por *P. falciparum* y un 0.03% por *P. malariae*. La década de mayor notificación fue la de los años 90's, y a partir del año 2000 el número de casos empezó a descender considerablemente. Para el año 2012 se

reportaron ocho casos y solamente cinco casos en el 2013, por lo que según la Organización Mundial de la Salud (OMS), Costa Rica se encuentra en la fase de pre-eliminación de la enfermedad (MINSA, 2014).

La malaria como enfermedad zoonótica fue considerada como un evento de rara ocurrencia, hasta que se reportó un gran número de infecciones por *P. knowlesi* (especie propia de los macacos) en Malasia en el año 2004 (Singh et al., 2004; Ramasamy, 2014). Desde entonces, los casos en humanos por esta especie de *Plasmodium* se han descrito en casi todos los países del sudeste asiático, por lo que en la actualidad *P. knowlesi* es considerado como la quinta especie de *Plasmodium* que produce malaria en los seres humanos (Cox-Singh et al., 2008; White, 2008).

Los primates no humanos son reservorios de varias especies de *Plasmodium*, se han reportado en ellos aproximadamente 33 especies del parásito (Coatney et al., 1971; Krief et al., 2010) entre ellas se encuentran: *Plasmodium brasilianum*, *Plasmodium coatneyi*, *Plasmodium cinomolgi*, *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium simium* y *Plasmodium reichenowi*, entre otros (Chinchilla et al., 2006).

En el continente Americano se han detectado en los primates del Nuevo Mundo en cautiverio como en vida libre por medio de pruebas moleculares, las especies *P. simium* afectando a tres especies de monos (*Alouatta caraya*, *Alouatta clamitans* y *Brachytelles arachnoides*) en Brasil (Costa et al., 2014), y *P. brasilianum* infectando monos de la familia *Cebidae* en Centro y Sur América (Galland, 2000). En Costa Rica, por métodos de microscopía básica (gota gruesa y extendido fino de sangre periférica teñido con Giemsa), se detectó morfológicamente la especie de *P. brasilianum* en una población de monos congo (*Alouatta palliata*) (Chinchilla et al., 2006).

Los parásitos del género *Plasmodium* son organismos intracelulares que pertenecen al filo *Apicomplexa*, orden *Haemosporida*, familia *Plasmodiidae* (Wiser, 2015). El ciclo de vida de todas las especies de *Plasmodium* es complejo. La infección en los mamíferos comienza con la picadura de un mosquito hembra *Anopheles* infectado. El ciclo esporogónico o sexual inicia cuando las hembras del *Anopheles* se infectan al ingerir sangre de un mamífero que tiene parásitos sexuales de *Plasmodium* (microgametocitos y macrogametocitos). Al entrar estas formas sexuales al estómago del mosquito los microgametocitos experimentan una división nuclear produciendo alrededor de 8 microgametos flagelados que fertilizarán el macrogameto femenino. De la unión de estos dos estadios del parásito se genera una nueva forma denominada como cigoto. Este se transforma en una célula alargada y móvil conocida como ooquineto, el cual se une a las paredes del estómago del mosquito, al crecer de tamaño madura transformándose en un ooquiste. Estos ooquistes se romperán liberando cientos de esporozoítos en la cavidad corporal, donde eventualmente migrarán a las glándulas salivales del mosquito, donde permanecerán listos hasta el momento que un mamífero sea picado por el *Anopheles*, quien le transmitirá mediante la inoculación de su saliva los esporozoítos desarrollados en el vector (Trampuz et al., 2003; Mejía et al., 2012).

El ciclo esquizogónico o asexual inicia cuando los mosquitos infectados liberan los esporozoítos de las glándulas salivares durante la alimentación y estos entran en el torrente sanguíneo del mamífero. Después de aproximadamente una hora, el esporozoíto desaparece de la circulación, reapareciendo 24-48 horas más tarde en las células del parénquima del hígado (Mejía et al., 2012). Hay una proteína que cubre la superficie del esporozoíto que lleva una molécula ligando, que se une específicamente a receptores en la superficie de la membrana celular de los hepatocitos, esta es la razón por la cual los esporozoítos entran en las células del hígado y no en otras células (Guimarães et al., 2015). Una vez dentro del

hepatocito, inicia el ciclo esquizogónico o exoeritrocítico, en el que los esporozoítos se multiplican de manera asexual formando esquizontes hepáticos, después de que los esquizontes han madurado, se rompen liberando miles de merozoítos, los cuales entran en la circulación para invadir a los eritrocitos (CDC, 2012; Vásquez et al., 2012).

En los eritrocitos, los merozoítos se alimentan de la parte proteica de la hemoglobina, apareciendo entonces el trofozoíto. Nuevamente por medio de reproducción asexual se multiplica en el interior de los glóbulos rojos, formándose el esquizonte hemático, cuando éste madura, se rompe el eritrocito liberando nuevos merozoítos. La mayoría de los merozoítos continúan con este ciclo replicativo infectando nuevos eritrocitos, pero algunos se convierten en gametocitos, masculinos (microgametocitos) y femeninos (macrogametocitos) (CDC, 2012; Guimarães et al., 2015). La longitud de esta fase eritrocítica del parásito depende de la especie de parásito: *P. falciparum* presenta un ciclo irregular, 48 horas para *P. vivax* y *P. ovale*, y 72 horas para *P. malariae*. El período de incubación en la mayoría de los casos varía de 7 a 30 días. Los períodos más cortos se observan con mayor frecuencia con *P. falciparum* y los más largos con *P. malariae* (CDC, 2010).

La reproducción asexual de los parásitos *Plasmodium* en la fase sanguínea es la responsable de las manifestaciones clínicas de la malaria, como la fiebre, sudoración y escalofríos, y están asociadas con la ruptura de los eritrocitos infectados (Collins y Jeffery, 2007; EOL, 2015), también se observa anemia, lesiones renales y defectos de coagulación por insuficiencia hepática, entre otros. Por lo tanto, las manifestaciones clínicas se presentan como un síndrome febril agudo hasta un cuadro de malaria complicado, que afecta órganos específicos, pudiendo progresar a una falla multisistémica que compromete la vida del paciente (CDC, 2010; Vásquez et al., 2012).

El estándar de oro para el diagnóstico de la malaria sigue siendo la demostración microscópica del parásito en sangre periférica, mediante extendido fino y gota gruesa, coloreado con reactivo de Giemsa. También existen métodos de detección de antígenos y anticuerpos (CDC, 2012). Los métodos moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), son una herramienta de diagnóstico que permite la detección de material genético (ADN) del parásito en sangre periférica. Este método presenta mayor sensibilidad que la microscopía convencional, sobre todo cuando la parasitemia es muy baja, por lo tanto, es más específico para la detección de especies (Steenkeste et al., 2009).

El tratamiento de la malaria depende de muchos factores, entre ellos de la gravedad de la enfermedad, la especie de parásito de *Plamodium* responsable de la infección y la región geográfica donde se adquirió la infección. Factores como la edad, el peso y el estado de embarazo pueden limitar las opciones disponibles para el tratamiento de la malaria. Las opciones de tratamiento recomendadas por el CDC son: Atovaquona-proguanil, artemeter-lumefantrina, mefloquina, clindamicina, cloroquina, entre otros (CDC, 2012).

## **TUBERCULOSIS**

La tuberculosis es una enfermedad grave, altamente infecciosa, de mucha importancia para los sistemas de salud. Es producida por bacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, y puede diseminarse de los animales a los humanos y viceversa por inhalación de aerosoles contaminados con el bacilo (Barrueta-Acevedo, 2011). El complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) es un grupo de bacilos ácido-alcohol resistentes que son patógenos oportunistas de humanos y animales. En este grupo están incluidos: *M. tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium africanum* y

*Mycobacterium canetti* (Une y Mori, 2007). Todas estas especies pertenecen al filo *Actinobacteria*, orden *Actinomycetales*, familia *Mycobacteriaceae* (EOL, 2015).

La epidemiología de la tuberculosis varía sustancialmente en todo el mundo. Las tasas más altas se observan en el África subsahariana, India, China y las islas del sudeste asiático (Serafino-Wani, 2012). En el continente americano la incidencia ha ido disminuyendo constantemente desde 1990 en la mayoría de los países. Haití es el país con la tasa de incidencia más alta (222/100,000 habitantes), seguido de Bolivia (131/100,000 habitantes), Guyana (111/100,000 habitantes) y Perú (101/100,000 habitantes) (PAHO, 2012), mientras Chile, Costa Rica, Cuba y Uruguay en el período comprendido entre 2001 y 2011, destacan por haber reducido la incidencia anual de todas las formas de tuberculosis. Chile ha reducido su incidencia a 15/100,000 habitantes, Costa Rica la ha disminuido a 12/100,000 habitantes, Cuba ha tenido una reducción a 9.5/100,000 habitantes y Uruguay ha disminuido la incidencia a 21/100,000 habitantes, y con esto avanzan grandemente hacia la eliminación de esta enfermedad (PAHO, 2013; Tenorio, 2013).

Los seres humanos son los únicos reservorios de *M. tuberculosis*. El ciclo de infección suele ser de humano a humano; sin embargo, los bacilos tuberculosos tienen una amplia gama de huéspedes, y se han detectado en peces, reptiles, aves y mamíferos. Naturalmente, la infección de estos animales con *M. tuberculosis* es ocasionada por los seres humanos, transmitiéndose posteriormente entre los animales, los que se convierten en una fuente de infección para los humanos (Montali et al., 2001; Oh et al., 2002; Une & Mori, 2007). *M. africanum* se encuentra más comúnmente en África Occidental y es el responsable de una cuarta parte de los casos de tuberculosis reportados en humanos, en Gambia, mientras que *M. bovis* es la principal causa de la tuberculosis en el ganado vacuno, ciervos y otros mamíferos. La infección de humanos con *M. bovis* ocurre generalmente en personas

inmunocomprometidas, y se asocia al consumo de productos de leche o carne contaminada (Serafino-Wani, 2012).

Los primates no-humanos también son susceptibles a diferentes especies de micobacterias (Une y Mori, 2007). En Costa Rica se encuentran las especie *Saimiri oerstedii* (mono ardilla), *Ateles geoffroyi* (mono araña), *Cebus capucinus* (mono cara blanca) y *Alouatta palliata* (mono aullador) pero hasta el momento no se han realizado estudios que demuestren la presencia de micobacterias en estas poblaciones. Investigaciones realizadas en otros países sugieren que cerca del 70% de las cepas aisladas de estos animales pertenecen al complejo *M. tuberculosis*, por lo tanto constituyen un potencial riesgo zoonótico (Une y Mori, 2007; Estrada-Cely et al., 2011; Nath et al., 2012).

La enfermedad tanto en humanos y animales (monos, bovinos y otras especies), se caracteriza por ser una enfermedad infecciosa debilitante, crónica y progresiva, caracterizada por la formación de lesiones granulomatosas típicas con diversos grados de necrosis, calcificación y encapsulación en pulmones, linfonodos y otros órganos (Michel et al., 2010).

Todos los primates no humanos pueden desarrollar tuberculosis, sin embargo, el grado de susceptibilidad varía según la especie. Estudios previos sugieren que los primates del Viejo Mundo suelen ser más propensos a desarrollar la enfermedad de tuberculosis en comparación con los primates del Nuevo Mundo (Mätz-Rensing et al., 2015; Motzel et al., 2003). En general, los síntomas clínicos son mínimos o ausentes hasta que la enfermedad está muy avanzada. Con frecuencia, los primates son encontrados muertos sin historia clínica previa (Montali et al., 2001; Mätz-Rensing et al., 2015). Si los síntomas clínicos están presentes, suelen ser inespecíficos e incluyen: debilidad, parálisis, pérdida de apetito, pérdida de peso, pelaje opaco, tos, y depresión general. Tos intermitente es un signo clínico característico de la tuberculosis pulmonar. Los síntomas de la tuberculosis extrapulmonar

son determinados por los órganos afectados. Animales tuberculosos suelen desarrollar además una anemia normocítica normocrómica (Mätz-Rensing y Kaup, en prensa; Lerche et al., 2008).

A pesar de que los estudios de investigación en el continente americano en primates en cautiverio son muy escasos, se han reportado casos de enfermedad tuberculosa en los géneros *Saimiri*, *Aotus*, *Ateles* y *Cebus* (Leathers y Hamm, 1976; Estrada-Cely et al., 2011).

Históricamente, el diagnóstico de la tuberculosis en primates no humanos vivos en cautiverio se ha basado en la exploración clínica, radiografías y la prueba cutánea de tuberculina intradérmica. Tanto las radiografías como la prueba de tuberculina son logísticamente difíciles de realizar, ya que requieren la manipulación del animal en más de una ocasión, además de ser poco fiables para la detección de la infección (Nath et al., 2012; Wilbur et al., 2012). Estudios previos estiman que la sensibilidad de la prueba de tuberculina oscila entre 68-75%, mientras que la especificidad se reporta en 96-99% (Monaghan et al., 1994).

Los ensayos serológicos existentes basados en la detección de anticuerpos y medición del nivel de citoquinas específicas para el complejo *M. tuberculosis* han demostrado el inconveniente de presentar resultados falsos positivos y negativos para la infección (Vervenne et al., 2004). El estándar de oro para el diagnóstico de la infección activa con MTBC en seres humanos y algunos mamíferos sigue siendo el cultivo (American Thoracic Society, 2000). Sin embargo, los cultivos son notoriamente difíciles de realizar, por ser una bacteria altamente contagiosa, por lo que requieren laboratorios especializados para su manipulación con medidas de bioseguridad específicas y tiempos prolongados de incubación (American Thoracic Society, 2000).

Actualmente se emplean cada vez más los métodos moleculares para la detección de ADN de MTBC en muestras clínicas (esputo, lavado broncoalveolar, hisopados bucales, aspirado gástrico y biopsias) de humanos y monos (Wilbur et al., 2012), ya que estas pruebas ofrecen resultados confiables con sensibilidades entre 70-97%, en comparación con el cultivo (51.5%), y sobre todo en menor tiempo, por lo cual se consideran herramientas útiles para el diagnóstico y control de la enfermedad (Mohi et al., 2013).

Hasta el momento la mayoría de las investigaciones de tuberculosis realizadas en primates no humanos se basan en la aplicación de una prueba de tuberculina intradérmica, la cual es una reacción inmunológica de hipersensibilidad retardada contra antígenos de micobacterias, esta prueba ha sido utilizada desde 1940 para el diagnóstico ante mortem en primates no humanos, y actualmente es el único método aprobado por el CDC para realizar a animales de importación en cuarentena (Lerche et al., 2008). En el continente Asiático se han realizado recientemente estudios moleculares para la detección de micobacterias en poblaciones de monos de diferentes países (Indonesia, Tailandia, Nepal, Singapur), encontrando una prevalencia de 31.9% en 263 macacos examinados (Wilbur et al., 2012).

La malaria y tuberculosis son dos importantes enfermedades infecciosas con un alto impacto social y económico que afectan a muchos países. Costa Rica ha realizado grandes esfuerzos para controlar y erradicar ambas enfermedades, por lo tanto determinar la presencia de estos agentes infecciosos en primates no humanos es de suma importancia para proteger tanto la vida de los animales como las personas que están en contacto con ellos. Por esta razón es necesario incorporar a los primates no humanos en los programas de control de estas dos enfermedades.

## Referencias bibliográficas.

- American Thoracic Society. (2000). Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. *Am J Respir Crit Care Med*, 161, 1376–1395. Recuperado de [www.atsjournals.org](http://www.atsjournals.org)
- Ávila-Agüero, M. L. (2008). Epidemiología de la Malaria en Costa Rica. *Acta Médica Costarricense*, 50(2).
- Barrueta-Acevedo, F. (2011). ¿TUBERCULOSIS MILIAR EN MONO CAPUCHINO (Cebus capucinus)? Recuperado de <http://exzooticos.blogspot.com/2011/04/tuberculosis-miliar-en-mono-capuchino.html>
- CDC. 2010. Malaria. <http://www.cdc.gov/malaria/about/disease.html> (consultado 08 de febrero 2015).
- CDC. 2012. Malaria biology. <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/> (consultado 9 febrero 2015).
- Chinchilla, M., Guerrero, O. M., Gutiérrez, G., & Sánchez Ronald. (2006). Presencia de *Plasmodium brasilianum* (Apicomplexa, Plasmodidae) en el mono congo (*Alouatta palliata*, Primates: Cebidae) de Costa Rica. Importancia epidemiológica en relación con el ser humano. *Parasitología Latinoamericana*, 61, 192–196.
- Coatney, G. R., Collins, W. E., Warren, M., & Contacos, P. G. (1971). The Primate Malariae.
- Collins, W. E., & Jeffery, G. M. (2007). *Plasmodium malariae*: parasite and disease. *Clinical microbiology reviews*, 20(4), 579–592.
- Costa, D. C., Cunha, V. P. d., Assis, Gabriela Maria Pereira de, Souza Junior, Júlio César de, Hirano, Z. M. B., Arruda, M. E. d., . . . Brito, Cristiana Ferreira Alves de. (2014). *Plasmodium simium/Plasmodium vivax* infections in southern brown howler monkeys from the Atlantic Forest. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 109(5), 641–653.
- Cox-Singh, J., Davis, T. M. E., Lee, K.-S., Shamsul, S. S. G., Matusop, A., Ratnam, S., . . . Singh, B. (2008). *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 46(2), 165–171.
- Encyclopedia of life (EOL). *Mycobacterium tuberculosis*. <http://eol.org/pages/6385875/details> (consultado 14 Febrero 2015).

- Encyclopedia of Life (EOL). *Plasmodium falciparum*. [http://eol.org/pages/10408873/hierarchy\\_entries/51387607/details](http://eol.org/pages/10408873/hierarchy_entries/51387607/details) (consultado 7 febrero 2015).
- Estrada-Cely, G. E., Valencia-Aguirre, S., & Vega-Lugo, W. O. (2011). Prevalencia de tuberculosis en primates en cautiverio en el municipio de Florencia, Caquetá. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 6(2), 61–72.
- Galland, G. (2000). Role of the squirrel monkey in parasitic disease research. *ILAR Journal*, 41(1).
- Guimarães, L. O., Wunderlich, G., Alves, J. M. P., Bueno, M. G., Röhe, F., Catão-Dias, J. L., . . . Kirchgatter, K. (2015). Merozoite surface protein-1 genetic diversity in *Plasmodium malariae* and *Plasmodium brasilianum* from Brazil. *BMC Infectious Diseases*, 15(1), 723.
- Krief, S., Escalante, A. A., Pacheco, M. A., Mugisha, L., André, C., Halbwax, M., . . . Sibley, L. D. (2010). On the Diversity of Malaria Parasites in African Apes and the Origin of *Plasmodium falciparum* from Bonobos. *PLoS Pathogens*, 6(2), e1000765.
- Leathers, C. W., & Hamm, T. E. (1976). Naturally Occurring Tuberculosis in a Squirrel Monkey and Cebus Monkey. *J Am Vet Med Assoc*, 169(9), 909–911.
- Lerche, N. W., Yee, J. L., Capurano, S. V., & Flynn, J. L. (2008). New approaches to tuberculosis surveillance in Nonhuman primates. *ILAR Journal*, 49(2), 170–178.
- Mätz-Rensing, K., Hartmann, T., Wendel, G. M., Frick, J. S., Homolka, S., Richter, E., . . . Kaup, F.J. (2015). Outbreak of Tuberculosis in a Colony of Rhesus Monkeys (*Macaca mulatta*) after Possible Indirect Contact with a Human TB Patient. *Journal of Comparative Pathology*, 153(2-3), 81–91.
- Mätz-Rensing, K. & Kaup, F. J. (en prensa). Tuberculosis in non-human primates-the disease, pp. 1–9.
- Mejía, R. E., Banegas, E. I., & Matute, M. L. (2012). Manual de procedimientos operativos estandar.
- Michel, A. L., Müller, B., & van Helden, P. D. (2010). *Mycobacterium bovis* at the animal–human interface: A problem, or not? *Veterinary Microbiology*, 140(3-4), 371–381.
- Ministerio de Salud, Costa Rica (2014). Costa Rica camina firme hacia la erradicación de la malaria. <http://www.ministeriodesalud.go.cr> (consultado 30 Noviembre 2014).

- Mohi, M. A., Anuradha, P. R., Nagamani, K., & Vishnu, P. H. (2013). Comparison of conventional diagnostic modalities, BACTEC culture with polymerase chain reaction for diagnosis of extra-pulmonary tuberculosis. *J Med Allied Sci*, 3(2), 53–58.
- Monaghan, M. L., Doherty, M. L., Collins, J. D., Kazda, J. F., & Quinn, P. J. (1994). The tuberculin test. *Veterinary Microbiology*, 40(1-2), 111–124.
- Montali, R. J., Mikota, S. K., & Cheng, L. I. (2001). *Mycobacterium tuberculosis* in zoo and wildlife species. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz*, 20(1), 291–303.
- Motzel, S. L., Schachner, R. W., Fletcher, M. A., Kanaya, B., Gomez, J. A., Ngai, D., . . . Klein, H. J. (2003). International perspectives: The future of nonhuman primate resources. *Diagnosis of Tuberculosis in Nonhuman Primates*. Washington, D.C.: National Academies Press.
- Nath, B. G., Chakraborty, A., & Rahman, T. (2012). Tuberculosis in non-human primates of Assam: use of Prima TB STAT-PAK Assay for detection of tuberculosis. *Journal of threatened Taxa*, 4(4), 2541–2544.
- Oh, P., Granich, R., Scott, J., Sun, B., Joseph, M., Stringfield, C., . . . Flood, J. (2002). Human exposure following *Mycobacterium tuberculosis* infection of multiple animal species in a Metropolitan Zoo. *Emerging infectious diseases*, 8(11), 1290–1293.
- PAHO. Tuberculosis in the Americas: Regional Report 2012. *Epidemiology, Control and Financing*. OMS. Report number: 1, 2012.
- PAHO. *VI Reunión Regional de países de baja prevalencia de TB en las Américas*. OMS. 2013
- Perkins, S. L., & Austin, C. C. (2009). Four new species of *Plasmodium* from New Guinea Lizards: Integrating morphology and molecules. *The Journal of Parasitology*, 95(2).
- Ramasamy, R. (2014). Zoonotic Malaria Global Overview and Research and Policy Needs. *Frontiers in Public Health*, 2(9), 5.
- Serafino-Wani, R. L. (2012). Tuberculosis Epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. *South Sudan Medical Journal*, 45(2), 45–46.
- Singh, B., Sung, L. K., Matusop, A., Radhakrishnan, A., Shamsul, S. S. G., Cox-Singh, J., . . . Conway, D. J. (2004). A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *The Lancet*, 363(9414), 1017–1024.

- Steenkeste, N., Incardona, S., Chy, S., Duval, L., Ekala, M.-T., Lim, P., . . . Arie, F. (2009). Towards high-throughput molecular detection of *Plasmodium*: New approaches and molecular markers. *Malaria Journal*, 8(1), 86.
- Tenorio, A. (2013). VI Reunión Regional de países de baja prevalencia de TB en las Américas. Organización Panamericana de la Salud.
- Trampuz, A., Jereb, M., Mozlovic, I., & Prabhu, R. (2003). Clinical review: Severe malaria. *Critical Care*, 7(4).
- Une, Y., & Mori, T. (2007). Tuberculosis as a zoonosis from a veterinary perspective. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 30(5-6), 415–425.
- Vásquez, María, A., Tobón-C, & Alberto. (2012). Mecanismos de patogénesis en la malaria por *Plasmodium falciparum*. *Biomédica*, 32(1), 1–47.
- Vervenne, R. A., Jones, S. L., van Soolingen, D., van der Laan, T., Andersen, P., Heidt, P. J., . . . Langermans, J. A. (2004). TB diagnosis in non-human primates: Comparison of two interferon- $\gamma$  assays and the skin test for identification of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 100(1-2), 61–71.
- White, N. J. (2008). *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 46(2), 172–173.
- Wilbur, A. K., Engel, G. A., Rompis, A., A Putra, I G A, Lee, B. P. Y.-H., Aggimarangsee, N., . . . Jones-Engel, L. (2012). From the mouths of monkeys: detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA from buccal swabs of synanthropic macaques. *American journal of primatology*, 74(7), 676–686.
- Wiser, M. (2015). Cellular and Molecular Biology of *Plasmodium*. Recuperado de <http://www.tulane.edu/~wiser/malaria/cmb.html>

## ARTICULO I

### Detección molecular de *Plasmodium malariae*/*Plasmodium brasilianum* en primates no humanos en cautiverio de Costa Rica

#### Resumen

Se analizaron 152 muestras sanguíneas de primates no humanos de trece centros de rescate de Costa Rica para determinar la presencia de especies de *Plasmodium* mediante gota gruesa, reacción en cadena de la polimerasa multiplex semi anidado (SnM-PCR, por sus siglas en inglés) para diferenciación de especies, y secuenciación. En gota gruesa, se determinaron dos muestras con el parásito *Plasmodium malariae*, en el SnM-PCR, un total de cinco (3.3%) muestras resultaron positivas a *P. malariae*, y una muestra fue secuenciada, confirmando los resultados obtenidos microscópicamente y mediante SnM-PCR. La secuenciación y construcción de un árbol filogenético reveló que el parásito *P. malariae*/*P. brasilianum* (GenBank KU999995) encontrado en un mono congo (*Alouatta palliata*) es idéntico al reportado recientemente en cuatro casos en humanos que se produjeron en Costa Rica en los años 2012 – 2013. El parásito *P. malariae*/*P. brasilianum* fue encontrado en diferentes especies de primates no humanos en cautiverio y en diversas regiones del Sur de Costa Rica. La similitud de las secuencias de los parásitos encontrados en humanos y un mono sugiere, que estos últimos podrían estar actuando como reservorios de *P. malariae*/*P. brasilianum*, por lo que es importante incluirlos en los programas de control y erradicación.

#### Palabras claves:

Primates del Nuevo Mundo, Malaria, diagnóstico, gota gruesa, PCR, zoonosis, hemoparásitos.

## Abstract

A total of 152 blood samples collected from non-human primates from thirteen rescue centers in Costa Rica were analyzed to determine the presence of *Plasmodium* species using thick blood smear, semi-nested multiplex Polymerase Chain Reaction (SnM-PCR) for species differentiation, and sequencing. The parasite *Plasmodium malariae* was found in two samples using thick blood smear, a total of five (3.3%) samples yielded positive results to *P. malariae* in the SnM-PCR, and one sample was sequenced confirming results obtained microscopically and in the SnM-PCR. Sequencing and construction of a phylogenetic tree revealed the parasite *P. malariae/P. brasilianum* (GenBank KU999995) found in a howler monkey (*Alouatta palliata*), is identical to the recently reported in four human cases that occurred in Costa Rica in 2012-2013. The parasite *P. malariae/P. brasilianum* was found in different species of non-human primates in captivity and in various regions of Southern of Costa Rica. The similarities of the sequences of the parasites found in humans and one monkey suggest, that latter may act as a reservoir of *P. malariae/P. brasilianum*, and the importance to include them in the control and eradication programs.

### Keywords:

New World monkeys, malaria, diagnosis, thick blood smear, PCR, zoonoses, hemoparasites.

## 1. Introducción

La malaria es una enfermedad vectorial ocasionada por protozoos del género *Plasmodium*, que son transmitidos al ser humano y a los primates no humanos a través de la picadura de mosquitos hembras hematófagas del género *Anopheles* (Coatney et al., 1971; Bannister y Sherman, 2001). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la malaria es una de las enfermedades parasitarias de mayor importancia y de distribución mundial, que representa un problema para los sistemas de salud (World Health Organization, 2014).

Los parásitos de malaria tienden a ser específicos para cada especie (Singh y Daneshvar, 2013), sin embargo existen especies del parásito que infectan tanto a las personas como a los monos, y que no se pueden diferenciar a nivel morfológico, genético e inmunológico. Las especies reconocidas por ocasionar enfermedad en el humano son *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, y recientemente *Plasmodium knowlesi* (propia de los primates del Viejo Mundo), que en la actualidad es considerada como la quinta especie de *Plasmodium* en producir enfermedad en los seres humanos (White, 2008; Su, 2010; Singh y Daneshvar, 2013).

En los primates no humanos se ha reportado la presencia de aproximadamente 33 especies del parásito (Cormier, 2010; Araújo et al., 2013). En los monos del Nuevo Mundo las principales especies reportadas son *Plasmodium brasilianum* y *Plasmodium simium* (Galland, 2000), las cuales son indiferenciables de *P. malariae* y *P. vivax*, respectivamente (Yamasaki et al., 2011; Costa et al., 2014; de Alvarenga et al., 2015). La presencia de *P. simium* se ha reportado solamente en Brasil en tres especies de monos *Alouatta caraya* (mono aullador negro), *Alouatta clamitans* (mono aullador marrón) y *Brachyteles arachnoides* (mono araña lanudo) (Duarte et al., 2008), mientras que *P. brasilianum* se ha descrito en aproximadamente 35 especies de monos, en su mayoría en miembros de la familia *Cebidae*

y *Atelidae* de Costa Rica, Panamá, Colombia, Perú, Venezuela y Brasil, raramente se ha reportado en miembros de la familia *Callithricidae* (Yamasaki et al., 2011; Araújo et al., 2013; de Alvarenga et al., 2015). Aún se desconoce, si en condiciones naturales los primates no humanos portadores de *Plasmodium* podrían desarrollar la enfermedad de malaria o si solo actúan como reservorios del parásito (Duarte et al., 2008). Sin embargo, en aquellos animales que han sido sometidos a una esplenectomía experimental, se ha observado que la infección por *Plasmodium* spp. puede ocasionar debilidad y la enfermedad de malaria, con cuadros febriles, anemia, ictericia e insuficiencia renal (Coatney et al., 1971; Galland, 2000; White, 2008).

Las especies de *Plasmodium* causantes de la infección en los primates no humanos son de gran interés, ya que pueden ser transmitidos de forma natural o por accidente a los seres humanos (de Alvarenga et al., 2015). Cualquier enfermedad transmitida por vectores, depende de la bionomía y distribución de los vectores (Singh y Daneshvar, 2013), y a pesar de que los agentes vectoriales involucrados en la transmisión del parásito a los humanos son diferentes de los responsables del ciclo selvático, con la invasión del ser humano en el hábitat natural de los primates no humanos y la constante proximidad con estos animales en cautiverio, existe la posibilidad de que ocurra una infección de forma natural (Vythilingam y Hii, 2013). En Asia se ha demostrado que algunas especies de mosquitos del género *Anopheles* (*Anopheles latens* y *Anopheles cracens*) son altamente zoofílicas, ya que se alimentan de los monos en la copa de los árboles y también de los humanos a nivel del suelo, haciendo posible la transmisión del parásito de humano a humano, de mono a mono, de humano a mono y viceversa (Singh y Daneshvar, 2013).

En el año 2006 se reportó la especie *P. brasilianum* en seis monos congo de vida libre de las zonas de Quepos y Limón en Costa Rica, mediante extendidos teñidos con Giemsa (Chinchilla et al., 2006). Investigaciones recientes determinaron la presencia de *P. malariae*, *P. vivax* y *P. falciparum* en monos de vida libre pertenecientes a las cuatro especies de monos autóctonos de Costa Rica, *Saimiri oerstedii* (mono ardilla o mono tití), *Ateles geoffroyi* (mono araña), *Cebus imitator* (mono cara blanca) y *Alouatta palliata* (mono congo o aullador). El diagnóstico se realizó mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), sin embargo estos hallazgos no fueron confirmados por medio de secuenciación de ADN (Chaves-Ramírez et al., 2014). Actualmente Costa Rica se encuentra oficialmente en la fase de pre-eliminación de la enfermedad de malaria, habiendo reportado solamente 8 casos nuevos en personas en el año 2015 (4 casos por *P. vivax* y 4 casos por *P. falciparum*) (Dra. Calvo, comunicación personal). *P. vivax* y *P. falciparum* han sido las únicas especies reportadas en humanos desde 1959, causantes de brotes en diferentes zonas del país. *P. malariae* no había sido detectada desde 1959 (Vargas, 2001; Calvo et al., 2015), sin embargo, recientemente se diagnosticaron los primeros cuatro casos de *P. malariae* en personas mediante análisis moleculares (PCR en tiempo real), la secuenciación confirmó los resultados y los identificó como *P. malariae/P. brasilianum* (Calvo et al., 2015). De estos cuatro casos reportados, dos correspondieron a casos clínicos detectados en las zona de Limón y Alajuela, un caso era asintomático crónico también de Alajuela y el caso índice transfusional detectado en San José (Calvo et al., 2015). Aún queda por aclarar si *P. malariae* es una especie re-emergente en el país o si todo este tiempo ha estado presente y no había sido detectada microscópicamente o había sido confundida con *P. vivax* dada la similitud morfológica de estadios tempranos del parásito entre estas dos especies (Calvo et al., 2015). El objetivo del presente estudio fue determinar la presencia de parásitos del género

*Plasmodium* en muestras de sangre de primates no humanos en cautiverio para determinar si estos animales podrían actuar como posibles reservorios de los parásitos en Costa Rica.

## **2. Materiales y métodos**

### **2.1 Población, diseño de estudio y método de muestreo**

Se realizó un estudio transversal de tipo descriptivo para la detección de especies de *Plasmodium* en primates no humanos en condiciones de cautiverio en centros de rescate de vida silvestre y zoológicos. Se incluyeron en el estudio todos aquellos centros que estuvieron anuentes a participar. Se realizó un muestreo probabilístico aleatorio simple en el que se incluyeron todas las especies de monos presentes en dichos establecimientos. La población de monos en cautiverio en Costa Rica se estimó en alrededor de 250 individuos (Dr. Mauricio Jiménez, comunicación personal) y en base en esto, se calculó un tamaño de muestra mínimo requerido de 158 individuos, con un nivel de confianza del 95%, para detectar infección, asumiendo una prevalencia mínima esperada del 1% (Cannon y Roe, 1982;  $n = (1 - (1 - P)^{1/d}) \cdot (N - (d - 1/2))$ ), utilizando el programa Win Episcope 2.0 (Thrusfield, 2001).

### **2.2 Toma y manejo de la muestra**

Los procedimientos realizados a los primates no humanos fueron evaluados y aprobados por la Comisión de Bienestar Animal y Bioética de la Escuela de Medicina Veterinaria (oficio FCSA-EMV-CBAB-005-2014).

Se inmovilizó al primate con el uso de medicamentos sedantes. El protocolo de anestesia fue Ketamina (5-20mg/kg), en combinación con Diazepam (0.5-2mg/kg), administrado vía intramuscular con monitorización de parámetros vitales. A cada animal se

le realizó un examen objetivo general y se evaluó su estado nutricional y médico (Ver Anexo 1, Ficha Clínica). Algunos de los parámetros evaluados fueron condición corporal, condición del pelaje, mucosas y nódulos linfáticos. Se extrajo sangre por punción de la vena basílica, cefálica o femoral (1-2 ml aproximadamente). Las muestras se recogieron en tubos con anticoagulante EDTA y fueron transportadas al laboratorio en una hielera a 4°C, en donde se almacenaron a -20°C hasta su posterior análisis.

### **2.3 Diagnóstico microscópico**

De cada muestra de sangre se realizó una gota gruesa y extendido fino (fijado con metanol) en un portaobjetos; cada lámina fue teñida con colorante de Giemsa durante 15 minutos, y se examinó microscópicamente con el objetivo de inmersión 100x, para identificar los hemoparásitos. Se determinó como muestras positivas por microscopía, aquellas en las que en gota gruesa o extendido fino se observó la presencia de parásitos de *Plasmodium* spp. en 500 leucocitos. Las láminas positivas fueron remitidas al Laboratorio Nacional de Referencia de Parasitología, Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud (CNRP-INCIENSA) en Cartago, Costa Rica para su confirmación.

### **2.4 Análisis molecular**

#### **2.4.1 Extracción de ADN**

Se realizaron extracciones de ADN a partir de sangre total con anticoagulante EDTA, haciendo uso del kit comercial DNeasy Blood & Tissue de QIAGEN, conforme al protocolo establecido por el fabricante. Cada muestra de ADN fue debidamente identificada con el código del individuo y conservada a -20°C hasta su posterior análisis molecular.

#### **2.4.2 Reacción en cadena de la polimerasa multiplex semi-anidado (SnM-PCR, por sus siglas en inglés) para detección de *P. vivax*, *P. malariae* y *P. falciparum***

Todas las muestras de ADN se sometieron a un primer PCR para amplificar un segmento correspondiente al gen 18S rRNA conservado de *Plasmodium* spp. Esta amplificación se llevó a cabo según lo descrito por Rubio et al. (1999), con algunas modificaciones de tiempo y temperatura, como se describe a continuación: la mezcla de la reacción comprendió 14 µl de Dream Taq™ PCR Master Mix (Fermentas®), 1 µl (20 pmol/µl) del cebador PLF, 1 µl (20 pmol/µl) del cebador UNR, 1 µl (20 pmol/µl) del cebador HUF (Cuadro 1), 5 µl de ADN, y se completó con H<sub>2</sub>O libre de nucleasas (Fermentas®) hasta completar un volumen final de 25 µl. El protocolo de amplificación en el termociclador fue el siguiente: 5 minutos de desnaturalización inicial a 94°C, 40 ciclos repetidos de desnaturalización (94°C por 1 minuto), alineación (62°C por 1 minuto) y extensión (72°C por 90 segundos) y una temperatura final de extensión de 72°C por 10 minutos.

Se realizó una segunda ronda de PCR con cebadores específicos para detectar especies dentro de este género, utilizando la siguiente mezcla de reactivos; 5 µl del producto amplificado en el PCR anterior, 13 µl de Dream Taq™ PCR Master Mix (Fermentas®), 1 µl (20 pmol/µl) del cebador PLF, 1 µl (20 pmol/µl) del cebador MAR, 1 µl (20 pmol/µl) del cebador FAR, 1 µl (20 pmol/µl) del cebador VIR, para amplificar *P. malariae*, *P. falciparum* y *P. vivax*, respectivamente (Rubio et al., 1999) (Cuadro 1). Cada una de estas reacciones se completó con H<sub>2</sub>O libre de nucleasas (Fermentas®) hasta un volumen final de 25 µl. Las condiciones de amplificación en el termociclador fueron las siguientes: 5 minutos de desnaturalización inicial a 94°C, 35 ciclos repetidos de desnaturalización (94°C por 30 segundos), alineación (62° por 30 segundos), y extensión (72°C por 1 minuto) y una

temperatura final de extensión de 72°C por 10 minutos. Como control negativo se utilizó H<sub>2</sub>O libre de nucleasas (Fermentas®) y como controles positivos ADN de *P. malariae*, *P. vivax* y *P. falciparum* proporcionados por el CNRP-INCIENSA.

#### **2.4.3 PCR para género *Plasmodium***

Las muestras positivas detectadas con el SnM-PCR se sometieron a un segundo PCR de punto final que amplificó un segmento conservado correspondiente al gen 18S rDNA del género *Plasmodium*. Esta amplificación se llevó a cabo según lo descrito por Leclerc et al. (2004) con algunas modificaciones de tiempo y temperatura como se describe a continuación: la mezcla de la reacción comprendió 14 µl de Dream Taq™ PCR Master Mix (Fermentas®), 1 µl (20 pmol/µl) del cebador rPLU5, 1 µl (20 pmol/µl) del cebador rPLU6 (Cuadro 1), 5 µl de ADN, y se completó con H<sub>2</sub>O libre de nucleasas (Fermentas®) hasta completar un volumen final de 25 µl. El protocolo de amplificación en el termociclador fue el siguiente: 5 minutos de desnaturalización inicial a 95°C, 35 ciclos repetidos de desnaturalización (95°C por 1 minuto), alineación (50°C por 1:30 minutos) y extensión (72°C por 1 minuto) y una temperatura final de extensión de 72°C por 5 minutos. Como control negativo se utilizó H<sub>2</sub>O libre de nucleasas (Fermentas®) y como controles positivos ADN de *P. malariae*, *P. vivax* y *P. falciparum* proporcionados por el CNRP-INCIENSA.

#### **2.4.4 Electroforesis en gel de agarosa**

Los productos de PCR fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa (1.5%) en TBE 1X (Tris base, ácido bórico, EDTA, pH8, 0.5M) y teñidos con colorante GelRed™ Nucleic Acid Gel Strain. La corrida electroforética se realizó a 90 voltios durante 45 minutos. Como marcador de peso molecular se utilizó GenRuler 100 bp DNA Ladder Plus

(Fermentas®). Los fragmentos de amplificación en el SnM-PCR con un tamaño de 269 bp (*P. malariae*), 395 bp (*P. falciparum*), 499 bp (*P. vivax*) fueron consideradas positivas, al igual que los fragmentos de amplificación en el PCR de punto final con un tamaño de 1050pb.

**Cuadro 1:** Secuencias de cebadores utilizados en el SnM-PCR y PCR de género para detección de especies de especies de *Plasmodium*.

	Cebador	Secuencia	Especificidad	Tamaño del producto	Referencia
SnM-PCR Primera ronda	Forward primer PLF	5'-AGTGTGTATCCAATCGAGTTTC-3'	<i>Plasmodium</i> (Género)	783-821pb*	Rubio <i>et al.</i> , 1999
	HUF	5'-GAGCCGCCTGGATACCGC-3'	Mamíferos	231 pb <sup>++</sup>	
	Reverse primer UNR	5'-GACGGTATCTGATCGTCTTC-3'	Universal		
SnM-PCR Segunda ronda	Forward primer PLF	5'-AGTGTGTATCCAATCGAGTTTC-3'	<i>Plasmodium</i> (Género)		Rubio <i>et al.</i> , 1999
	Reverse primer MAR	5'-GCCCTCCAATTGCCTTCTG-3'	<i>P. malariae</i>	269 pb	
	Reverse primer FAR	5'-AGTCCCCTAGAATAGTTACA-3'	<i>P. falciparum</i>	369 pb	
	Reverse primer VIR	5'-AGGACTTCCAAGCCGAAGC-3'	<i>P. vivax</i>	499 pb	
PCR Género	rPLU5	5'-CCTGTTTGTTCCTTAAACTTC-3'	<i>Plasmodium</i> (Género)		Leclerc <i>et al.</i> , 2004
	rPLU6	5'-TTAAAATTGTTGCAGTTAAAACG-3'		1050 pb	

\* Tamaño dependiendo de las especies, *P. malariae* (821 pb), *P. falciparum* (787 pb), *P. vivax* (783 pb).

<sup>++</sup> En la primera reacción, los cebadores UNR-HUF, forman un producto de 231 pb que se utiliza como control positivo individual y debe estar presente en todas las muestras, excepto en el control negativo.

#### 2.4.5 Secuenciación y construcción de árbol genético.

Los productos positivos tanto en el SnM-PCR como en el PCR para género, fueron enviados a secuenciar a MacroGen (Seoul, Corea) con el fin de confirmar los resultados. La edición de las secuencias se realizó manualmente con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor® (Hall, 1999) y se comparó mediante el algoritmo BLASTn con la base de

datos del NCBI (Nacional Center for Biotechnology Information). Las secuencias fueron alineadas a través de programa MUSCLE (Edgar, 2004) con los parámetros predeterminados. El análisis filogenético se realizó con el programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versión 6.0 y se construyó un árbol filogenético para el gen 18S por máxima verosimilitud (Maximun likelihood). Se empleó el modelo Tamura-Nei para medir las distancias evolutivas y la relación de los clados fue determinada por análisis de remuestreo (bootstrap) de 1,000 réplicas. Las secuencias de referencia utilizadas para el gen 18S rDNA de *Plasmodium* spp se encuentran disponibles en la base de datos de GenBank con los números de acceso: HQ283216 (*P. falciparum*), AY579418 (*P. vivax*), AY579417 (*P. knowlesi*), AY579415 (*P. simium*), AF130735, KT266778, KC906723 (*P. brasilianum*), AF145336 y KJ934251 (*P. malariae*, esta última reportada en Costa Rica). *Theileria* spp. (AF162432) se utilizó como grupo externo.

### **3. Análisis estadístico**

En una base de datos digital se ingresó la información obtenida de la ficha clínica y los resultados de las pruebas diagnósticas; después, se hizo una traducción a un formato numérico para facilitar el análisis. Se realizó un análisis descriptivo de los resultados a las pruebas diagnósticas. Se realizó una distribución de frecuencias de resultados positivos y negativos y de los parámetros evaluados en la ficha clínica con los respectivos porcentajes.

## 4. Resultados

### 4.1 Población analizada y recolección de muestras.

Entre abril y noviembre de 2015 se visitaron 13 centros de rescate en los cuales se recolectaron un total de 152 muestras de sangre de monos (Figura 1). En el estudio se incluyeron cuatro especies de monos autóctonas de Costa Rica, *S. oerstedii* (16), *A. palliata* (32), *A. geoffroyi* (48), *C. imitator* (39) y 17 monos de una especie no nativa *Callithrix jacchus* (marmosetas). La distribución del muestreo en cada centro de rescate se muestra en el Cuadro 2.

**Cuadro 2.** Número de primates no humanos analizados por especie y por centro de rescate.

Especie	Centros de Rescate													Total
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	
<i>S. oerstedii</i>	7/7	-	-	-	3/3	-	-	6/6	-	-	-	-	-	16/16
<i>A. palliata</i>	4/4	9/11	-	5/6	3/4	-	-	5/6	-	4/6	-	1/6	1/1	32/43
<i>A. geoffroyi</i>	-	5/6	5/6	4/5	3/5	5/5	8/9	6/6	7/8	4/5	1/1	-	-	48/58
<i>C. imitator</i>	3/3	3/4	2/2	3/4	1/1	6/7	-	6/7	11/12	2/2	2/2	-	-	39/44
<i>C. jacchus</i>	17/18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17/18
<b>Total (%)</b>	31/34 (91.2)	17/21 (80.9)	7/8 (87.5)	12/15 (80.0)	10/13 (76.9)	11/12 (91.6)	8/9 (88.8)	23/25 (92.0)	18/20 (90.0)	10/13 (76.9)	3/3 (100.0)	1/6 (16.6)	1/1 (100.0)	<b>152/179 (84.9)</b>

La descripción de la población de monos muestreada en los trece centros de rescate en base a los parámetros evaluados en la ficha clínica se detalla en el Cuadro 3. Las especies de primates no humanos más frecuentes en cautiverio fueron *Ateles geoffroyi* (31.6 %) y *Cebus imitator* (25.6 %). La población de hembras en cautiverio fue mayor (55.9 %) con respecto a la población de machos (44.1 %). La mayoría de los monos en cautiverio se encontraban en una edad adulta (70.4%) y mostraron una condición física normal (82.2 %).

**Cuadro 3.** Descripción de la población de monos analizada en trece centros de rescate de Costa Rica, en base a la ficha clínica.

Característica	Estrato	Monos n=152	(%)
Sexo	Hembra	85	55.9
	Macho	67	44.1
Edad	Adulto	107	70.4
	Juvenil	45	29.6
Condición corporal	Obeso	5	3.3
	Normal	125	82.2
	Delgado	20	13.2
	Caquéctico	2	1.3
Condición pelaje	Buena	147	96.7
	Mala	5	3.3
Alopecia	Sí	12	7.9
	No	140	92.1
Ectoparásitos	Sí	0	0
	No	152	100
Mucosas	Normales	148	97.4
	Congestivas	1	0.6
	Ictéricas	0	0
	Pálidas	3	2.0
	Cianótica	0	0
Hidratación	Normal	146	96.1
	Deshidratación leve	5	3.3
	Deshidratación moderada	1	0.6
	Deshidratación severa	0	0
Nódulos linfáticos	Normales	149	98.0
	Agrandados	3	2.0
Enfermedades anteriores	Sí	23	15.1
	No	122	80.3
	Desconoce	7	4.6
Tratamientos aplicados	Sí	35	23.0
	No	112	73.6
	Desconoce	5	3.4
Evaluación veterinaria	Sí	149	98.0
	No	3	2.0
Desparasitación	Sí	140	92.1
	No	3	2.0
	Aún no (por edad)	9	5.9

## **4.2 Gota gruesa**

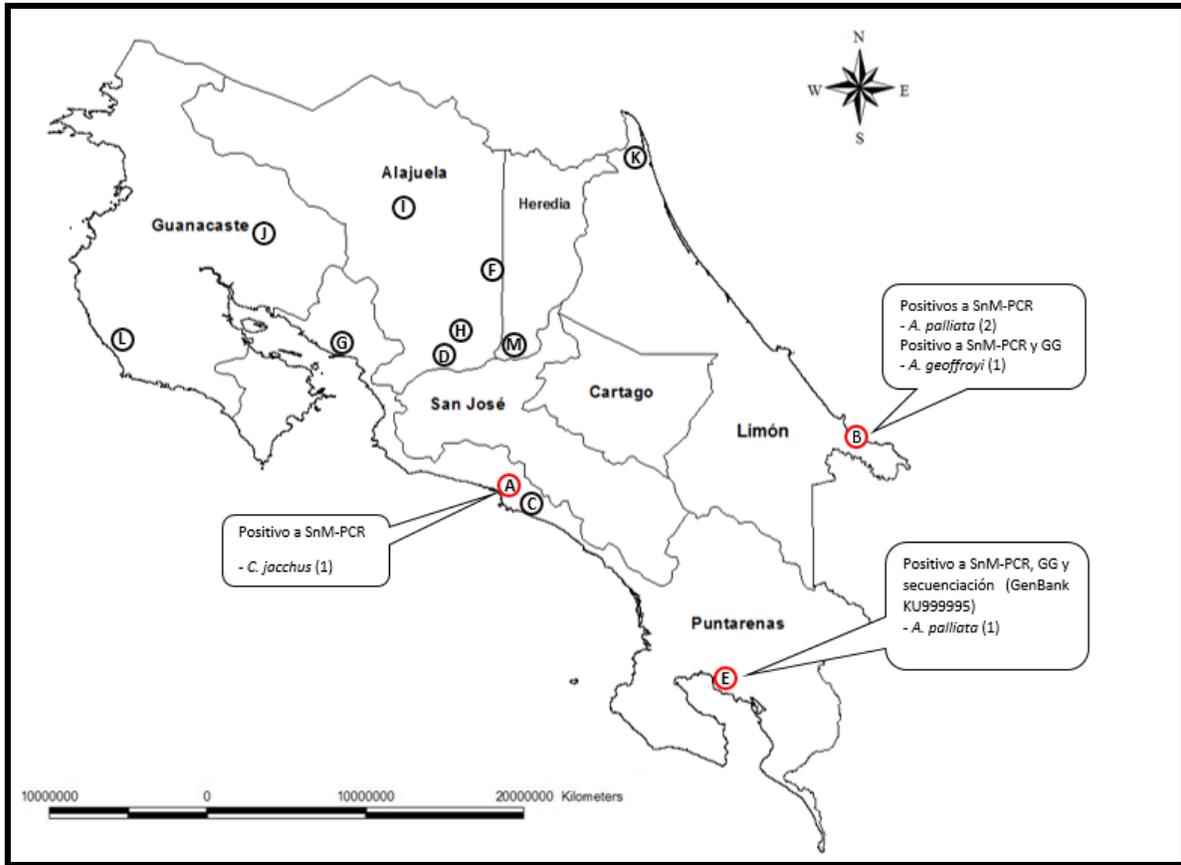
De las 152 muestras de sangre analizadas mediante gota gruesa y extendido fino se encontraron dos muestras positivas, en la que se observó trofozoítos y esquizontes del parásito, las cuales fueron identificadas como *Plasmodium malariae/Plasmodium brasilianum* (Cuadro 4). De estas dos muestras, solamente una fue confirmada por el CNRP-INCIENSA, esta muestra (E1) correspondió a un mono juvenil de la especie *A. palliata* del Centro de Rescate E ubicado en el Pacífico Sur. La segunda muestra (B2) correspondió a un mono juvenil de la especie *A. geoffroyi* del Centro de Rescate B ubicado en el Caribe (Figura 1).

## **4.3 Resultados del SnM-PCR.**

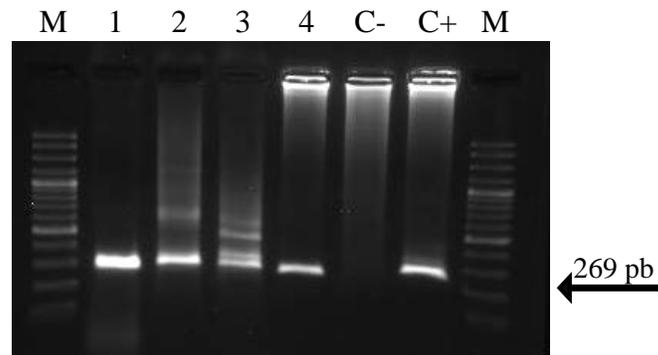
De los 152 animales estudiados un total de cinco muestras fueron detectadas como positivas para *P. malariae/P. brasilianum* (Figura 2). Uno de estos animales correspondió al *A. palliata* del Centro de Rescate E en el Pacífico Sur, otro se encontraba en el Centro de Rescate A en el Pacífico Central, y los tres restantes vivían en el Centro de Rescate B en el Caribe (Figura 1). El análisis descriptivo de las muestras positivas se detalla en el Cuadro 4.

## **4.4 Resultados del PCR para el género *Plasmodium***

Al analizar las cinco muestras detectadas como positivas en el SnM-PCR con el PCR de género, solamente una de ellas resultó positiva. Esta única muestra (E1), correspondió al mismo mono en el que se observó trofozoítos y esquizontes del parásito en la gota gruesa (Cuadro 4).



**Figura 1.** Ubicación geográfica de los Centros de Rescate y casos positivos de *P. malariae* detectado mediante PCR multiplex semi anidado (SnM-PCR), Gota Gruesa (GG) y secuenciación.



**Figura 2.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos del SnM-PCR para especies de *Plasmodium*. (M: marcador de peso molecular; 1: muestra A1; 2: muestra B1; 3: muestra B2; 4: muestra E1; C -: control negativo; C+: control positivo de *P. malariae*).

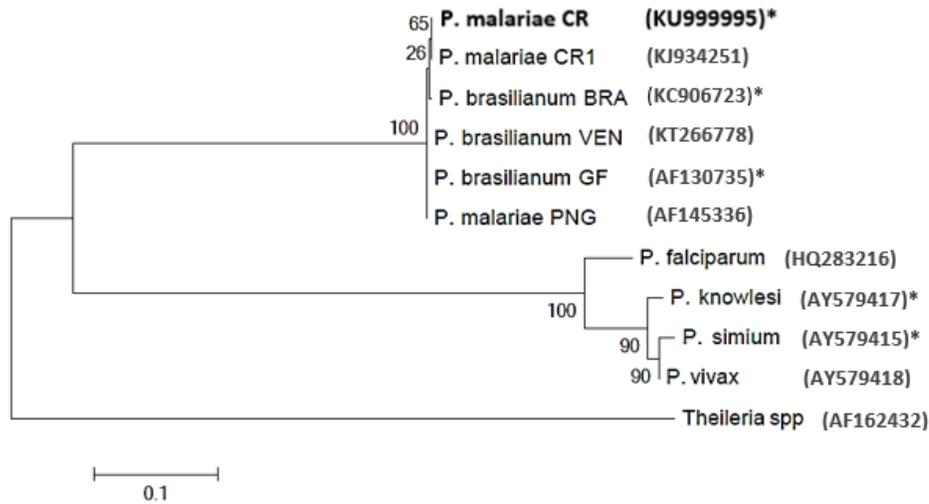
**Cuadro 4.** Análisis descriptivo de los animales positivos al SnM-PCR para *P. malariae*

Centro Rescate	Muestra	Especie	Sexo	Edad	CC	CP	Muc	NL	EA	Gota Gruesa	SnM-PCR
A	A1	<i>C. jacchus</i>	M	J	N	B	N	N	No	NSOP	<i>P. malariae</i>
B	B1	<i>A. palliata</i>	H	J	N	B	N	N	No	NSOP	<i>P. malariae</i>
B	B2	<i>A. palliata</i>	M	J	N	B	N	N	No	NSOP	<i>P. malariae</i>
B	B3	<i>A. geoffroyi</i>	H	J	N	B	N	N	Perdió un ojo	<i>P. malariae</i> (trofozoítos)	<i>P. malariae</i>
E	E1	<i>A. palliata</i>	H	J	D	B	N	N	Perdió un ojo	<i>P. malariae</i> (trofozoítos y esquizontes)	<i>P. malariae</i>

M: macho, H: hembra; J: juvenil; CC: condición corporal; N: normal, D: delgado; CP: condición pelaje B: buena; Muc: mucosas; NL: nódulos linfáticos; EA: enfermedades anteriores; NSOP: no se observaron parásitos.

#### 4.5 Resultados secuenciación y árbol filogenético

Ninguna de las cinco muestras de sangre positivas en SnM-PCR se pudo confirmar por secuenciación, mientras que la muestra positiva en el PCR para género se logró secuenciar identificándose como *P. malariae/P. brasilianum*, y confirmando así los resultados obtenidos microscópicamente y mediante SnM-PCR. El análisis BLASTN en GenBank mostró 100% de identidad con *P. malariae/P. brasilianum* (GenBank KJ934251) reportada recientemente de casos humanos atípicos que se produjeron en Costa Rica en los años 2012-2013 (Figura 3). La secuencia de nucleótidos de esta muestra fue depositada en GenBank y recibió el número de acceso KU999995.



**Figura 3.** Árbol filogenético generado para la secuencia amplificada con el gen 18S rDNA por máxima verosimilitud, modelo de sustitución y distanciamiento evolutivo de Tamura-Nei. El análisis de remuestreo (con porcentaje de 1,000 replicaciones) está representado por números en cada uno de los nodos. CR: Costa Rica; BRA: Brasil; VEN: Venezuela; GF: Guyana Francesa; PNG: Papúa Nueva Guínea.

\* Especies reportadas en primates no humanos, las restantes fueron reportadas en humanos.

## 5. Discusión

Este trabajo representa el primer estudio transversal, que combina las técnicas diagnósticas de gota gruesa y biología molecular (PCR y secuenciación), para detectar parásitos del género *Plasmodium* en primates no humanos en cautiverio de Costa Rica. Como se analizó un 84.9 % de la población de monos en cautiverio en trece centros de rescate, este trabajo posee una buena representatividad de la población en estudio, lo que brinda validez interna (Canal-Díaz, 2006). En este estudio se encontró el parásito *P. malariae/P. brasilianum* en tres especies de primates no humanos (*A. palliata*, *A. Geoffroyi* y *C. jacchus*), lo cual concuerda con lo reportado por otros investigadores, que también encontraron *P. malariae/P. brasilianum* en monos de vida libre de Costa Rica (Chinchilla et al., 2006; Chaves et al., 2015).

La condición general de los primates no humanos en cautiverio se determinó como buena, únicamente en un 3.3 % del total de animales analizados se determinó una mala condición del pelaje. En el caso del mono congo, que resultó positivo a *P. malariae/P. brasilianum* en gota gruesa y PCR, se determinó una condición corporal delgada, además había perdido un ojo, presuntamente por peleas con otros monos. Este animal fue encontrado herido en el bosque, trasladado al Centro de Rescate para asistencia médica, y al momento del muestreo tenía un mes de haber sido ingresado. En ninguno de los otros animales analizados en el mismo centro (N=10), situado en el Pacífico Sur, se detectaron casos positivos. Es posible, que este mono adquiriera el parásito estando en vida libre y probablemente ahí se esté presentando un ciclo silvestre para el parásito, lo que se recomienda confirmar en futuros estudios (Chaves et al., 2015).

Nuestros resultados concuerdan con lo reportado por otros autores sobre la baja sensibilidad de la gota con respecto al PCR (López et al., 2011; Mixson-Hayden et al., 2010; Ndao et al., 2004); un total de cinco (3.3%) de 152 muestras resultaron positivas en SnM-PCR, mientras que solamente dos (1.3 %) resultaron positivas en gota gruesa. Estos datos revelan una baja prevalencia de parásitos del género *Plasmodium* en monos analizados en Centros de Rescate de Costa Rica, lo cual concuerda con investigaciones en otros países como Brasil y Guyana Francesa, donde los autores han reportado prevalencias inferiores al 6 % en primates no humanos en cautiverio (Fandeur et al., 2000; Araújo et al., 2013; Maeno et al., 2015).

El PCR multiplex semi-anidado arrojó 5 resultados positivos para la especie *P. malariae/P. brasilianum*, lo cual concuerda con lo descrito en la literatura, que es la especie de *Plasmodium* más frecuente en primates del Nuevo Mundo (Duarte et al., 2008; Araújo et al., 2013;). Tres de estos cinco animales portadores del parásito se encontraban recluidos en

un Centro de Rescate en la zona del Caribe, en donde históricamente se han presentado la mayor parte de casos de malaria en humanos en Costa Rica (Ávila-Agüero, 2008; Grupo Técnico Nacional de Enfermedades Vectoriales Costa Rica, 2015), en esta misma región, Chinchilla y colaboradores también reportaron la presencia del parásito en monos Congo de vida libre (Chinchilla et al., 2006). Los otros dos monos portadores del parásito vivían en el Centro de Rescate en la zona del Pacífico Central y Pacífico Sur. Las localidades en donde se encontraron viviendo los animales en los centros de rescate presentaron características ambientales ideales como altitud y temperatura para la supervivencia del agente etiológico y el vector transmisor (Ávila-Agüero, 2008; Chaves et al., 2015; MINSA, 2014). En este estudio se reporta por primera vez la presencia de *P. malariae/P. brasilianum* en la especie de mono no nativa *Callithrix jacchus*.

La secuenciación determinó que el parásito *P. malariae/P. brasilianum* encontrado en el mono del Pacífico Sur es idéntico a los parásitos reportados recientemente en humanos, los cuales no habían sido detectados desde 1959 en Costa Rica (Calvo et al., 2015). Estudios basados en el análisis de la secuencia del gen 18S de *P. brasilianum* y *P. malariae* demuestran, que la similitud entre ambas especies es más del 99%, difiriendo únicamente en un polimorfismo de nucleótido simple. Hoy en día, los dos parásitos se perciben como variantes de la misma especie, que se han ido especializado en diferentes hospedadores. Es por eso que, cuando se encuentra en monos se les denomina *P. brasilianum* y cuando se encuentra en humanos *P. malariae* (Lalremruata et al., 2015).

En condiciones óptimas, donde existe un contacto cercano entre monos y seres humanos, y exista la presencia de un mosquito vector competente, los parásitos de la malaria cuartana son capaces de cruzar las fronteras entre hospedadores, dando lugar a una antropozoonosis (Kirchgatter et al., 2014; Lalremruata et al., 2015; Maeno et al., 2015). Los

presentes resultados proporcionan evidencia de que los primates no humanos pueden estar actuando como reservorios de parásitos del género *Plasmodium*, pudiendo dificultar así la erradicación de la enfermedad de la malaria en el país.

Las consecuencias de esta situación son importantes y la aparición de un hospedador alternativo del parásito necesita especial atención por las autoridades de salud (Verhulst et al., 2012; Maeno et al., 2015). Se recomienda realizar estudios para determinar las especies de vectores involucrados en la transmisión del *P. malariae/P. brasilianum* en monos y humanos en las localidades donde se han encontrado monos portadores de parásitos. Costa Rica se encuentra actualmente en la fase de pre-eliminación de la enfermedad (MINSA, 2014; Grupo Técnico Nacional de Enfermedades Vectoriales Costa Rica, 2015), por tanto es de vital importancia incluir a los primates no humanos en los programas de control y erradicación de la enfermedad.

## **6. Conclusiones**

El parásito *P. malariae/P. brasilianum* fue encontrado en diferentes especies de primates no humanos en cautiverio y en diversas regiones del Sur de Costa Rica. La similitud de las secuencias de los parásitos encontrados en humanos y en un mono sugiere, que estos últimos podrían estar actuando como reservorios de *P. malariae/P. brasilianum*, por lo que es importante incluirlos en los programas de control y erradicación.

## 7. Recomendaciones

- Informar a las autoridades de salud para que evalúen la inclusión de los primates no humanos en los programas de control y erradicación de la enfermedad.
- Realizar investigaciones para determinar los vectores involucrados en la transmisión del parásito, en zonas donde se han encontrado primates no humanos viviendo en cautiverio infectados con *P. malariae*/*P. brasilianum*.

## 8. Referencias bibliográficas

- Araújo, M. S., Messias, M. R., Figueiró, M. R., Gil, L. H. S., Probst, C. M., Vidal, N. M., . . . Ozaki, L. S. (2013). Natural *Plasmodium* infection in monkeys in the state of Rondônia (Brazilian Western Amazon). *Malaria journal*, 12, 180.
- Ávila-Agüero, M. L. (2008). Epidemiología de la Malaria en Costa Rica. *Acta Médica Costarricense*, 50(2).
- Bannister, L. H., & Sherman, I. W. (2001). *Plasmodium*. In *Encyclopedia of Life Sciences*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.
- Calvo, N., Morera, J., Dolz, G., Solorzano-Morales, A., & Herrero, M. V. (2015). Re-emergence of *Plasmodium malariae* in Costa Rica. *Science Postprint*, 1(2).
- Canal-Díaz, N. (2006). Técnicas de muestreo. Sesgos más frecuentes (No. 121-132).
- Cannon, R. M., Roe, R.T. (1982). *Livestock disease survey: a field manual for veterinarians*. Australian Government Publishing Service, Canberra.
- Chaves, A., Ortíz, E., Jiménez, M., Gutiérrez-Espeleta, G., Corrales, R., Avendaño, R., . . . Dolz, G. (Eds.) 2015. *Enfermedades de importancia zoonótica en primates no humanos de Costa Rica, resultados preliminares*.

- Chaves-Ramírez, A., Dolz, G., Bernal, S., Jiménez, M., & Ortiz, E. (2014). Detección de agentes vectoriales en primates no humanos de vida libre de Costa Rica. Costa Rica.
- Chinchilla, M., Guerrero, O. M., Gutiérrez, G., & Sánchez Ronald. (2006). Presencia de *Plasmodium brasilianum* (Apicomplexa, Plasmodidae) en el mono congo (*Alouatta palliata*, Primates: Cebidae) de Costa Rica. Importancia epidemiológica en relación con el ser humano. *Parasitología Latinoamericana*, 61, 192–196.
- Coatney, G. R., Collins, W. E., Warren, M., & Contacos, P. G. (1971). The Primate Malarías.
- Cormier, L. A. (2010). The Historical Ecology of Human and Wild Primate Malarías in the New World. *Diversity*, 2(2), 256–280.
- Costa, D. C., Cunha, V. P. d., Assis, Gabriela Maria Pereira de, Souza Junior, Júlio César de, Hirano, Z. M. B., Arruda, M. E. d., . . . Brito, Cristiana Ferreira Alves de. (2014). *Plasmodium simium/Plasmodium vivax* infections in southern brown howler monkeys from the Atlantic Forest. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 109(5), 641–653.
- de Alvarenga, Denise Anete Madureira, Pina-Costa, A. de, Sousa, T. N. de, Pissinatti, A., Zalis, M. G., Suárez-Mutis, M. C., . . . de Brito, Cristiana Ferreira Alves. (2015). Simian malaria in the Brazilian Atlantic forest: first description of natural infection of capuchin monkeys (Cebinae subfamily) by *Plasmodium simium*. *Malaria journal*, 14, 81.
- Duarte, Ana Maria Ribeiro de Castro, Malafrente, R. d. S., Cerutti, C., Curado, I., Paiva, B. R. de, Maeda, A. Y., . . . Gomes, A. d. C. (2008). Natural *Plasmodium* infections in Brazilian wild monkeys: reservoirs for human infections? *Acta tropica*, 107(2), 179–185.
- Edgar RC (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32:1792–1797.
- Fandeur, T., Volney, B., Peneau, C., & Thoisy, B. de. (2000). Monkeys of the rainforest in French Guiana are natural reservoirs for *P. brasilianum/P. malariae* malaria. *Parasitology*, 120 (Pt 1), 11–21.

- Galland, G. (2000). Role of the squirrel monkey in parasitic disease research. *ILAR Journal*, 41(1).
- Grupo Técnico Nacional de Enfermedades Vectoriales Costa Rica. (2015). Plan de eliminación de la malaria en Costa Rica, 2015-2020.
- Hall TA. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Ser.* 41: 95–98.
- Kirchgatter, K., Tubaki, R. M., Malafronte, R. d. S., Alves, I. C., Lima, Giselle Fernandes Maciel de Castro, Guimarães, L. d. O., . . . Wunderlich, G. (2014). *Anopheles* (Kerteszia) *cruzei* (Diptera: Culicidae) In Peridomestic Area during Asymptomatic Malaria Transmission in the Atlantic Forest: Molecular Identification of Blood-Meal Sources Indicates Humans as Primary Intermediate Hosts. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 56(5), 403–409.
- Lalremruata, A., Magris, M., Vivas-Martínez, S., Koehler, M., Esen, M., Kempaiah, P., . . . Metzger, W. G. (2015). Natural infection of *Plasmodium brasilianum* in humans: Man and monkey share quartan malaria parasites in the Venezuelan Amazon. *EBioMedicine*, 2(9), 1186–1192.
- Leclerc, M. C., Hugot, J. P., Durand, P., & Renaud, F. (2004). Evolutionary relationships between 15 *Plasmodium* species from New and Old World primates (including humans): A 18S rDNA cladistic analysis. *Parasitology*, 129(6), 677–684.
- López, A. C., Coello, J., Mejía, R. E., Banegas, E., & Fontecha, G. (2011). Comparación de gota gruesa y PCR para la detección de infecciones maláricas en Honduras. *Revista Ciencia y Tecnología*, 9.
- Maeno, Y., Quang, N. T., Culleton, R., Kawai, S., Masuda, G., Nakazawa, S., & Marchand, R. P. (2015). Humans frequently exposed to a range of non-human primate malaria parasite species through the bites of *Anopheles dirus* mosquitoes in South-central Vietnam. *Parasites & Vectors*, 8(1), 1473.
- Ministerio de Salud, Costa Rica (2014). Costa Rica camina firme hacia la erradicación de la malaria. <http://www.ministeriodesalud.go.cr> (consultado 30 Noviembre 2014).

- Mixson-Hayden, T., Lucchi, N. W., & Udhayakumar, V. (2010). Evaluation of three PCR-based diagnostic assays for detecting mixed *Plasmodium* infection. *BMC research notes*, 3, 88.
- Ndao, M., Bandyayera, E., Kokoskin, E., Gyorkos, T. W., MacLean, J. D., & Ward, B. J. (2004). Comparison of blood smear, antigen detection, and nested-PCR methods for screening refugees from regions where malaria is endemic after a malaria outbreak in Quebec, Canada. *Journal of clinical microbiology*, 42(6), 2694–2700.
- Rubio, J. M., Benito, A., Roche, J., Berzosa, P. J., García, M. L., Micó, M., . . . Alvar, J. (1999). Semi-nested, multiplex polymerase chain reaction for detection of human malaria parasites and evidence of *Plasmodium vivax* infection in Equatorial Guinea. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 60(2), 183–187.
- Singh, B., & Daneshvar, C. (2013). Human infections and detection of *Plasmodium knowlesi*. *Clinical microbiology reviews*, 26(2), 165–184.
- Su, X.-z. (2010). Human malaria parasites: are we ready for a new species? *The Journal of infectious diseases*, 201(10), 1453–1454.
- Thrusfield, M., Ortega, C., de Blas, I., Noordhuizen, J., Frankena, K. (2001). WIN EPISCOPE 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. *Veterinary Record*. 148: 567-572.
- Vargas, M. (2001) Situational diagnosis of malaria and DDT in Costa Rica. San José, Costa Rica: Pan American Health Organization, World Health Organization (PAHO/WHO). Disponible en: <http://www.bvsde.paho.org/bvsdepl/fulltext/ddt/cor.pdf>.
- Verhulst, N. O., Smallegange, R. C., & Takken, W. (2012). Mosquitoes as Potential Bridge Vectors of Malaria Parasites from Non-Human Primates to Humans. *Frontiers in Physiology*, 3.
- Vythilingam, I., & Hii, J. (2013). Simian Malaria Parasites: Special Emphasis on *Plasmodium knowlesi* and their *Anopheles* Vectors in Southeast Asia. In S. Manguin (Ed.), *Anopheles mosquitoes - New insights into malaria vectors*. InTech.

White, N. J. (2008). *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 46(2), 172–173.

World Health Organization (WHO). (2014). *World Malaria Report 2014*.

Yamasaki, T., Duarte, Ana M R C, Curado, I., Summa, M. E. L., Neves, Dafne V D A, Wunderlich, G., & Malafronte, R. S. (2011). Detection of etiological agents of malaria in howler monkeys from Atlantic Forests, rescued in regions of São Paulo city, Brazil. *Journal of medical primatology*, 40(6), 392–400.

## ARTICULO II

### **Detección molecular de bacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en primates no humanos de Costa Rica**

#### **Resumen**

El complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) produce la enfermedad de tuberculosis en humanos y primates no humanos (PNH), por lo que se considera una seria amenaza para la vida de estos animales, principalmente aquellos que viven en cautiverio. El diagnóstico de la enfermedad en monos se ha basado principalmente en la respuesta inmunitaria del huésped para detectar la infección, como lo es la prueba de tuberculina, la cual carece de sensibilidad y especificidad. Esta investigación representa el primer estudio que utiliza un método molecular (reacción en cadena de la polimerasa, PCR) para la detección de material genético de MTBC en PNH en cautiverio. La recolecta de muestras se enfocó en la cavidad bucal, presunta vía de transmisión de MTBC. Se analizaron 138 hisopados bucales de primates no humanos de trece centros de rescate de Costa Rica. Ninguno de los animales analizados presentó sintomatología ni antecedentes sugestivos de enfermedad pulmonar al momento del muestreo. En el PCR, un total de cinco muestras mostraron banda de amplificación entre 600–800 pb, sin embargo, la secuenciación no logró confirmar que fuera material genético de micobacterias patógenas. Este trabajo constituye un primer registro de la probable ausencia de micobacterias patógenas en PNH, sin embargo, se recomienda no desatender la enfermedad en esta población.

Palabras claves:

Primates del Nuevo Mundo, tuberculosis, diagnóstico, PCR, hisopados bucales

## **Abstract**

The *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) causes the tuberculosis disease in humans and non-human primates (NHP), which is considered a serious threat to the lives of the latter, mainly those living in captivity. The diagnosis has been based mainly on the host immune response to detect the infection or disease in monkeys, such as the tuberculin test, which lacks sensitivity and specificity. This research represents the first study using a molecular method (polymerase chain reaction, PCR) for the detection of genetic material of MTBC in NHP in captivity. Sample collection was focused on the oral cavity, the presumed route of transmission of MTBC. Buccal swabs were collected from 138 non-human primates from thirteen rescue centers of Costa Rica. None of the tested animals showed symptoms or had a history suggestive of pulmonary disease at the time of sampling. With the PCR, a total of five samples showed amplification bands between 600-800 bp, however, sequencing failed to confirm that the detected genetic material was from pathogenic mycobacteria. This paper represents the first report of the likely absence of pathogenic mycobacteria in NHP, however, it is recommended to do not disattend the disease in the NHP population.

Keywords:

New World Monkey, tuberculosis, diagnosis, PCR, oral swabs.

## 1. Introducción

La tuberculosis es una enfermedad infectocontagiosa crónica y a menudo mortal, producida por bacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) (Coscolla et al., 2013; Rosenbaum et al., 2015). Este complejo está formado por un grupo de bacilos ácido-alcohol resistente que son patógenos oportunistas de humanos y animales, en este grupo se encuentran incluidos: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium africanum* y *Mycobacterium canetti* (Une y Mori, 2007; Sakamoto, 2012).

El principal agente causante de la enfermedad en humanos es *M. tuberculosis*, seguido de *M. africanum*, mientras que *M. bovis* es la principal causa de tuberculosis en ganado vacuno y otros mamíferos (Serafino-Wani, 2012). El ser humano es el único reservorio de *M. tuberculosis*, la infección de un mono con esta bacteria, suele ser en primera instancia por contacto directo y cercano con un humano con tuberculosis activa (Montali et al., 2001; Oh et al., 2002), ya que estos organismos pueden diseminarse entre especies, por medio de aerosoles que contienen el bacilo, pero también de manera indirecta, por fómites, o accidentalmente por manejo o procedimientos médicos como intubación gástrica (Montali et al., 2001; Estrada-Cely et al., 2011; Sakamoto, 2012; Mätz-Rensing et al., 2015). Los primates no humanos (PNH) también son susceptibles a la infección por micobacterias patógenas. Investigaciones realizadas en otros países demostraron, que cerca del 70% de las cepas aisladas en monos pertenecen al complejo *M. tuberculosis*, por lo tanto constituyen un potencial riesgo zoonótico, dada su capacidad para propagarse rápidamente, principalmente cuando se encuentran en condiciones de cautiverio (Une y Mori, 2007; Estrada-Cely et al., 2011; Nath et al., 2012;).

Todos los PNH pueden desarrollar tuberculosis, sin embargo, el grado de susceptibilidad varía según la especie (Une y Mori, 2007; Mätz-Rensing et al., 2015). Investigaciones previas sugieren que los primates del Viejo Mundo suelen ser más propensos a desarrollar la enfermedad en comparación con los primates del nuevo mundo (Motzel et al., 2003; Lerche et al., 2008; Mätz-Rensing et al., 2015); sin embargo, esto parece basarse más en datos epidemiológicos que en experimentos de transmisión (Jones et al., 2012). Los estudios de tuberculosis en primates del Nuevo Mundo son muy escasos, hasta la fecha se ha reportado la enfermedad en los géneros *Saimiri*, *Aotus*, *Ateles* y *Cebus* (Leathers y Hamm, 1976; Barragán y Brieva, 2005).

Después de la infección inicial con el bacilo, los síntomas clínicos son mínimos o ausentes hasta que la enfermedad está muy avanzada (Mätz-Rensing et al., 2015). En algunos casos suele ocurrir muerte súbita, sin signos evidentes de enfermedad (Montali et al., 2001). Generalmente la tuberculosis es una enfermedad pulmonar, pero esta bacteria puede diseminarse internamente y afectar otros órganos, convirtiéndose en una infección sistémica (Barrueta-Acevedo, 2011; Mätz-Rensing et al., 2015). La enfermedad tanto en humanos como en animales, se caracteriza por ser una enfermedad infecciosa, debilitante, crónica y progresiva, caracterizada por la formación de lesiones granulomatosas típicas con diversos grados de necrosis, calcificación y encapsulación en pulmones, nódulos linfáticos y otros órganos (Motzel et al., 2003; Engel et al., 2012; Sakamoto, 2012). Cuando la infección por tuberculosis empieza a manifestarse, los animales generalmente presentan letargo progresivo, anorexia, pérdida de peso, pelaje opaco y tos (Van Kampen; Montali et al., 2001; Lerche et al., 2008; Mätz-Rensing et al., 2015).

La prueba intradérmica de la tuberculina es el ensayo *ante mortem* más utilizado para el diagnóstico de la tuberculosis en los primates no humanos, acompañado de radiografías y

exploración clínica (Montali et al., 2001). Los inconvenientes principales de la prueba de tuberculina son las de requerir la manipulación del animal en repetidas ocasiones, ya que la reacción debe leerse a las 24, 48 y 72 horas, además pueden darse resultados falsos positivos debido a reacciones cruzadas con micobacterias ambientales (Lerche et al., 2008). Reacciones falsas negativas pueden deberse a inmunosupresión del animal y a dificultades en la aplicación e interpretación de la prueba (Mazurek et al., 2001).

Actualmente se emplean cada vez más los métodos moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para la detección de ADN de MTBC en muestras clínicas (lavado broncoalveolar, aspirado gástrico y biopsias) de monos, las cuales deben ser recolectadas en forma invasiva (Wilbur et al., 2012). Estudios recientes han reportado que las micobacterias también se encuentran presentes en la cavidad bucal de individuos que sufren tuberculosis pulmonar y extrapulmonar, por consiguiente, pueden ser detectadas mediante muestras de hisopados bucales en PCR. La sensibilidad y especificidad reportada para el PCR que utiliza hisopados bucales para detectar MTBC es de 90% y 100%, respectivamente, con la gran ventaja, de que la toma de una muestra de hisopado oral representa un método no invasivo y fácil de aplicar en PNH. (Wilbur et al., 2012; Wood, 2014; Wood et al., 2015), proporcionando así resultados confiables y sobre todo en menor tiempo, por lo cual se considera como una herramienta útil para el diagnóstico y control de la enfermedad (Negi et al., 2005).

En Costa Rica las especies autóctonas de primates no humanos son *Saimiri oerstedii* (mono ardilla), *Ateles geoffroyi* (mono araña), *Cebus imitator* (mono cara blanca) y *Alouatta palliata* (mono aullador). Entre 1990–1992 se detectaron dos casos positivos post mortem en una tropa de monos araña del zoológico Simón Bolívar. Los cuatro animales que convivían con estos monos en el mismo recinto presentaron reacción positiva a la prueba de tuberculina

y fueron sacrificados (Dr. Juan Morales y Dr. Danilo Leandro, comunicación personal). Desde entonces se han realizado pocos estudios en primates no humanos, usando la tuberculina sobre todo como técnica de diagnóstico (Dr. Mauricio Jiménez, comunicación personal). El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de bacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en hisopados bucales de primates no humanos en cautiverio utilizando la técnica de PCR, para determinar si existe un riesgo para las personas que cuidan o visitan estos animales.

## **2. Materiales y métodos**

### **2.1 Población, diseño de estudio y método de muestreo**

Se realizó un estudio transversal de tipo descriptivo para la detección de especies de *Plasmodium* en primates no humanos en condiciones de cautiverio en Centros de Rescate de Vida Silvestre y zoológicos. Se incluyeron en el estudio todos aquellos centros que estuvieron anuentes a participar. Se realizó un muestreo probabilístico aleatorio simple en el que se incluyeron todas las especies de monos presentes en dichos establecimientos. La población de monos en cautiverio en Costa Rica se estimó en alrededor de 250 individuos (Dr. Mauricio Jiménez, comunicación personal) y en base en esto, se calculó un tamaño de muestra mínimo requerido de 158 individuos, con un nivel de confianza del 95%, para detectar infección, asumiendo una prevalencia mínima esperada del 1% (Cannon y Roe, 1982;  $n = (1 - (1 - P)^{1/d}) \cdot (N - (d - 1/2))$ ), utilizando el programa Win Episcopo 2.0 (Thrusfield, 2001)

## **2.2 Toma y manejo de la muestra**

Los procedimientos realizados a los primates no humanos fueron evaluados y aprobados por la Comisión de Bienestar Animal y Bioética de la Escuela de Medicina Veterinaria (oficio FCSA-EMV-CBAB-005-2014).

Se inmovilizó al primate con el uso de medicamentos sedantes. El protocolo de anestesia fue Ketamina (5-20mg/kg), en combinación con Diazepam (0.5-2mg/kg), administrado vía intramuscular con monitorización de parámetros vitales. A cada animal se le realizó un examen objetivo general y evaluó su estado nutricional y médico (Ver Anexo 1, Ficha Clínica). Algunos de los parámetros evaluados fueron condición corporal, condición del pelaje, mucosas y enfermedades anteriores. El procedimiento se realizó de acuerdo a lo descrito por Wilbur y colaboradores (2012). Se introdujo en la boca del mono un hisopo estéril (Omniswab WB10-0035), se realizó un suave raspado de fondo de boca y de la cara interna de las mejillas para obtener saliva y células bucales. Los hisopos se colocaron en tubos Eppendorf estériles conteniendo un tampón de lisis celular (Tris 50 mM pH 8,0, EDTA 50 mM, sacarosa 50 mM, NaCl 100 mM, y 1% SDS) y se almacenaron a temperatura ambiente.

## **2.3 Análisis molecular**

### **2.3.1 Extracción de ADN**

Se realizaron extracciones de ADN a partir de los hisopados bucales, haciendo uso del kit comercial DNeasy Blood & Tissue de QIAGEN, conforme al protocolo establecido por el fabricante. Cada muestra de ADN fue debidamente identificada con el código del individuo y conservada a -20°C hasta su análisis molecular.

### **2.3.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Todas las muestras de ADN se sometieron a un PCR de punto final que amplificó una región codificante del gen Rv0577 (presente solamente en micobacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis*). Esta amplificación se llevó a cabo según lo descrito por Huard y colaboradores (2003), con algunas modificaciones de tiempo y temperatura como se describe a continuación: la mezcla de la reacción comprendió 14 µl de Dream Taq™ PCR Master Mix (Fermentas®), 1 µl (20 µM) del cebador Rv0577F (5'-ATG CCC AAG AGA AGC GAA TAC AGG CAA-3') 1 µl (20 µM) del cebador Rv0577R (5'-CTA TTG CTG CGG TGC GGG CTT CAA -3'), 5 µl de ADN, y se completó con H<sub>2</sub>O libre de nucleasas (Fermentas®) hasta completar un volumen final de 25 µl. El protocolo de amplificación en el termociclador fue el siguiente: 5 minutos de desnaturalización inicial a 94°C, 35 ciclos repetidos de desnaturalización (94°C por 1 minuto), alineación (61°C por 1 minuto) y extensión (72°C por 1 minuto), y una temperatura final de extensión de 72°C por 10 minutos. Como control negativo se utilizó H<sub>2</sub>O libre de nucleasas (Fermentas®) y como controles positivos ADN de *M. tuberculosis* y *M. bovis* proporcionado por el Centro Nacional de Referencia para la Tuberculosis (CNRTB), Instituto Costarricense de Investigación y Enseñanza en Nutrición y Salud (INCIENSA), Cartago, Costa Rica.

### **2.3.3 Electroforesis en gel de agarosa**

Los productos de PCR fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa (1.5%) en TBE 1X (Tris base, ácido bórico, EDTA, pH8, 0.5M) y teñidos con colorante GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain. La corrida electroforética se realizó a 90 voltios durante 45 minutos. Como marcador de peso molecular se utilizó GenRuler 100 bp DNA Ladder Plus

(Fermentas®). Los productos amplificados con un tamaño de 786 bp fueron considerados positivos, y se enviaron para purificación y secuenciación a MacroGen (Seoul, Korea).

#### **2.3.4 Secuenciación**

Los productos positivos en el PCR, fueron enviados a secuenciar a MacroGen (Seoul, Corea) con el fin de confirmar los resultados. La edición de las secuencias se realizó manualmente con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor® (Hall, 1999) y se comparó mediante el algoritmo BLASTn con la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information).

### **3. Análisis estadístico**

Se ingresó la información obtenida en la ficha clínica y los resultados de las pruebas diagnósticas en una base de datos digital; después, se hizo una traducción a un formato numérico para facilitar el análisis. Se realizó un análisis descriptivo de los resultados a las pruebas diagnósticas. Se realizó una distribución de frecuencias de resultados positivos y negativos y de los parámetros evaluados en la ficha clínica con los respectivos porcentajes

## 4. Resultados

### 4.1 Población analizada y recolección de muestras.

Entre abril y noviembre de 2015 se visitaron 13 centros de rescate en los cuales se recolectaron un total de 138 hisopados bucales de monos (Figura 1). En el estudio se incluyeron cuatro especies de monos autóctonos de Costa Rica, *S. oerstedii* (15), *A. palliata* (28), *Ateles geoffroyi* (44), *Cebus imitator* (34) y 17 monos de una especie no nativa *Callithrix jacchus* (marmosetas). La distribución del muestreo por centro de rescate se muestra en el Cuadro 1.

**Cuadro 1.** Número de primates no humanos analizados por especie y por centro de rescate

Especie	Centro de Rescate (CR)													Total
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	
<i>S. oerstedii</i>	6/7	-	-	-	3/3	-	-	6/6	-	-	-	-	-	15/16
<i>A. palliata</i>	2/4	7/11	-	5/6	3/4	-	-	5/6	-	4/6	-	1/6	1/1	28/43
<i>A. geoffroyi</i>	-	1/6	5/6	4/5	3/5	5/5	8/9	6/6	7/8	4/5	1/1	-	-	44/58
<i>C. imitator</i>	0/3	1/4	2/2	3/4	1/1	6/7	-	6/7	11/12	2/2	2/2	-	-	34/44
<i>C. jacchus</i>	17/18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17/18
<b>Total (%)</b>	25/34 (73.5)	9/21 (42.9)	7/8 (87.5)	12/15 (80.0)	10/13 (76.9)	11/12 (91.6)	8/9 (88.8)	23/25 (92.0)	18/20 (90.0)	10/13 (76.9)	3/3 (100.0)	1/6 (16.6)	1/1 (100.0)	<b>138/179</b> <b>(77.0)</b>

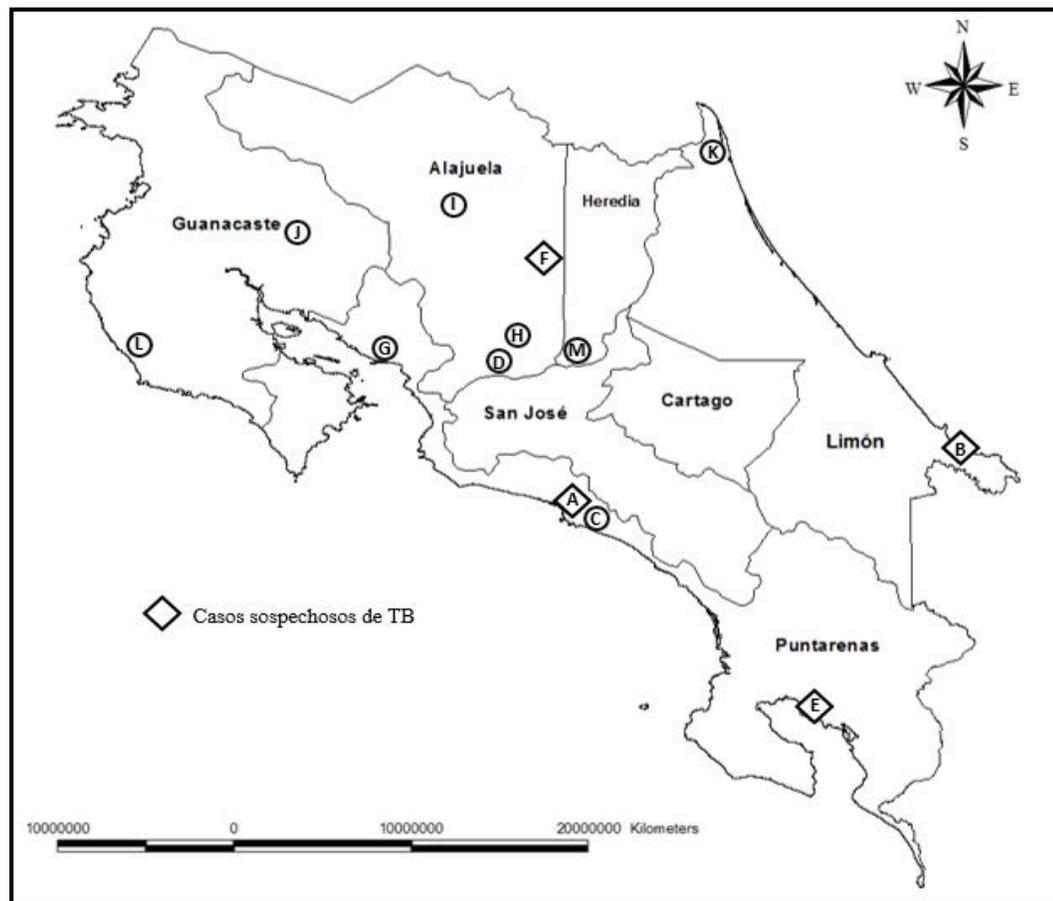
La descripción de la población de monos muestreada en los trece centros de rescate en base a los parámetros evaluados en la ficha clínica se detalla en el Cuadro 2. La mayoría de los monos en cautiverio se encontraban en una edad adulta (70.3%). El 80,4% de los monos analizados mostraron una condición corporal normal, mientras que el 14,5% tenían una condición corporal delgada y tan solo el 1,5% presentaron una condición corporal caquéctica.

**Cuadro 2.** Descripción de la población de monos analizada en trece centros de rescate de Costa Rica, en base a la ficha clínica.

<b>Característica</b>	<b>Estrato</b>	<b>Monos n=138</b>	<b>(%)</b>
Sexo	Hembra	77	55.8
	Macho	61	44.2
Edad	Adulto	97	70.3
	Juvenil	41	29.7
Condición corporal	Obeso	5	3.6
	Normal	111	80.4
	Delgado	20	14.5
	Caquéctico	2	1.5
Condición pelaje	Buena	133	96.4
	Mala	5	3.6
Alopecia	Sí	12	8.7
	No	126	91.3
Ectoparásitos	Sí	0	0
	No	138	100
Mucosas	Normales	134	97.1
	Congestivas	1	0.7
	Ictéricas	0	0
	Pálidas	3	2.2
	Cianótica	0	0
Hidratación	Normal	132	95.7
	Deshidratación leve	5	3.6
	Deshidratación moderada	1	0.7
	Deshidratación severa	0	0
Nódulos linfáticos	Normales	135	97.8
	Agrandados	3	2.2
Enfermedades anteriores	Sí	20	14.5
	No	112	81.2
	Desconoce	6	4.3
Tratamientos aplicados	Sí	32	23.2
	No	102	73.9
	Desconoce	4	2.9
Evaluación veterinaria	Sí	135	97.8
	No	3	2.2
Desparasitación	Sí	126	91.3
	No	3	2.2
	Aún no (por edad)	9	6.5

#### 4.2 Resultados del PCR para complejo *M. tuberculosis*

De los 138 animales analizados un total de cinco muestras presentaron una banda de amplificación con un tamaño entre 600–800 bp; sin embargo, no se pudieron confirmar por secuenciación. Estos animales no presentaron ningún signo evidente de enfermedad tuberculosa al momento del muestreo. Todos convivían en recintos compartidos con otros animales, tenían entre 1 y 8 años en cautiverio y el contacto con humanos era escaso (Cuadro 3).



**Figura 1.** Ubicación geográfica de los Centros de Rescate y casos sospechosos de tuberculosis.

**Cuadro 3.** Análisis descriptivo de los animales sospechosos a tuberculosis (PCR)

Centro de Rescate	Especie	Sexo	Edad	CC	CP	Muc	NL	Enfermedades anteriores
A	<i>C. jacchus</i>	M	J	N	B	N	N	No
A	<i>C. jacchus</i>	M	A	N	B	N	N	No
B	<i>A. palliata</i>	H	A	N	B	N	N	Perdió una pierna
E	<i>A. palliata</i>	M	A	N	B	N	N	No
F	<i>A. geoffroyi</i>	H	A	N	B	N	N	No

M: macho, H: hembra; A: adulto, J: juvenil; CC: condición corporal, N: normal; CP: condición pelaje, B: buena; Muc: mucosas; NL: nódulos linfáticos.

## 5. Discusión

El presente trabajo representa el primer estudio molecular que se realiza en Costa Rica para la detección de micobacterias patógenas en primates no humanos en cautiverio. Hasta el momento la mayoría de las investigaciones de tuberculosis realizadas en primates no humanos se han basado en la aplicación de una prueba de tuberculina intradérmica (Montali et al., 2001); sin embargo, en este estudio se implementó la técnica de PCR para detectar material genético de micobacterias en hisopados de fondo de boca, el cual es un método poco invasivo, fácil de realizar, requiere mínima manipulación del primate y no se ve afectada por la respuesta inmunológica del individuo en comparación con la prueba de tuberculina, reduciendo así el estrés generado al animal (Wood, 2014). Para este PCR se reporta una alta sensibilidad y especificidad (90% y 100%, respectivamente) comparado con el PCR en tiempo real (Wood et al., 2015).

Al realizar la revisión general de cada individuo y la evaluación de parámetros clínicos, el 80,4% presentaron una condición corporal normal, el 14,5% presentaron una condición corporal delgada y solamente el 1,5% de los animales muestreados tenían una

condición corporal caquéctica, pero ninguno de los animales presentó sintomatología ni antecedentes sugestivos de enfermedad pulmonar.

En el PCR cinco (3.6 %) muestras presentaron fragmentos de amplificación y se consideraron positivas, sin embargo no se pudo determinar la presencia de bacterias del complejo *M. tuberculosis* mediante secuenciación. Se recomienda realizar a estos animales, exámenes complementarios como la prueba de tuberculina y radiografías para descartar por completo la enfermedad. En los restantes 133 (96.4 %) individuos no se detectaron fragmentos de amplificación, por lo que fueron considerados como negativos.

La infección de los monos o cualquier otro animal con *M. tuberculosis* se atribuye al contacto cercano con individuos con tuberculosis activa (Rabinowitz y Conti; Ghodbane y Drancourt, 2013; Michel, 2015). La mayoría de los veterinarios de los diferentes centros de rescate indicaron que procuraban que el contacto de los empleados y turistas con los monos fuera el mínimo necesario, para evitar la transmisión de microorganismos patógenos y la impronta de los animales. Esto sumado a que Costa Rica presenta una baja incidencia de la enfermedad en humanos (8 casos/100,000 habitantes en el año 2014) (Organización Mundial de la Salud, 2014), puede ser la razón que no se confirmaran casos positivos de tuberculosis en los monos. Contrario a lo que sucede en Perú, en donde la incidencia de tuberculosis en humanos es bastante alta (101/100,000 habitantes en el año 2012) (OPS, 2014), y un estudio en monos en cautiverio encontró un 13,6% de 220 animales con bacterias del complejo *M. tuberculosis* en la boca de los animales mediante PCR (Rosenbaum et al., 2015).

La no confirmación de casos positivos constituye un primer registro de la probable ausencia de micobacterias patógenas en monos en cautiverio, sin embargo no se debe de desatender la enfermedad en la población. Se recomienda continuar monitoreando al menos una vez al año a los PNH en cautiverio para detectar tempranamente infecciones activas o

latentes. Costa Rica se encuentra en la fase de pre-eliminación de la enfermedad de tuberculosis (Organización Panamericana de la Salud, 2013), por lo tanto toda evidencia que demuestre la presencia o ausencia de tuberculosis en poblaciones de animales, es de suma importancia.

## **6. Conclusiones**

En el presente estudio no se logró determinar la presencia de bacterias del complejo *M. tuberculosis* mediante secuenciación en primates no humanos en cautiverio. Este trabajo constituye un primer registro de la probable ausencia de micobacterias patógenas en PNH, sin embargo, se recomienda no desatender la enfermedad en esta población.

## **7. Recomendaciones**

- Se recomienda realizar la prueba de tuberculina como prueba complementaria a monos que resultaron con reacciones sospechosas en PCR para confirmar o descartar la infección.
- Realizar pruebas de control de tuberculosis cada año a los primates no humanos en cautiverio para detectar tempranamente infecciones activas o latentes.
- Promover que las personas que trabajan en los centros de rescate (médicos veterinarios, voluntarios extranjeros y empleados), y que tienen contacto con los animales, presenten constancias médicas que certifiquen la ausencia de la infección

## 8. Referencias bibliográficas

- Barragán, K., & Brieva, C. (2005). Tuberculosis y micobacteriosis en primates neotropicales en cautiverio: un enfoque desde la conservación. *Rev. Med. Vet. Zoot*, 52, 128–143
- Barrueta-Acevedo, F. (2011). ¿Tuberculosis miliar en mono capuchino (*Cebus capucinus*)? Recuperado de: <http://exzooticos.blogspot.com/2011/04/tuberculosis-miliar-en-monocapuchino.html>
- Cannon, R. M., Roe, R.T. (1982). *Livestock disease survey: a field manual for veterinarians*. Australian Government Publishing Service, Canberra
- Coscolla, M., Lewin, A., Metzger, S., Maetz-Renning, K., Calvignac-Spencer, S., Nitsche, A., . . . Leendertz, F. H. (2013). Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex isolate from a wild chimpanzee. *Emerging infectious diseases*, 19(6), 969–976.
- Engel, G. A., Wilbur, A. K., Westmark, A., Horn, D., Johnson, J., & Jones-Engel, L. (2012). Naturally acquired *Mycobacterium tuberculosis* complex in laboratory pig-tailed macaques. *Emerging microbes & infections*, 1(10), e30.
- Estrada-Cely, G. E., Valencia-Aguirre, S., & Vega-Lugo, W. O. (2011). Prevalencia de tuberculosis en primates en cautiverio en el municipio de Florencia, Caquetá. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 6(2), 61–72.
- Ghodbane, R., & Drancourt, M. (2013). Non-human sources of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*, 93(6), 589–595.
- Hall TA. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Ser.* 41: 95–98.
- Huard, R. C., Oliveira, L. C., Butler, W. R., van Soolingen, D., & Ho, J. L. (2003). PCR-Based Method to Differentiate the Subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex on the Basis of Genomic Deletions. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(4), 1637–1650.

- Jones, T. C., Mohr, U., & Hunt, R. D. (2012). *Nonhuman Primates I. Tuberculosis. Monographs on Pathology of Laboratory Animals: Springer Berlin Heidelberg.*
- Leathers, C. W., & Hamm, T. E. (1976). Naturally Occurring Tuberculosis in a Squirrel Monkey and Cebus Monkey. *J Am Vet Med Assoc*, 169(9), 909–911.
- Lerche, N. W., Yee, J. L., Capurano, S. V., & Flynn, J. L. (2008). New approaches to tuberculosis surveillance in Nonhuman primates. *ILAR Journal*, 49(2), 170–178.
- Mazurek, G. H., LoBue, P. A., Daley, C. L., Bernardo, J., Lardizabal, A., Bishai, W., . . . Rothel, J. (2001). Comparison of a Whole-Blood Interferon  $\gamma$  Assay With Tuberculin Skin Testing for Detecting Latent Mycobacterium tuberculosis Infection. *JAMA*, 286(14), 1740. doi:10.1001/jama.286.14.1740
- Mätz-Rensing, K., Hartmann, T., Wendel, G. M., Frick, J. S., Homolka, S., Richter, E., . . . Kaup, F.-J. (2015). Outbreak of Tuberculosis in a Colony of Rhesus Monkeys (*Macaca mulatta*) after Possible Indirect Contact with a Human TB Patient. *Journal of Comparative Pathology*, 153(2-3), 81–91.
- Mätz-Rensing, K. & Kaup, F. J. Tuberculosis in non-human primates-the disease, pp. 1–9.
- Michel, A. L. (2015). *Zoonotic Aspects of Tuberculosis: Disease of the past or re-emerging zoonosis?:* Springer Netherlands. Recuperado de: [http://link.springer.com.una.idm.oclc.org/chapter/10.1007/978-94-017-9457-2\\_36/fulltext.html](http://link.springer.com.una.idm.oclc.org/chapter/10.1007/978-94-017-9457-2_36/fulltext.html)
- Montali, R. J., Mikota, S. K., & Cheng, L. I. (2001). *Mycobacterium tuberculosis* in zoo and wildlife species. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz*, 20(1), 291–303.
- Motzel, S. L., Schachner, R. W., Fletcher, M. A., Kanaya, B., Gomez, J. A., Ngai, D., . . . Klein, H. J. (2003). International perspectives: The future of nonhuman primate resources. *Diagnosis of Tuberculosis in Nonhuman Primates. Washington, D.C.:* National Academies Press.

- Nath, B. G., Chakraborty, A., & Rahman, T. (2012). Tuberculosis in non-human primates of Assam: use of PrimaTB STAT-PAK Assay for detection of tuberculosis. *Journal of threatened Taxa*, 4(4), 2541–2544.
- Negi, S. S., Khan, S. F., Gupta, S., Pasha, S., Khare, S., & Lal, S. (2005). Comparison of the conventional diagnostic modalities, bactec culture and polymerase chain reaction test for diagnosis of tuberculosis. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 23(1), 29.
- Oh, P., Granich, R., Scott, J., Sun, B., Joseph, M., Stringfield, C., . . . Flood, J. (2002). Human exposure following *Mycobacterium tuberculosis* infection of multiple animal species in a Metropolitan Zoo. *Emerging infectious diseases*, 8(11), 1290–1293.
- Organización Mundial de la Salud. (2014). Perfil de tuberculosis/Costa Rica. Recuperado de: [https://extranet.who.int/sree/Reports?op=Replet&name=/WHO\\_HQ\\_Reports/G2/P-ROD/EXT/TBCountryProfile&ISO2=CR&outtype=html&LAN=ES](https://extranet.who.int/sree/Reports?op=Replet&name=/WHO_HQ_Reports/G2/P-ROD/EXT/TBCountryProfile&ISO2=CR&outtype=html&LAN=ES)
- Organización Panamericana de la Salud (OPS). (2013). VI Reunión Regional de países de baja prevalencia de TB en las Américas. Organización Panamericana de la Salud.
- Organización Panamericana de la Salud (OPS). (2014). *La tuberculosis en las Américas: Informe Regional 2013*. Epidemiología, control y financiamiento. Washington, D.C
- Rabinowitz, P. M., & Conti, L. A. Zoonoses. Tuberculosis and other Mycobacterial infections.
- Rosenbaum, M., Mendoza, P., Ghersi, B. M., Wilbur, A. K., Perez-Brumer, A., Cavero Yong, N., . . . Jones-Engel, L. (2015). Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in New World Monkeys in Peru. *EcoHealth*, 12(2), 288–297.
- Sakamoto, K. (2012). The pathology of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Veterinary pathology*, 49(3), 423–439.
- Serafino-Wani, R. L. (2012). Tuberculosis Epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. *South Sudan Medical Journal*, 45(2), 45–46.

- Thrusfield, M., Ortega, C., de Blas, I., Noordhuizen, J., Frankena, K. (2001). WIN EPISCOPE 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. *Veterinary Record*. 148: 567-572.
- Une, Y., & Mori, T. (2007). Tuberculosis as a zoonosis from a veterinary perspective. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 30(5-6), 415–425.
- Van Kampen, L. *Transmissible Diseases Handbook: Tuberculosis in Zoo species: Diagnostic Update and Management Issues*.
- Wilbur, A. K., Engel, G. A., Rompis, A., A Putra, I G A, Lee, B. P. Y.-H., Aggimarangsee, N., . . . Jones-Engel, L. (2012). From the mouths of monkeys: detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA from buccal swabs of synanthropic macaques. *American journal of primatology*, 74(7), 676–686.
- Wood, R. (2014). *Oral Swab PCR as an Alternative to Sputum-based Methods for Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis*. University of Washington, Washington, D.C
- Wood, R. C., Luabeya, A. K., Weigel, K. M., Wilbur, A. K., Jones-Engel, L., Hatherill, M., & Cangelosi, G. A. (2015). Detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA on the oral mucosa of tuberculosis patients. *Scientific Reports*, 5, 8668

## Discusión general

Este trabajo representa el primer estudio transversal, que combina las técnicas diagnósticas de gota gruesa y biología molecular (PCR y secuenciación), para detectar parásitos del género *Plasmodium* en primates no humanos en cautiverio de Costa Rica. Como se analizó un 84.9 % de la población de monos en cautiverio en trece centros de rescate, este trabajo posee una buena representatividad de la población en estudio, lo que brinda validez interna (Canal-Díaz, 2006). En este estudio se encontró el parásito *P. malariae/P. brasilianum* en tres especies de primates no humanos (*A. palliata*, *A. Geoffroyi* y *C. jacchus*), lo cual concuerda con lo reportado por otros investigadores, que también encontraron *P. malariae/P. brasilianum* en monos de vida libre de Costa Rica (Chinchilla et al., 2006; Chaves et al., 2015).

La condición general de los primates no humanos en cautiverio se determinó como buena, únicamente en un 3.3 % del total de animales analizados se determinó una mala condición del pelaje. En el caso del mono congo, que resultó positivo a *P. malariae/P. brasilianum* en gota gruesa y PCR, se determinó una condición corporal delgada, además había perdido un ojo, presuntamente por peleas con otros monos. Este animal fue encontrado herido en el bosque, trasladado al Centro de Rescate para asistencia médica, y al momento del muestreo tenía un mes de haber sido ingresado. En ninguno de los otros animales analizados en el mismo centro (N=10), situado en el Pacífico Sur, se detectaron casos positivos. Es posible, que este mono adquiriera el parásito estando en vida libre y probablemente ahí se esté presentando un ciclo silvestre para el parásito, lo que se recomienda confirmar en futuros estudios (Chaves et al., 2015).

Nuestros resultados concuerdan con lo reportado por otros autores sobre la baja sensibilidad de la gota con respecto al PCR (López et al., 2011; Mixson-Hayden et al., 2010; Ndao et al., 2004); un total de cinco (3.3%) de 152 muestras resultaron positivas en SnM-PCR, mientras que solamente dos (1.3 %) resultaron positivas en gota gruesa. Estos datos revelan una baja prevalencia de parásitos del género *Plasmodium* en monos analizados en Centros de Rescate de Costa Rica, lo cual concuerda con investigaciones en otros países como Brasil y Guyana Francesa, donde los autores han reportado prevalencias inferiores al 6 % en primates no humanos en cautiverio (Fandeur et al., 2000; Araújo et al., 2013; Maeno et al., 2015).

El PCR multiplex semi-anidado arrojó 5 resultados positivos para la especie *P. malariae/P. brasilianum*, lo cual concuerda con lo descrito en la literatura, que es la especie de *Plasmodium* más frecuente en primates del Nuevo Mundo (Duarte et al., 2008; Araújo et al., 2013;). Tres de estos cinco animales portadores del parásito se encontraban recluidos en un Centro de Rescate en la zona del Caribe, en donde históricamente se han presentado la mayor parte de casos de malaria en humanos en Costa Rica (Ávila-Agüero, 2008; Grupo Técnico Nacional de Enfermedades Vectoriales Costa Rica, 2015), en esta misma región, Chinchilla y colaboradores también reportaron la presencia del parásito en monos Congo de vida libre (Chinchilla et al., 2006). Los otros dos monos portadores del parásito vivían en el Centro de Rescate en la zona del Pacífico Central y Pacífico Sur. Las localidades en donde se encontraron viviendo los animales en los centros de rescate presentaron características ambientales ideales como altitud y temperatura para la supervivencia del agente etiológico y el vector transmisor (Ávila-Agüero, 2008; Chaves et al., 2015; MINSA, 2014). En este estudio se reporta por primera vez la presencia de *P. malariae/P. brasilianum* en la especie de mono no nativa *Callithrix jacchus*.

La secuenciación determinó que el parásito *P. malariae/P. brasilianum* encontrado en el mono del Pacífico Sur es idéntico a los parásitos reportados recientemente en humanos, los cuales no habían sido detectados desde 1959 en Costa Rica (Calvo et al., 2015). Estudios basados en el análisis de la secuencia del gen 18S de *P. brasilianum* y *P. malariae* demuestran, que la similitud entre ambas especies es más del 99%, difiriendo únicamente en un polimorfismo de nucleótido simple. Hoy en día, los dos parásitos se perciben como variantes de la misma especie, que se han ido especializado en diferentes hospedadores. Es por eso que, cuando se encuentra en monos se les denomina *P. brasilianum* y cuando se encuentra en humanos *P. malariae* (Lalremruata et al., 2015).

En condiciones óptimas, donde existe un contacto cercano entre monos y seres humanos, y exista la presencia de un mosquito vector competente, los parásitos de la malaria cuartana son capaces de cruzar las fronteras entre hospedadores, dando lugar a una antropozoonosis (Kirchgatter et al., 2014; Lalremruata et al., 2015; Maeno et al., 2015). Los presentes resultados proporcionan evidencia de que los primates no humanos pueden estar actuando como reservorios de parásitos del género *Plasmodium*, pudiendo dificultar así la erradicación de la enfermedad de la malaria en el país.

Las consecuencias de esta situación son importantes y la aparición de un hospedador alternativo del parásito necesita especial atención por las autoridades de salud (Verhulst et al., 2012; Maeno et al., 2015). Se recomienda realizar estudios para determinar las especies de vectores involucrados en la transmisión del *P. malariae/P. brasilianum* en monos y humanos en las localidades donde se han encontrado monos portadores de parásitos. Costa Rica se encuentra actualmente en la fase de pre-eliminación de la enfermedad (MINSA, 2014; Grupo Técnico Nacional de Enfermedades Vectoriales Costa Rica, 2015), por tanto es

de vital importancia incluir a los primates no humanos en los programas de control y erradicación de la enfermedad.

El presente trabajo representa el primer estudio molecular que se realiza en Costa Rica para la detección de micobacterias patógenas en primates no humanos en cautiverio. Hasta el momento la mayoría de las investigaciones de tuberculosis realizadas en primates no humanos se han basado en la aplicación de una prueba de tuberculina intradérmica (Montali et al., 2001); sin embargo, en este estudio se implementó la técnica de PCR para detectar material genético de micobacterias en hisopados de fondo de boca, el cual es un método poco invasivo, fácil de realizar, requiere mínima manipulación del primate y no se ve afectada por la respuesta inmunológica del individuo en comparación con la prueba de tuberculina, reduciendo así el estrés generado al animal (Wood, 2014). Para este PCR se reporta una alta sensibilidad y especificidad (90% y 100%, respectivamente) comparado con el PCR en tiempo real (Wood et al., 2015).

Al realizar la revisión general de cada individuo y la evaluación de parámetros clínicos, el 80,4% presentaron una condición corporal normal, el 14,5% presentaron una condición corporal delgada y solamente el 1,5% de los animales muestreados tenían una condición corporal caquéctica, pero ninguno de los animales presentó sintomatología ni antecedentes sugestivos de enfermedad pulmonar.

En el PCR cinco (3.6 %) muestras presentaron fragmentos de amplificación y se consideraron positivas, sin embargo no se pudo determinar la presencia de bacterias del complejo *M. tuberculosis* mediante secuenciación. Se recomienda realizar a estos animales, exámenes complementarios como la prueba de tuberculina y radiografías para descartar por completo la enfermedad. En los restantes 133 (96.4 %) individuos no se detectaron fragmentos de amplificación, por lo que fueron considerados como negativos.

La infección de los monos o cualquier otro animal con *M. tuberculosis* se atribuye al contacto cercano con individuos con tuberculosis activa (Ghodbane & Drancourt, 2013; Michel, 2015; Rabinowitz & Conti). La mayoría de los veterinarios de los diferentes centros de rescate indicaron que procuraban que el contacto de los empleados y turistas con los monos fuera el mínimo necesario, para evitar la transmisión de microorganismos patógenos y la impronta de los animales. Esto sumado a que Costa Rica presenta una baja incidencia de la enfermedad en humanos (8 casos/100,000 habitantes en el año 2014) (Organización Mundial de la Salud, 2014), puede ser la razón que no se confirmaran casos positivos de tuberculosis en los monos. Contrario a lo que sucede en Perú, en donde la incidencia de tuberculosis en humanos es bastante alta (101/100,000 habitantes en el año 2012) (OPS, 2014), y un estudio en monos en cautiverio encontró un 13,6% de 220 animales con bacterias del complejo *M. tuberculosis* en la boca de los animales mediante PCR (Rosenbaum et al., 2015).

La no confirmación de casos positivos constituye un primer registro de la probable ausencia de micobacterias patógenas en monos en cautiverio, sin embargo no se debe de desatender la enfermedad en la población. Se recomienda continuar monitoreando al menos una vez al año a los PNH en cautiverio para detectar tempranamente infecciones activas o latentes. Costa Rica se encuentra en la fase de pre-eliminación de la enfermedad de tuberculosis (Organización Panamericana de la Salud, 2013), por lo tanto toda evidencia que demuestre la presencia o ausencia de tuberculosis en poblaciones de animales, es de suma importancia.

## **Conclusiones generales**

El hallazgo de *P. malariae/P. brasilianum* en diferentes especies de primates no humanos en cautiverio y en diversas regiones de Costa Rica, indica una amplia distribución del parásito. La similitud de las secuencias de los parásitos encontrados en humanos y en un mono sugiere, que estos últimos podrían estar actuando como reservorios de *P. malariae/P. brasilianum*, por lo que es importante incluirlos en los programas de control y erradicación.

En el presente estudio no se logró determinar la presencia de bacterias del complejo *M. tuberculosis* mediante secuenciación en primates no humanos en cautiverio. Este trabajo constituye un primer registro de la probable ausencia de micobacterias patógenas en PNH, sin embargo, se recomienda no desatender la enfermedad en esta población.

## **Recomendaciones generales**

- Informar a las autoridades de salud para que evalúen la inclusión de los primates no humanos en los programas de control y erradicación de la enfermedad.
- Realizar investigaciones para determinar los vectores involucrados en la transmisión del parásito, en zonas donde se han encontrado primates no humanos viviendo en cautiverio infectados con *P. malariae/P. brasilianum*.
- Se recomienda realizar la prueba de tuberculina como prueba complementaria a monos que resultaron con reacciones sospechosas en PCR para confirmar o descartar la infección.

- Realizar pruebas de control de tuberculosis cada año a los primates no humanos en cautiverio para detectar tempranamente infecciones activas o latentes.
- Promover que las personas que trabajan en los centros de rescate (médicos veterinarios, voluntarios extranjeros y empleados), y que tienen contacto con los animales, presenten constancias médicas que certifiquen la ausencia de la infección.

Anexo 1



Universidad Nacional de Costa Rica



Centro de rescate: \_\_\_\_\_

Coordenadas geográficas: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

Ficha clínica			
Especie			
Nombre común			
Identificación			
Sexo <input type="checkbox"/> Masculino <input type="checkbox"/> Femenino	Edad <input type="checkbox"/> Adulto <input type="checkbox"/> Juvenil	Temperatura (°C):	Peso:
Condición física <input type="checkbox"/> Obeso <input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Delgado <input type="checkbox"/> Caquéctico	Condición del pelaje <input type="checkbox"/> Buena <input type="checkbox"/> Mala Observaciones:	Alopecia <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No	Ectoparásitos <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No
Mucosas <input type="checkbox"/> Normales <input type="checkbox"/> Congestivas <input type="checkbox"/> Ictéricas	<input type="checkbox"/> Pálidas <input type="checkbox"/> Cianótica	Hidratación <input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Desh. leve <input type="checkbox"/> Desh. Moderada <input type="checkbox"/> Desh. severa	Nódulos linfáticos: <input type="checkbox"/> Normales <input type="checkbox"/> Agrandados
Ficha de Manejo			
Dieta: _____			
Frecuencia de alimentación (raciones por día): _____			
Apetito: <input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Disminuido <input type="checkbox"/> Aumentado <input type="checkbox"/> Anorexia			
Tiempo en cautiverio: _____			
Lugares previos al lugar actual			
Enfermedades anteriores <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Desconoce	En caso de que su respuesta sea Si, cuáles enfermedades ha presentado el animal: _____ _____		
Tratamientos aplicados <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Desconoce	En caso de que su respuesta sea Si, cuáles tratamientos médicos han sido aplicados al animal: _____ _____		
Evaluación veterinaria <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No	Frecuencia de evaluación: _____ _____		
Desparasitación <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No	Frecuencia de desparasitación: _____ _____		