

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS
MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS INFECCIOSAS

JULIANA HELENA DA SILVA BARROS

**AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE TRIPANOSOMATÍDEOS
(PROTOZOA: KINETOPLASTIDA) EM MORCEGOS
NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

RIO DE JANEIRO
2009

AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE TRIPANOSOMATÍDEOS
(PROTOZOA: KINETOPLASTIDA) EM MORCEGOS NO
ESTADO DO RIO DE JANEIRO

JULIANA HELENA DA SILVA BARROS

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para a obtenção de grau mestre em Ciências.

Orientado por Prof. Dr. Maria de Fátima Madeira e Prof. Dr. Phyllis Catharina Romijn.

RIO DE JANEIRO
2009

Ficha catalográfica

XDOO Barros, Juliana Helena da Silva

AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE TRIPANOSOMATÍDEOS (PROTOZOA: KINETOPLASTIDA) EM MORCEGOS NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO / BARROS, JULIANA HELENA DA SILVA, 2009

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS, PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS INFECCIOSAS 2009 BIBLIOTECA 00F

1 assunto 2 assunto 3 assunto 4 assunto 5 assunto. I

CDD: 000.000

CDD:

00000

JULIANA HELENA DA SILVA BARROS

**AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE TRIPANOSOMATÍDEOS
(PROTOZOA: KINETOPLASTIDA) EM MORCEGOS
NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para a obtenção de grau mestre em Ciências.

Orientadores: Prof. Dr. Maria de Fátima Madeira
Prof. Dr. Phyllis Catharina Romijn

Aprovada em: ____ / ____ / ____ .

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Tânia Maria Pacheco Valente (Presidente)

Doutor em Biologia Parasitária

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – Fiocruz

Prof. Dr. Teresa Cristina Bergamo do Bomfim (Componente)

Doutor em Ciências Veterinárias

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ

Prof. Dr. Aline Fagundes da Silva (Componente)

Doutor em Vigilância Sanitária

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – Fiocruz

Aos meus pais que tanto amo.

*“Vá tão longe quanto possa ver.
Quando chegar lá, você poderá
ver ainda mais longe.”*

(Carlye)

AGRADECIMENTOS

Na verdade, tenho muito que agradecer...

São tantas as pessoas que precisei e me ajudaram que, se fosse relacioná-las preencheria muitas páginas desse trabalho!

Venho inicialmente, agradecer a **Deus**, que tem dado a mim todas as coisas e por permitir que eu chegasse até aqui.

Aos meus pais, **Albano e Heloísa**, que me apoiaram de todas as maneiras possíveis a vencer esta etapa, que de tão marcante, irá sempre repercutir como uma vitória na minha vida e na deles também.

A minha orientadora, **Fátima**, com quem iniciei meus trabalhos científicos, agradeço de maneira especial pela constante orientação, pelos ensinamentos de ética e responsabilidade, pelo incentivo em todas as etapas da minha formação profissional, mas acima de tudo pelo carinho e amizade.

A minha “co-orientadora”, **Phyllis**, por todo apoio, amizade e ajuda em todos os momentos que precisei, principalmente nos trabalhos de campo, que foram de suma importância para a realização dessa dissertação.

As minhas amigas, **Cibele e Andressa**, que tiveram constante e presente participação durante a realização deste trabalho e, principalmente, pela amizade gerada durante estes anos de convivência.

Aos **meus amigos do Laboratório de Vigilância em Leishmanioses, IPEC/Fiocruz**, por todos os momentos que passamos juntos.

Ao **núcleo de Coleção de Triatomíneos, IOC/Fiocruz**, pelo fornecimento das ninfas de triatomíneos, de maneira tão gentil, sempre que necessário.

Ao **núcleo de Coleção de Tripanosomatídeos**, IOC/Fiocruz, por ceder as amostras de referências de tripanosomatídeos utilizadas neste trabalho.

Aos **técnicos da Equipe de Vigilância, Hospedeiros, Reservatórios e Animais Peçonhentos**, SESDEC-RJ, pela estrutura de pesquisa em campo, disponibilidade e companheirismo no trabalho.

A todos, enfim, que auxiliaram, direta ou indiretamente, na realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

Barros, J.H.S. **Avaliação da ocorrência de tripanosomatídeos (Protozoa: Kineto-plastida) em morcegos no Estado do Rio de Janeiro.** Rio de Janeiro, 2009 XX f. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

RESUMO

Os morcegos são mamíferos pertencentes à ordem dos Quirópteros. São animais que possuem hábitos alimentares bastante diversificados, apresentando espécies importantes no equilíbrio e diversidade biológica das espécies vegetais, como também atuantes na transmissão de doenças para o homem e para os animais. No município do Rio de Janeiro, pouco se conhece sobre a ocorrência de tripanosomatídeos, nem tampouco sobre a possibilidade da participação desses animais no ciclo de transmissão de certos tripanosomas. Este trabalho objetivou avaliar, por hemocultura, a infecção natural por flagelados tripanosomatídeos em morcegos capturados em diferentes municípios do Estado do Rio de Janeiro e caracterizar os isolados obtidos quanto à sensibilidade ao sistema completo; potencial infectivo para macrófagos murinos “in vitro”; potencial infectivo para *Triatoma infestans* e análise do perfil isoenzimático (MLEE). Durante o estudo, flagelados tripanosomatídeos foram encontrados em 29 (30,2%) dos 96 morcegos avaliados, dos quais 28 possuíam hábitos hematófagos (*D. rotundus*) e 1 hábito insetívoro (*Lonchorhina aurita*), capturados em diferentes municípios do estado do Rio de Janeiro. Das amostras isoladas, 12 foram selecionadas para estudos de caracterização, todas apresentando padrões biológicos semelhantes, todas sendo sensíveis ao sistema completo, apresentando 100% de lise das formas epimastigotas; não foram capazes de infectar macrófagos murinos “in vitro” nem tampouco puderam infectar e colonizar glândulas salivares, hemolinfa e o trato intestinal de *Triatoma infestans*. Na análise isoenzimática, avaliado por 9 loci, três zimodemas foram observados, todos, diferentes das amostras de referências *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli* e *Trypanosoma dsterrensis*, empregadas nesta análise. Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que flagelados do gênero *Trypanosoma* podem ser isolados de morcegos com diferentes hábitos alimentares no estado do Rio de Janeiro e embora nenhuma amostra tenha sido identificada como *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli* ou *Trypanosoma dsterrensis*, observou-se três padrões fenotípicos distintos entre as doze amostras estudadas. Espera-se, dessa forma, contribuir para as ações de vigilância a partir do conhecimento das espécies de tripanosomatídeos circulantes em morcegos do Estado do Rio de Janeiro.

Palavras-chave: 1. Chiroptera. 2. Hemocultura. 3. Trypanosomatidae. 4. Zimodema. 5. Brasil.

Barros, J.H.S. **Avaliação da ocorrência de tripanosomatídeos (Protozoa: Kinetoplastida) em morcegos no Estado do Rio de Janeiro.** Rio de Janeiro, 2009 XX f. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

ABSTRACT

Bats are mammals belonging to the order Chiroptera. These animals have very different alimentary habits, several species being important in the balance and biological diversity of plant species, as well as being active in the transmission of diseases to man and to animals. In the state of Rio de Janeiro, little is known about the occurrence of trypanosomatids, neither the possibility of participation of these animals in the cycle of transmission of certain trypanosomes. This study aimed at the evaluation of the natural infection by flagellates trypanosomatids in bats captured in different municipalities in the state of Rio de Janeiro, by blood culture, and characterizing the obtained isolates in relation to their sensitivity to the complement system; their infecting potential to *in vitro* murine macrophages; their infecting potential to *Triatoma infestans* and the analysis of the isoenzymatic profile (MLEE). During the study, flagellated tripanosomatids were identified in 29 (30,2%) of the 96 specimens examined, being 28 of the samples originated from bats of hematophagous habits (*Desmodus rotundus*) and 1 insectivorous habit (*Lonchorhina aurita*), caught in different municipalities of the state of Rio de Janeiro. From the isolated samples, 12 were selected for studies of characterization, all presenting similar biological standards, all were sensitive to complement, presenting 100% lysis of epimastigote forms; they neither were capable of infecting murine macrophages *in vitro* neither being able to infect and colonize salivary glands, hemolymph and the intestinal tract of *Triatoma infestans*. In isoenzyme analyses, assessed for 9 loci, three zimodemes were observed, all different of the samples of reference *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma desterrrensis*, used in this study. The results of this study showed that flagellates of the genus *Trypanosoma* can be isolated from bats with different alimentary habits in the state of Rio de Janeiro and although no samples was identified as *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli* or *Trypanosoma desterrrensis*, three distinct phenotypic pattern among the twelve samples were observed. It is expected that these results contribute to the surveillance activities towards the knowledge of the occurrence of trypanosomatids in bats in the state of Rio de Janeiro.

Key-words: 1. Chiroptera. 2. Blood culture. 3. Trypanosomatidae. 4. Zimodeme. 5. Brazil.

SUMÁRIO

1. Introdução	1
2. Revisão de Literatura	4
2.1. FAMÍLIA TRIPANOSOMATIDAE: CONCEITOS TAXONÔMICOS GERAIS	4
2.2. QUIRÓPTEROS E PARASITAS DO GÊNERO <i>Trypanosoma</i>: CONSIDERAÇÕES HISTÓRICAS E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA NO MUNDO	5
2.3. QUIRÓPTEROS E PARASITAS DO GÊNERO <i>Trypanosoma</i>: DISTRIBUIÇÃO NO BRASIL	9
2.4. QUIRÓPTEROS E PARASITAS DO GÊNERO <i>Leishmania</i>	14
3. Material e Métodos	16
3.1. ÉTICA E BIOSSEGURANÇA	16
3.2. MANEJO COM OS MORCEGOS	16
3.3. HEMOCULTURA	16
3.4. PARASITAS	16
3.5. ANÁLISE MORFOMÉTRICA	16
3.6. AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE AO SISTEMA COMPLEMENTO	16
3.7. INDUÇÃO DA METACICLOGÊNESE	18
3.8 - INFECÇÃO EXPERIMENTAL “IN VITRO”	18
3.9 - INFECÇÃO EM TRIATOMÍNEOS	19
3.10 - ELETROFORESE DE ENZIMAS	19
4. Resultados	21
4.1. HEMOCULTURAS	21
4.2. PARASITAS	22
4.3. ANÁLISE MORFOMÉTRICA	23
4.4. AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE AO SISTEMA COMPLEMENTO	24
4.5. INDUÇÃO DA METACICLOGÊNESE	25
4.6. INFECÇÃO EXPERIMENTAL “IN VITRO”	25
4.7 - INFECÇÃO EM TRIATOMÍNEOS	27
4.8 - ELETROFORESE DE ENZIMAS	27
5. Discussão	30
6. Conclusão	35
7. Referências Bibliográficas	36
Anexos	42
Anexo 1 – Licença da Com.ão de Ética em Uso de Animais (CEUA/Fiocruz)	43
Anexo 2 – Artigo publicado: Revista da Soc. Brasileira de Medicina Tropical	45
Anexo 3 – Artigo submetido ao periódico Parasitology	49

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<i>Figura 1. Mapa do estado do Rio de Janeiro assinalando os municípios onde foram realizadas as capturas</i> _____	21
<i>Tabela 1. Resultado da avaliação, por hemocultura, de morcegos capturados em diferentes municípios do Estado do Rio de Janeiro</i> _____	22
<i>Tabela 2. Relação dos isolados de tripanosomatídeos considerados para as metodologias propostas</i> _____	23
<i>Figura 2. Fotomicrografia de flagelados tripanosomatídeos isolados de morcegos capturados no município de Miracema</i> _____	24
<i>Tabela 3. Avaliação da infecção experimental "in vitro" em macrófagos murinos de 12 amostras isoladas de morcegos, em diferentes intervalos de tempo</i> _____	26
<i>Tabela 4. Avaliação da infecção experimental de 12 amostras isoladas de morcegos em <i>Triatoma infestans</i></i> _____	27
<i>Quadro 1. Posição dos eletromorfos apresentados em nove sistemas enzimáticos</i> _____	28
<i>Figura 3. Dendrograma utilizando o coeficiente de similaridade de Simple Matching baseado no perfil fenético obtido por eletroforese de isoenzimas</i> _____	29

1. INTRODUÇÃO

Os morcegos são mamíferos pertencentes à classe Mammalia, que compreende 19 ordens, entre as quais está a dos Quirópteros, onde estão agrupados. O termo Chiroptera significa mão (chiro) e asas (ptero), ou seja, animais possuidores das mãos transformadas em asas, representando os únicos mamíferos que possuem capacidade de vôo. Atualmente existem cerca de 1000 espécies descritas, distribuídas em duas sub-ordens: Megachiroptera e Microchiroptera que ocorrem em praticamente todos os continentes com exceção da Antártida. A América Latina possui a maior diversidade da fauna de morcegos incluindo espécies com os mais variados hábitos alimentares. No Brasil, presume-se que existam aproximadamente 167 espécies de quirópteros distribuídos por todo o país (REIS et al. 2006). São animais com hábitos alimentares bastante diversificados, apresentando-se como espécies frugívoras, polínívoras, folívoras, insetívoras e hematófagas. De acordo com essas características, podem representar papel ecológico relevante, atuando como importantes predadores de grande número de insetos, no processo de polinização, que contribui para variabilidade genética das espécies vegetais, na dispersão e distribuição de sementes ou mesmo, atuando como transmissores de doenças para o homem e animais.

Das inúmeras espécies de morcegos já descritas, apenas três são hematófagas, de ocorrência exclusiva no continente americano. *Diphylla ecaudata* e *Diaemus youngi* alimentam-se preferencialmente em aves e *Desmodus rotundus* em aves e inúmeras espécies de outros vertebrados. Destas espécies, *Desmodus rotundus*, conhecido popularmente como vampiro-comum é o mais estudado, por constituir um papel importante na transmissão de certas doenças como a raiva, ou mesmo, pelos prejuízos econômicos acarretados pela espoliação aos animais de criação. Essa espécie é encontrada desde o norte do México até o norte da Argentina (MAYEN, 2003).

A investigação da presença de hemoflagelados do gênero *Trypanosoma* em animais silvestres e domésticos tem sido conduzida em diferentes áreas geográficas, buscando principalmente o conhecimento da circulação de determinadas espécies. Entre os animais silvestres encontrados naturalmente infectados por tripanosomas, os morcegos merecem especial atenção, já que muitas espécies adaptam-se aos ambientes modificados e instalam-se em áreas domiciliares, representando um potencial para a disseminação no ambiente doméstico e peri-

doméstico. Por outro lado, deve-se levar em conta, também, que as colônias de morcegos, eventualmente trocam de abrigo, constituindo-se assim possíveis elementos de dispersão de algumas espécies de tripanosomatídeos que podem ser agentes de importantes doenças.

A presença de diferentes espécies de tripanosomas em morcegos é relatada em diversas regiões do mundo. Entre estas podemos citar nas Américas, a infecção natural por *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da Doença de Chagas. Embora não se conheça o real papel desses mamíferos no ciclo epidemiológico do *Trypanosoma cruzi* no ambiente silvestre (SARAVIA et al. 1987), cabe ressaltar, que esses mamíferos podem atuar ao mesmo tempo como hospedeiros e vetores de algumas espécies de tripanosomas. Além disso, espécies importantes na medicina veterinária como *Trypanosoma equiperdum* e *Trypanosoma evansi* e outros tripanosomas específicos desses animais, são relatados em morcegos, sendo que nestes últimos, pouco se conhece sobre o ciclo natural.

A infecção de morcegos por espécies do subgênero *Schizotrypanum* já foi descrita em várias partes do mundo: *Trypanosoma pteropy* e *Trypanosoma hipposideii* (Austália); *Trypanosoma dionisii* (Europa); *Trypanosoma hedrick* e *Trypanosoma myoti* (Canadá); *Trypanosoma cruzi* (América) (BOWER; WOO, 1981a) *Trypanosoma desterrensis* (Brasil) (GRISARD et al. 2003) e espécies de distribuição cosmopolita como *Trypanosoma vespertilionis* (BOWER; WOO, 1981b). O encontro da infecção natural por espécies do subgênero *Herpetosoma* e *Megatrypanum* parece ser mais raro que a infecção pelo subgênero *Schizotrypanum* (GRISARD et al. 2003), embora sejam descritos, no Brasil, diversos relatos da infecção por *Trypanosoma (M.) pessoai* no estado de São Paulo (DEANE; SUGAY, 1963); no estado do Pará (DEANE, 1964) e no estado do Rio de Janeiro (VILAR et al. 2004).

A troca de abrigos e a adaptação aos ambientes modificados, que são hábitos comuns desses mamíferos, constituem um importante fator na disseminação das doenças associadas a esses animais. Sendo assim, tanto morcegos como várias espécies de triatomíneos e outros insetos vetores, têm seu domicílio em habitações humanas ou próximas à ela, como grutas, troncos (ocos) e copa de árvores, onde entram em contato com o ser humano e animais domésticos (BARRETO, 1968).

No estado do Rio de Janeiro, estudos com quirópteros centram-se principalmente no monitoramento do vírus rábico em espécies de hábitos hematófagos, que constituem os principais disseminadores da Raiva para os herbívoros. Associado a esse Programa, flagelados tripanosomatídeos têm sido isolados de morcegos com diferentes hábitos alimentares, demonstrando a importância da avaliação em nível abrangente dos parasitas que possam estar

circulando em quirópteros, sendo a identificação desses isolados fundamentais para tal conhecimento (BARROS et al, 2008).

Por outro lado a possibilidade da circulação de *Trypanosoma cruzi* entre esses animais no município do Rio de Janeiro deve ser investigada. Por essa razão, associado ao Programa de Controle da Raiva no Estado do Rio de Janeiro, foi avaliado entre os anos de 2004 e 2008 a presença de representantes da família Trypanosomatidae, por hemocultura, em morcegos capturados.

O objetivo geral deste estudo foi avaliar a ocorrência de tripanosomatídeos em morcegos em diferentes municípios do estado do Rio de Janeiro e caracterizar, por métodos morfológicos, biológicos e bioquímicos, isolados obtidos desses animais.

E como objetivos específicos:

- Avaliar a circulação de tripanosomatídeos entre morcegos no Estado do Rio de Janeiro, através da hemocultura;
- Verificar a sensibilidade das amostras isoladas à lise pelo sistema complemento;
- Avaliar a infectividade dos isolados “in vitro” empregando cultura de macrófagos murinos;
- Avaliar a susceptibilidade do *Triatoma infestans* aos isolados obtidos durante o estudo;
- Analisar os perfis eletroforéticos obtidos com todos os isolados, comparando-os com outras amostras de tripanosomas.

Dessa forma, com os resultados obtidos nessa dissertação, esperamos estar contribuindo com informações úteis no âmbito das ações de vigilância epidemiológica, através do mapeamento e conhecimento das espécies de tripanosomas que ocorrem em morcegos no estado do Rio de Janeiro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. FAMÍLIA TRYPANOSOMATIDAE: CONCEITOS TAXONÔMICOS GERAIS

A ordem Kinetoplastida (HONIGBERG, 1963) (Protozoa: Kinetoplastida) engloba um grupo de protozoários flagelados identificados pela presença do cinetoplasto, que é uma estrutura que contém DNA extranuclear condensado. A família Trypanosomatidae destaca-se nesta ordem por conter agentes etiológicos responsáveis por doenças nos seres humanos e animais. Esta família compreende gêneros que podem parasitar plantas (*Phytomonas*), insetos (*Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Leptomonas* e *Herpetomonas*), répteis (*Sauroleishmania*) e mamíferos (*Endotrypanum*, *Trypanosoma* e *Leishmania*), sendo os dois últimos gêneros os mais importantes em saúde pública (VICKERMAN, 1976).

O gênero *Trypanosoma* (GRUBY, 1894) inclui diferentes espécies que parasitam o sangue e tecidos de vertebrados, sendo algumas, causadoras de doenças de considerável importância médica e veterinária na África, Ásia e nas Américas, conhecidas de acordo com o agente etiológico como Tripanosomiase Africana e Tripanosomiase Americana (BARRET et al. 2003). Os parasitas são transmitidos aos vertebrados por via inoculativa (a partir de formas metacíclicas geradas no tubo digestivo ou nas glândulas salivares) ou contaminativa (metacíclicos gerados na ampola retal e eliminado junto as fezes). Essa diferença biológica observada no modo de transmissão aos vertebrados, reuniu os tripanosomas que ocorrem em mamíferos em duas seções (Salivaria e Stercoraria) nelas incluindo diferentes subgêneros.

Segundo HOARE (1972) na Seção Salivaria estão alocados 4 subgêneros, descritos abaixo, que englobam parasitas transmitidos por Glossinas, de ocorrência exclusiva na África, com exceção de *Trypanosoma evansi*, *Trypanosoma equinum* e *Trypanosoma equiperdum* que ocorrem nas Américas.

a) *Trypanozoon*: espécies que apresentam pequeno cinetoplasto subterminal; são transmitidos ciclicamente como *Trypanosoma (Trypanozoon) brucei* e são causadores da doença conhecida como “doença do sono”. Englobam também espécies como o *Trypanosoma evansi*, *Trypanosoma equinum* e *Trypanosoma equiperdum* que parasitam cavalos.

b) *Nannomonas*: morfologicamente são pequenos, com cinetoplasto de tamanho médio, sempre marginal. Englobam espécies *Trypanosoma (N) congolense* que parasitam bovinos, ovinos e caprinos e *Trypanosoma (N) simiae* que parasitam porcos e macacos.

c) *Duttonella*: compreendem tripanosomas com cinetoplasto grande, sendo descrito apenas uma espécie, *Trypanosoma (D) vivax*, que parasita o gado bovino.

d) *Pycnomonas*: tripanosomas largos e monomórficos com cinetoplasto pequeno e subterminal como *Trypanosoma (P) suis* que parasitam porcos.

Nesta Seção, foi alocado inicialmente, também, o subgênero *Tejeraia* proposto por AÑEZ (1983), que englobava espécies como *Trypanosoma (Tejeraia) rangeli*. Atualmente a posição taxonômica desta espécie é discutível, sendo alocado, por diversos autores na Seção Stercoraria (GRISARD et al. 2003).

Na Seção Stercoraria, 3 subgêneros são descritos:

a) *Megatrypanum*: tripanosomas grandes com cinetoplasto próximo ao núcleo e afastado da extremidade posterior, cuja reprodução no mamífero é feita na forma epimastigota. São descritas as espécies como *Trypanosoma (M.) theileri* associado ao gado bovino; *Trypanosoma (M.) melophagium*, que parasitam carneiros e *Trypanosoma (M) conorhini*, descrito em ratos e macacos.

b) *Herpetosoma*: tripanosomas de tamanho médio, cinetoplasto em forma de bastão e núcleo discretamente posicionado na porção anterior, apresentando extremidade posterior do corpo pontuda. A reprodução no mamífero é feita sob a forma amastigota ou epimastigota sendo a maioria parasita de roedores como *Trypanosoma (H) lewisi*, de ratos e *Trypanosoma (H) musculi*, de camundongos.

c) *Schizotrypanum*: são tripanosomas pequenos, com cinetoplasto grande e próximo da extremidade posterior, cuja multiplicação no mamífero é sempre intracelular, sob a forma amastigota. Neste subgênero está incluído *Trypanosoma (S.) cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas e algumas espécies encontradas em morcegos como *Trypanosoma (S.) vespertilionis* e *Trypanosoma (S.) dionisii* (GARDNER; MOLYNEUX, 1988).

2.2. QUIRÓPTEROS E PARASITAS DO GÊNERO *Trypanosoma*: CONSIDERAÇÕES HISTÓRICAS E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA NO MUNDO

Os morcegos são animais associados, em diferentes aspectos, às questões em saúde pública, principalmente por albergarem parasitas causadores de importantes doenças. Apesar dos inúmeros relatos da infecção natural desses animais pelos mais variados agentes etiológicos, não se dispõe ainda de um quadro claro e completo de seu significado, principalmente pelo desconhecimento do ciclo natural de algumas espécies (FIELD et al. 2004). Dentre os agentes associados aos morcegos, destacamos os parasitas da Família Trypanosomatidae, cuja

infecção por tripanosomas vem sendo feita há muitos anos em diferentes locais do mundo (DIAS; ROMAÑA, 1939).

Os primeiros registros da presença de flagelados tripanosomatídeos foi feito na Itália, ainda no século XIX, quando Dionisi, no ano de 1899, isolou flagelados de morcegos da espécie *Minopterus shreibersii*. Este isolado, apesar de não ter sido adequadamente identificado, serviu de marco para outros relatos que foram sendo publicados. Anos mais tarde, também na Itália, uma amostra de tripanosoma foi isolada de morcego da espécie *Vesperugo noctula* (BATTAGLIA, 1904) e *Pipistrellus kuhli* (SERGENT; SERGENT, 1905), sendo ambos os isolados nomeados como *Trypanosoma vespertilionis*.

Betterncourt & França, em Portugal, no ano de 1905, ao isolar um tripanosoma de diferentes espécies morcegos, em homenagem à Dionisi, deu o nome de *Trypanosoma dionisii* para este achado. Entretanto, após tomar conhecimento da publicação de Battaglia (BATTAGLIA, 1904), reconsiderou e nomeou os parasitas encontrados como *Trypanosoma vespertilionis*. (BETTENCOURT; FRANÇA, 1905). Na França (em Alsanse), foi descrito um tripanosoma, isolado de *Pipistrellus pipistrellus* que apresentou diferenças com *Trypanosoma vespertilionis*, sendo então nomeado *Schizotrypanum pipistrelli* (CHATTON; COURRIER, 1921a,b), principalmente pela característica das formas tripomastigotas (longas e finas) observada em cultura.

Por alguns anos, acreditou-se na hipótese de *Trypanosoma dionisii*, *Schizotrypanum pipistrelli* e *Trypanosoma vespertilionis* serem a mesma espécie, pela semelhança descrita entre os isolados (WENYON, 1926; DIAS, 1936). Somente anos mais tarde, a partir da observação de diferenças morfológicas descritas por BAKER & THOMPSON (1971) e na densidade de flutuação do DNA (NEWTON, 1971), em amostras isoladas de *Pipistrellus pipistrellus* e *Nyctalus noctula*, concluiu-se que *Trypanosoma dionisii* e *Trypanosoma vespertilionis* constituíam espécies distintas, fato aceito pela comunidade científica até os dias atuais.

Nas Américas, a primeira referência à presença de tripanosomatídeos no sangue de morcegos, foi feita por Cartaya em Cuba (CARTAYA, 1910). Este autor descreveu a infecção natural da espécie *Carolia perspicillata perspicillata* por um flagelado semelhante ao *Trypanosoma cruzi*, sendo denominado *Trypanosoma phyllostomae*.

Em estudos realizados por Johnson, em 1935, no Panamá, um exemplar da espécie hematófaga *Desmodus rotundus* foi encontrada naturalmente infectada por um tripanosomo, identificado como *Trypanosoma hippicum*, parasita causador de doença fatal principalmente para os cavalos. Este relato foi de grande importância, uma vez que, pela primeira vez associava-se os morcegos ao ciclo de transmissão de tripanosomatídeos, que, neste caso, durante o

ato de hematofagia, poderiam estar atuando como disseminadores desses parasitas entre os eqüinos (JOHNSON, 1936).

No mesmo ano, na Argentina, foi isolado do morcego *Nyctinomus macrotis* um flagelado do subgênero *Schizotrypanum* (MAZZA, 1935), sendo um ano mais tarde, essa mesma amostra encontrada em morcegos da espécie *Myotis nigricans* (ROMAÑA, 1936). Em 1939, no mesmo país, o morcego *Eumops bonariensis beckeri* foi identificado naturalmente infectado pelo mesmo flagelado descrito anteriormente. A partir da alimentação de exemplares de *Triatoma infestans* neste morcego, observou-se o desenvolvimento e a proliferação deste parasita no tubo digestivo. Adicionalmente, a infecção desta espécie para hospedeiros mamíferos, foi comprovada, experimentalmente, a partir da inoculação de formas de cultura para camundongos (DIAS; ROMAÑA, 1939).

A infecção natural de morcegos por espécies de tripanosomas pertencentes ao subgênero *Schizotrypanum* parece ser mais comum do que com os parasitas dos subgêneros *Herpetosoma* e *Megatrypanum* (GRISARD et al. 2003). Na Venezuela, em 1942, pesquisadores encontraram o morcego *Phyllostomus hastatus* naturalmente infectado por um flagelado caracterizado como *Schizotrypanum*. Tal parasita foi facilmente cultivável, porém, tentativas de infecção em triatomíneos e camundongos foram fracassadas, apresentando infecções passageiras. Quando triatomíneos (*Rhodnius prolixus* e *Eutriatoma maculata*) alimentaram-se em morcegos infectados adquiriram inconstantemente o parasitismo, podendo perdê-lo espontaneamente com o tempo. E quando camundongos foram inoculados com o conteúdo intestinal de barbeiros houve apenas infecção benigna e passageira nos animais (PIFANO; DIAS, 1942). Nessa ocasião, as características biológicas eram, muitas vezes, as únicas ferramentas de identificação de amostras isoladas.

Em 1951, o morcego *Eptesicus fuscus*, foi encontrado infectado por uma espécie de tripanosoma em Minnessota, Estados Unidos. O isolamento foi feito por hemocultura e a identificação morfológica parasita demonstrou dimensões similares à *Trypanosoma cruzi*, mas, não houve sucesso nas tentativas de infecção em animais de laboratórios. Em exames histopatológicos de órgãos de três morcegos infectados pelo tripanosoma, não foi encontrado formas do parasita em nenhum estágio evolutivo nos tecidos (HEDRICK, 1955).

Durante investigação ecológica, envolvendo morcegos capturados num zoológico da Holanda, em 1957, duas espécies de tripanosomas foram isoladas por hemocultura e identificadas morfolologicamente, através de esfregaços sanguíneos corados como *Trypanosoma vespertilionis*, isolados da espécie *Nyctalus noctula* e *Trypanosoma pipistrelli* de *Myotis mystacinus* e *Pipistrellus pipistrellus*. Foram também isolados tripanosomas de *Myotis nattereri*,

entretanto, os mesmos não puderam ser identificados pela dificuldade de crescimento desta espécie em cultura. Por estudos morfológicos, ambas espécies de *Trypanosoma* foram similares a *Trypanosoma cruzi* (GOEDBLOED et al. 1964).

Em território africano, relatos da infecção natural de morcegos também são descritos desde a década de 60. Em 1963, um tripanosoma identificado como similar ao *Trypanosoma megadermae* foi encontrado infectando o morcego insetívoro *Hipposideros caffer*. Na ocasião não foi possível propor um nome específico para este parasita. Ectoparasitas da espécie *Stric-ticimex brevispinosus* coletado do morcego infectado foram dissecados e alguns mostraram as mesmas formas do tripanosoma em vários estágios de desenvolvimento observada no morcego. Formas metacíclicas foram encontradas na ampola retal. O mesmo aconteceu para ectoparasitas coletados na parede da caverna onde foi realizada a captura (BERGHE et al. 1963).

A presença e identificação de flagelados em artrópodes que habitam espaços com morcegos têm sido também foco de atenção em diferentes estudos, visando obter maior conhecimento sobre o ciclo de transmissão natural das espécies de tripanosomas que são descritas em morcegos. A infecção natural de *Cimex pipistreli*, capturado em locais habitados por morcegos infectados por *Trypanosoma dionisii* e *Trypanosoma vespertilionis*, trouxe fortes suspeitas sobre a possível competência vetorial desta espécie de triatomíneo para tripanosomas em morcegos britânicos (GARDNER; MOLYNEUX, 1988).

Em recente estudo, foi demonstrada a infecção experimental de morcegos por *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli*, tanto por via oral, a partir da ingestão de triatomíneos infectados, como por via contaminativa, expondo morcegos aos dejetos de triatomíneos. Este estudo demonstrou a grande importância que os morcegos, independente do seu hábito alimentar, podem assumir no ciclo de transmissão de protozoários tripanosomatídeos (THOMAS et al. 2007).

No Leste da África, em áreas de Uganda, Kenya e Tanzânia, usando a técnica do hematócrito, morcegos foram investigados para a presença de tripanosomatídeos. Três espécies de tripanosomas foram encontradas em morcegos insetívoros, sendo que nenhuma das espécies demonstraram infectividade para camundongos. Os tripanosomas descritos nesta pesquisa foram identificados como: *Trypanosoma vespertilionis*, *Trypanosoma heybergi* e *Trypanosoma mpapuense*. Nenhum morcego frugívoro foi encontrado infectado nessa ocasião. (WOO; HAWKINS, 1975).

Na Costa Rica, durante um estudo epidemiológico focado nas Leishmanioses, um grupo de morcegos foi capturado em árvores onde estavam em associação com o flebótomo *Lutzomyia vespertilionis*. Em um exemplar de morcego insetívoro, *Saccopteryx bilineata*, um

grande tripanosomo foi observado por esfregaço sanguíneo. Além disso, o xenodiagnóstico, realizado neste exemplar com triatomíneos da espécie *Rhodnius prolixus* e *Rhodnius neglectus*, demonstraram resultados positivos. O parasita foi nomeado *Trypanosoma leonidasdeanei* em homenagem ao Dr. Leônidas Deane, uma vez que esse parasita estava sendo descrito pela primeira vez (ZELEDÓN; ROSABAL, 1969).

O primeiro relato de tripanosomatídeo associados à morcegos na Ásia foi em 1977, no Iraque. Exemplos da espécie *Pipistrellus kuhli* foram encontrados infectados por flagelados do subgênero *Schizotrypanum* e a espécie *Taphozous nudiventris* por tripanosomas do subgênero *Megatrypanum*. Além disso, no esfregaço sanguíneo de dois exemplares de *Tapnozous nudiventris* foi identificado um tripanosoma do subgênero *Herpetosoma*, identificados como *Trypanosoma (Herpetosoma) longiflagelum*. (MARINKELLE, 1977).

No Canadá, na cidade de Ontário, no período de 1976 a 1979, morcegos foram examinados usando a técnica do hematócrito. *Trypanosoma hedricki* foi encontrado no morcego *Eptesicus fuscus* e *Trypanosoma myoti* em morcego *Myotis lucifugus*. Cultura de *Trypanosoma hedrick* e *Trypanosoma myoti* foram infectivas quando inoculadas oralmente e injetadas intraperitonealmente em *Eptesicus fuscus* e *Myotis lucifugus* respectivamente. Amastigotas foram encontradas em músculos cardíacos de ambos os morcegos e no tecido muscular do intestino de *Myotis lucifugus*. Embora morfologicamente as formas encontradas no sangue de ambos os morcegos similares à *Trypanosoma cruzi*, não demonstraram infectividade para animais de laboratório (BOWER; WOO, 1980).

Em 1988, na Inglaterra, duas espécies de parasitas do subgênero *Schizotrypanum*, *Trypanosoma dionisii* e *Trypanosoma vespertilionis* foram identificadas, por esfregaço e hemocultura, infectando diferentes espécies de morcegos (*Pipistrellus pipistrellus*, *Nyctalus leisleri*, *Nyctalus noctula*, *Eptesicus serotinus* e *Myotis brandti*). Triatomíneos, da espécie *Cimex pipistrelli*, que habitavam o mesmo espaço dos morcegos demonstraram a presença de formas metacíclica em tubo digestivo (GARDNER; MOLYNEUX, 1988).

2.3. QUIRÓPTEROS E PARASITAS DO GÊNERO *Trypanosoma*: DISTRIBUIÇÃO NO BRASIL

No Brasil, em diversas regiões, inúmeros relatos são feitos a respeito da infecção por parasitos do gênero *Trypanosoma* em morcegos. As primeiras observações foram feitas por Dias, em 1933, na cidade Lassance, estado de Minas Gerais, durante estudos envolvendo a pesquisa de hemoflagelados em diferentes mamíferos, entre eles, morcegos pertencentes à família Phyllostomidae. Formas flageladas, morfologicamente similares aos parasitas do sub-

gênero *Schizotrypanum* foram observadas e, quando inoculadas experimentalmente em preás, não demonstraram infectividade para este hospedeiro. Ao exame histopatológico de diversos órgãos dos morcegos infectados, nenhuma forma parasitária foi encontrada nos tecidos avaliados. Diante destes resultados, o autor sugeriu que tal flagelado fosse classificado como *Schizotrypanum vespertilionis*, sendo que a hipótese de uma possível infecção mista foi aventada estar ocorrendo nos morcegos examinados (DIAS, 1933). Um ano depois, Dias identificou o mesmo parasita em morcego da espécie *Myotis nigricans nigricans* capturados na mesma região em Minas Gerais (DIAS, 1934). Três anos mais tarde, este mesmo autor, observou a infecção natural por *Schizotrypanum* em morcegos das espécies *Dirias albiventer* e *Nyctinomus macrotis*, nas cidades de Casa Nova e Malhada, respectivamente, na Bahia, e em morcego *Carollia perspicillata*, na cidade de Benjamin Constant, Minas Gerais (DIAS, 1936).

Em 1939, Dias e Romaña, descreveram a presença de parasitas do subgênero *Schizotrypanum* em quirópteros no Brasil e Argentina. No Brasil, a pesquisa foi feita em morcegos da espécie *Phyllostomus hastatus*, nos estados do Mato Grosso e Rio de Janeiro. O exame histopatológico de órgão de morcegos infectados foi negativo. Formas de cultura deste parasita foram inoculadas em coelho e, após 5 dias da inoculação, observou-se, no sítio de inoculação, células contendo formas típicas de amastigotas, sendo na época denominada como formas “leishmania” (DIAS; ROMAÑA, 1939). Um ano depois, Dias ao realizar exame a fresco em sangue de morcegos, em Minas Gerais e no Distrito Federal, observou a presença de flagelados em *Carollia perspicillata* e *Lonchoglossa ecaudata*. Os parasitas apresentaram características semelhantes ao subgênero *Schizotrypanum* e idênticas em ambas as espécies de morcegos analisados. Xenodiagnóstico realizado com triatomíneos *Panstrongylus megistus*, *Triatoma infestans* e *Rhodnius prolixus* nos morcegos infectados demonstraram resultados negativos. Estes flagelados, denominados como *Schizotrypanum*, também não apresentaram infectividade para animais de laboratório (DIAS, 1940).

No Estado do Pará, em 1941, durante investigação sobre hemoflagelados em morcegos, as espécies *Dirias albiventer*, *Eumops abrasus*, *Glossophaga soricina*, *Hemiderma perspicillatum*, *Lonchophylla mordax*, *Micronycteris megalotis*, *Phyllostomus elongatum* e *Saccolpteryx bilineata* foram encontradas naturalmente infectadas. Neste mesmo estudo, triatomíneos da espécie *Cavernicola pilosa* foram também encontrados infectados pelo mesmo flagelado descrito nos morcegos. Formas parasitárias eliminadas junto com as fezes deste triatomíneo foram inoculadas em cobaio e camundongos, demonstrando não serem infectivas para estes hospedeiros, entretanto, quando esse mesmo material foi inoculado em morcego da espécie *Dirias albiventer*, apresentou resultado positivo, avaliado por hemocultura. Xenodiagnó-

nóstico feitos com *Triatoma brasiliensis* e *Rhodnius prolixus*, em *Dirias albiventer* e *Glossophaga soricina*, foram negativos, entretanto um exemplar alimentado em *Hemiderma perspicillatum* mostrou raros flagelados no intestino (DIAS et al. 1942).

DEANE; SUGAY, (1963) pesquisando a infecção por *Trypanosoma cruzi* em mamíferos silvestres, examinaram um morcego hematófago da espécie *Desmodus rotundus* no estado de São Paulo e observaram a presença de um tripanosoma em esfregaços sanguíneos. Não foram vistas formas de multiplicação no sangue e nas vísceras do morcego e a tentativa de cultivar o parasita em meios de agar-sangue foram fracassadas. Da mesma forma, não foi possível infectar camundongos ou triatomíneos (*Rhodnius prolixus*). De acordo com as características morfológicas do parasita, os autores observaram que se tratava de um parasito totalmente diferente daqueles já descritos em morcegos e o nomeou de *Trypanosoma pessoai*. A partir deste primeiro relato, outros achados de *Trypanosoma pessoai* em morcegos foram descritos em outras localidades do Brasil, que pelas características, foi alocado no subgênero *Megatrypanum* (VILAR et al. 2004).

A diversidade de protozoários flagelados tripanosomatídeos, encontrados na infecção natural de morcegos é enorme, visto os relatos descritos acima. A caracterização e identificação desses parasitas, por muitos anos, foram feitas baseadas em caracteres biológicos e morfológicos, o que pode ter causado alguns erros de classificação desses protozoários. Com o decorrer do avanço das técnicas aplicadas à taxonomia, principalmente a partir da década de 60, esse problema foi sendo minimizado, permitindo identificações mais precisas dos parasitas circulantes nesses animais.

Ainda na década de 40, a hipótese da existência de pelo menos duas espécies morfológicamente distintas relacionadas aos morcegos foi aventada por Emmanuel Dias (DIAS, 1940). Essas espécies seriam: 1) *Trypanosoma cruzi*, que apresentavam parasitas com cerca de 20 μ de comprimento total, com índice nuclear médio geralmente variando entre 1,4 e 1,6, capaz de evoluir bem em triatomíneos e infectar animais de laboratório; 2) *Trypanosoma vespertilionis*, cujos parasitas apresentavam cerca de 15 μ de comprimento total médio, com índice nuclear médio variando entre 2,6 e 2,7, entretanto, incapazes de se desenvolverem em triatomíneos ou em animais de laboratório. Essas hipóteses foram corroboradas em outras publicações (ZELEDON; VIETO, 1957; DEANE; SUGAY, 1963), sendo tais parâmetros, muito utilizados na comparação de amostras isoladas de morcegos. Dessa forma, *Trypanosoma vespertilionis* foi relatado em diferentes famílias de morcegos, Emballonuridae, Phyllostomidae, Vespertilionidae e Molossidae, no estado de São Paulo (BARRETO et al. 1968).

Baseado nos critérios acima, Funayama & Barreto, em 1970, descreveram o encontro de *Trypanosoma cruzi* em morcegos da espécie *Desmodus rotundus rotundus* e em *Tadarida laticaudata*, respectivamente em Minas Gerais e São Paulo. Ambas as amostras se mostraram infectivas para camundongos e ratos brancos jovens, infectando 100% dos animais inoculados e para insetos triatomíneos dos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongilus* (FUNAYAMA; BARRETO, 1970a,b). Em estudos posteriores, os mesmos pesquisadores isolaram, por hemocultura, *Trypanosoma cruzi* de um espécime do morcego *Epitesicus brasiliensis brasiliensis*, capturado no forro de uma habitação da área urbana de Ribeirão Preto, São Paulo. Da mesma forma, a amostra isolada infectou triatomíneos e camundongos (FUNAYAMA; BARRETO, 1973).

Em alguns estudos, pela impossibilidade de isolamento, a identificação de flagelados encontrados em morcegos foi feita apenas por critérios morfológicos. Torres e colaboradores, por tais critérios, descreveram no estado de São Paulo a presença de parasitas do subgênero *Schizotrypanum* na espécie de morcego *Sturnia sp.* e *Carollia sp.* e parasitas do subgênero *Megatrypanum* na espécie *Desmodus rotundus*. (TORRES et al. 1983).

Diante das inúmeras hipóteses levantadas na literatura, relacionadas à identificação dos flagelados circulantes em morcegos, ficava claro que maiores estudos eram necessários nesse contexto. BAKER et al. (1978) compararam amostras identificadas como *Trypanosoma dionisii* e *Trypanosoma vespertilionis* obtidos de morcegos capturados na Europa e amostras identificadas como *Trypanosoma cruzi*, de morcegos da América Latina, por diferentes técnicas. Os autores concluíram que as amostras americanas se diferenciam das amostras européias e aproximavam-se dos padrões apresentados por *Trypanosoma cruzi*. Entretanto, pelo fato das amostras americanas estudadas não infectarem animais de laboratório, os autores nomearam tais amostras de *Trypanosoma cruzi* variedade *marinkellei*.

Em diferentes cidades do Ceará, nos anos de 1983 e 1984, morcegos das espécies *Artibeus planirostris*, *Phyllostomus hastatus* e *Phyllostomus discolor* foram encontrados infectados por tripanosomas e isolados por xenodiagnóstico, utilizando exemplares de *Rhodnius prolixus*. Os flagelados encontrados em *Artibeus planirostris* e *Phyllostomus hastatus* foram morfológicamente semelhantes e, foram infectivos para camundongos. A análise histopatológica do tecido cardíaco desses morcegos demonstrou severas alterações e presença de formas amastigotas, o que levou os pesquisadores classificarem o flagelado encontrado como *Trypanosoma cruzi*. Já as amostras isoladas de *Phyllostomus discolor* e de alguns exemplares de *Phyllostomus hastatus*, devido à forma e dimensões dos parasitas e o fato de não infectarem

camundongos, foram identificadas como *Trypanosoma cruzi* variedade *marinkellei*. (FABIÁN, 1991).

Trypanosoma cruzi marinkellei, como mencionado acima, mantém estreita relação morfológica com *Trypanosoma cruzi*, no entanto, a falta de infectividade para animais de laboratório demonstra uma característica particular. Outros estudos mostraram que esta espécie foi também capaz de infectar insetos triatomíneos (FABIÁN, 1991). Atualmente, *Trypanosoma cruzi marinkellei* é reconhecido como uma espécie, uma vez que estudos moleculares, através do sequenciamento de fragmentos do DNA, mostraram seqüências únicas, sem qualquer similaridade com seqüências apresentadas por *Trypanosoma cruzi* (TELLERIA et al. 2006).

Outros estudos, pelo fato de amostras isoladas de morcegos apresentarem características morfológicas expressivas com *Trypanosoma cruzi*, mas por diferirem biologicamente deste, foram denominadas como amostras *Trypanosoma cruzi-like*. No estado do Piauí, em 1986, morcegos dos gêneros *Phyllostomus*, *Anoura*, *Pteronotus*, *Artibeus*, *Carollia*, *Desmodus* e *Trachops* foram examinados quanto à presença de tripanosomatídeos por xenodiagnóstico, hemocultura e exame a fresco do sangue. Os flagelados encontrados em exemplares dos gêneros *Anoura* e *Pteronotus* foram identificados como *Trypanosoma cruzi-like*, devido às características já descritas. Um exemplar triatomíneo da espécie *Triatoma brasiliensis* foi encontrado associado à morcegos do gênero *Phyllostomus* que após dissecação, demonstrou formas flageladas no seu intestino que foram incapazes de provocar infecção em camundongos sendo também identificado como *Trypanosoma cruzi-like*. Isolados obtidos dos gêneros *Artibeus* e *Anoura* por apresentarem infectividade para camundongos, foram identificados como *Trypanosoma cruzi* (PINTO; BENTO, 1986). A expressão *Trypanosoma cruzi-like* passou a ser empregada também em outros estudos para amostras isoladas de morcegos, as quais apresentavam incapacidade de infectar animais de laboratório (NASCENTES et al. 2008).

Num estudo realizado no estado de Santa Catarina, foram obtidas 7 amostras de *Trypanosoma* spp. a partir do morcego de hábito insetívoro *Eptesicus* sp. Infecções experimentais dos flagelados em triatomíneos e culicídeos se mostraram transitórias. Os tripanosomas não demonstraram infectividade para camundongos. Os perfis obtidos por isoenzimas e RAPD mostraram que os parasitas isolados apresentavam semelhança entre si, porém totalmente distintos de *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli*, *Trypanosoma vespertilionis* e *Trypanosoma hastatus* (STEINDEL et al. 1998). Estudos posteriores realizados com estas amostras demonstraram a circulação, de uma nova espécie de tripanosoma em morcegos no Brasil, sendo nomeada *Trypanosoma desterrensis* (GRISARD et al. 2003).

Em 2004, no estado do Rio de Janeiro, durante estudos com morcegos hematófagos *Desmodus rotundus*, foi descrita a presença de flagelados compatíveis com *Trypanosoma (Megatrypanum) pessoai* (VILAR et al. 2004). A característica de representantes do subgênero *Megatrypanum* por ser muito particular, cujos parasitas possuem grandes dimensões, apresentando membrana ondulante bem definida, leva alguns pesquisadores caracterizar tais parasitas somente por critérios morfológicos, como o de VILAR et al. (2004) e DEANE; SUGAY (1963). Recentemente, baseado em critérios morfobiológicos, LAINSON et al. (2008) demonstrou a circulação de uma nova espécie deste subgênero em gambás. Também, no estado do Rio de Janeiro, amostras de tripanosomas têm sido obtidas, por hemocultura, de morcegos com diferentes hábitos alimentares (BARROS et al. 2008).

Outra espécie, como *Trypanosoma rangeli* também foi relatada em morcegos em diferentes regiões do Brasil. Durante estudos realizados em diferentes estados brasileiros (Pará, Goiás e Mato Grosso), tanto *Trypanosoma rangeli* como *Trypanosoma cruzi* foram identificados infectando morcegos. A maioria dos parasitas foram isolados de *Phyllostomus hastatus* que após ensaios moleculares mostraram a presença de *Trypanosoma cruzi* tipo I no Pará; *Trypanosoma cruzi* tipo II, *Trypanosoma rangeli* e infecção mista por ambos os parasitas em Goiás e *Trypanosoma cruzi* tipo II e infecção mista por *Trypanosoma cruzi* II e III no Mato Grosso (LISBOA et al. 2008). No mesmo ano, várias espécies de flagelados do gênero *Trypanosoma*, identificadas como *Trypanosoma rangeli*, *Trypanosoma dionisii*, *Trypanosoma cruzi* var. *marinkellei* e *Trypanosoma cruzi* foram isoladas de morcegos na região Centro-Oeste do Brasil (MAIA DA SILVA et al. 2008).

2.4. QUIRÓPTEROS E PARASITAS DO GÊNERO *Leishmania*

Embora não seja comprovado o envolvimento de morcegos no ciclo de transmissão das leishmanioses, doença causada por parasitas do gênero *Leishmania*, a coabitação desses animais em locais também habitados por flebotomíneos (vetores das leishmanioses) mostram evidências que os morcegos talvez possam servir de fonte alimentar para esses insetos trazendo a possibilidade, também, de constituírem possíveis hospedeiros para parasitas do gênero *Leishmania* (KILLICK-KENDRICK et al. 1977; MORSY et al. 1987; REGENDRAM et al. 1985).

Apesar de poucos estudos terem sido conduzidos neste contexto, na Colômbia, em situação de cativeiro, (LAMPO et al. 2000) observaram que *Lutzomyia longipalpis* são capazes de alimentarem-se em diferentes espécies de morcegos, entretanto nenhum flagelado foi pos-

teriormente observado nos insetos alimentados. Em estudo mais recente, 216 morcegos, de 29 espécies diferentes, capturados em ambiente florestal na Guiana Francesa foram examinados pela PCR, apresentando resultados negativos para a presença de DNA de parasitas do gênero *Leishmania* em todos os animais e espécimes clínicos examinados. Este estudo sugeriu que mamíferos como os morcegos possam não ter envolvimento no ciclo de transmissão deste protozoário (ROTUREAU et al. 2006). Em outro estudo, realizado no Brasil, a relação entre morcegos e flebotomíneos foi novamente abordada demonstrando a reprodução de *Lutzomyia maruaga* em guano de morcegos numa caverna na Amazônia (ALVES, 2008).

Apesar dessas evidências, o primeiro relato da presença de parasitas do gênero *Leishmania* infectando naturalmente morcegos, foi descrito recentemente na Venezuela. *Leishmania chagasi* foi isolada de *Carollia perspicillata* por hemocultura, demonstrando que morcegos podem atuar como possíveis hospedeiros de outros tripanosomatídeos. A presença de parasitas do gênero *Leishmania* em morcegos, fato até então desconhecido, amplia as espécies de tripanosomatídeos associados a esses animais. (DE LIMA et al. 2008).

Todos os fatos aqui apresentados demonstram com grande clareza a diversidade da fauna de morcegos existentes no mundo, incluindo espécies com os mais variados hábitos alimentares. Paralelamente, observa-se também, uma grande variedade de gêneros, subgêneros e espécies de tripanosomatídeos que podem ser encontrados naturalmente nesses animais, sendo alguns agentes de importantes doenças para o ser humano e para os animais. Considerando o pouco conhecimento que se tem sobre essa diversidade, torna-se evidente a importância de estudos, principalmente àqueles que visem à identificação das amostras que são obtidas desses animais em diferentes regiões. Tais estudos podem ser de grande utilidade no conhecimento e mapeamento dos parasitas associados às diferentes espécies de morcegos e contribuir para ações no contexto em saúde pública.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

O manejo na captura dos morcegos seguiu orientações específicas estipuladas em protocolos da Secretaria Estadual de Saúde/Rio de Janeiro (SES/RJ) e autorização do IBAMA.

O projeto foi aprovado ao Comitê de Ética de Usuário de Animais (CEUA-FIOCRUZ) sob licença de Nº L-051/08 que se encontra em anexo.

3.2. MANEJO COM OS MORCEGOS

Todo o trabalho de captura e coleta de sangue dos morcegos foi realizado por técnicos treinados da Equipe de Vigilância de Hospedeiros, Reservatórios e Animais Peçonhentos da SES/RJ. Os espécimes foram capturados em áreas urbanas e peri-urbanas em locais pré-estabelecidos como junto a currais, forros de casas, manilhas de água, cavernas ou abrigos naturais de morcegos, empregando redes de neblina (“mist-nets”) que foram armadas ao entardecer. O exemplar capturado foi cuidadosamente retirado da rede e classificado quanto à família, sexo e aspecto clínico. Para coleta de sangue, o animal foi anestesiado com quetamina e de acordo com a massa corporal, foi coletado até 1 mL por punção cardíaca. Após, o animal foi identificado com colar e liberado no mesmo local da captura.

3.3. HEMOCULTURA

O sangue coletado foi submetido a centrifugação durante 20 minutos a 4500 rpm a 4°C. O plasma foi separado e congelado a -20°C para utilização nos testes sorológicos relacionados ao controle da raiva urbana, sob responsabilidade da SES/RJ. O sedimento de hemácias foi ressuspenso em cerca de 6 mL de meio de cultura Schneider’s suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), que após homogeneização, foi distribuído para 4 tubos contendo meio sólido NNN. Os tubos semeados foram acondicionados à temperatura de 28°C em estufa biológica.

As culturas foram examinadas a fresco, por microscopia ótica, coletando-se uma amostra da fase líquida do meio que foi depositada entre lâmina e lamínula para pesquisa de formas flageladas. Os exames foram realizados semanalmente durante dois meses, sendo que com 30 dias foi adicionado em cada tubo de cultura 1 mL de meio Schneider com 10% de SFB.

3.4. PARASITAS

Os isolados obtidos durante o estudo foram mantidos por passagens semanais no mesmo meio de cultura descrito acima para o isolamento e foram preparadas massas parasitárias para estudos bioquímicos. Todos os isolados foram criopreservados em nitrogênio líquido (N₂). Amostras de referência tais como: *Trypanosoma cruzi* (cepa Y e CL Brenner clone), *Trypanosoma rangeli* (Choachi e SC58) e tripanosomas de morcegos (*Trypanosoma desterrensis*) foram usados em nos ensaios bioquímicos para comparação. Tais amostras foram obtidas junto ao núcleo de Coleção de Tripanosomatídeos do IOC/Fiocruz.

3.5. ANÁLISE MORFOMÉTRICA

Foram confeccionados esfregaços em lâminas de microscopia em diferentes tempos de cultivo para todos os isolados. As lâminas foram coradas pelo Giemsa, seguindo protocolo de coloração do laboratório e, posteriormente foram confeccionadas pranchas para estudo da morfologia dos parasitas isolados.

3.6. AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE AO SISTEMA COMPLEMENTO

Todas as amostras foram testadas quanto à sensibilidade à lise pelo sistema complemento, seguindo protocolos descritos por STENDEIL, *et al.* (1998). Formas epimastigotas de cultura, obtidas em fase exponencial do crescimento, foram lavadas 3 X em PBS acrescido de 5% de SFB através de centrifugações (4500rpm/10 minutos). Os parasitas foram quantificados e ajustados para a concentração de 10⁸ parasitas/mL e expostos ao complemento obtido de soro fresco humano na proporção de 1:2 (50µL da suspensão de parasitas + 100µL de soro) em triplicatas, à temperatura de 28°C durante 30 minutos. A lise foi avaliada por contagem em câmara de Neubauer. Controles (soro humano fresco inativado) e amostras de *Trypanosoma*

cruzi (sensível ao complemento) e *Trypanosoma rangeli* (resistente ao complemento) foram também incluídos nos ensaios.

3.7. INDUÇÃO DA METACICLOGÊNESE

Formas epimastigotas de cultura dos isolados foram transferidos na proporção de 1×10^6 parasitas/mL para meio RPMI contendo 5% de soro fetal bovino (SFB) em pH 8,0, para diferenciação e obtenção de formas tripomastigotas, segundo métodos descrito por KOERICH *et al.* (2002).

3.8 - INFECÇÃO EXPERIMENTAL “IN VITRO”

Todos os isolados foram avaliados quanto ao potencial infectivo para macrófagos peritoniais murinos.

Camundongos adultos Swiss webster (outbreed) foram submetidos a eutanásia em câmara de CO₂, para a coleta de macrófagos. Após a assepsia na região abdominal e com o auxílio de duas pinças do tipo “dente de rato” foi exposto o peritônio, onde foi introduzido cerca de 10 mL de meio RPMI (sem soro). Após suave massagem nessa região, esse volume foi aspirado com a mesma seringa, acondicionado em gelo e quantificado para o ajuste de 3×10^5 células / mL. O plaqueamento foi realizado em lâminas para cultura (LabTest-8 compartimentos). A encubação foi feita a 37°C em estufa com 5% de CO₂ durante 2 horas, período suficiente para as células aderirem à lâmina. Após, empregando RPMI pré-aquecido (37°C) as lâminas foram cuidadosamente lavadas, retirando-se as células não aderentes, adicionando em seguida meio RPMI contendo 10% de SFB. Após 24 horas do plaqueamento, foram colocadas em contato com a monocamada de macrófagos, formas de cultura,. Essa interação ocorreu pelo período de 3 horas à 37°C em estufa com 5% de CO₂. Após esse tempo, os parasitas não interiorizados foram retirados por meio de lavagem das lamínulas utilizando meio RPMI (37°C), adicionando em seguida meio contendo SFB. A infecção celular foi avaliada em intervalos de 3 horas (momento de lavagem das lamínulas), 24, 48 e 72 horas. Nesses pontos as lâminas foram lavadas cuidadosamente em tampão PBS, fixadas com metanol e coradas pelo Giemsa. O sobrenadante das culturas também foram examinadas em todos os intervalos. As lâminas, após coloração, serão montadas em lâmina para microscopia empregando Permount e posteriormente examinadas em microscopia ótica.

3.9 - INFECÇÃO EM TRIATOMÍNEOS

A susceptibilidade de triatomíneos para cada isolado foi testada. Utilizamos ninfas de 4º e 5º estágio de *Triatoma infestans*, obtidas junto ao núcleo de Coleção de Triatomíneos do IOC/Fiocruz. Hemácias de coelho foram lavadas em solução fisiológica e ressuspensas com formas de cultura, na proporção de 1:1 (v/v) com formas de cultura lavadas em PBS. Essa suspensão foi colocada em alimentador artificial (mamadeira) acoplada a um banho circulador que manteve a temperatura em torno de 37°C. As ninfas, em jejum, foram alimentadas nesse sistema, por meio de uma membrana. Os insetos que não se alimentaram foram desprezados e os alimentados foram mantidos a temperatura de 28°C com umidade em torno de 75%. Em diferentes tempos (15, 30 e 45 dias), foram dissecados exemplares, avaliando a presença de flagelados no tubo digestivo, na hemolinfa nas fezes e nas glândulas salivares.

3.10 - ELETROFORESE DE ENZIMAS

As amostras cultivadas em NNN / Schneider foram transferidas para garrafas contendo cerca de 10 mL de Schneider suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) com inóculo aproximado de 10%. O crescimento foi acompanhado diariamente em microscopia (microscópio invertido) e por volta do 3º dia do inóculo foram acrescentados cerca de 10 ou 20 mL de meio Schneider suplementado com SFB de acordo com o crescimento parasitário. Ao final de aproximadamente 7 dias, o conteúdo das garrafas foi transferido para tubos do tipo Falcon de 50 mL e submetidos a centrifugação durante 10 minutos a 7000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspense em 10 mL de tampão de lavagem (NaCl 0,85% adicionado de 0,01M de EDTA, pH 8,0) e lavado por duas vezes nas mesmas condições anteriores. Na última lavagem o sedimento foi ressuspense em 1,5 mL de tampão, transferido para tubos de criopreservação (capacidade de 2,0 mL) e centrifugados novamente nas mesmas condições anteriores. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado, ficando no tubo uma quantidade de tampão suficiente para cobrir o “pellet”. Os tubos foram depositados em botijões contendo nitrogênio líquido e estocados até a realização das corridas eletroforéticas.

Para a corrida eletroforética, inicialmente, foi preparado um gel de agarose (Tipo V) acrescida de tampão fosfato ou maleico, que depois de dissolvida e fundida foi colocada sobre um filme de poliestireno onde a amostra teste foi aplicada. A corrida foi feita empregando-se uma cuba de eletroforese horizontal devidamente acoplada a um banho circulador para manter

a refrigeração em torno de 4°C. A corrente aplicada dependeu do tampão empregado na corrida o qual varia de acordo com a enzima que se deseja revelar. A revelação da atividade enzimática foi feita, colocando-se diretamente sobre o gel uma mistura contendo os substratos, transportadores e receptores de elétrons, cofatores e tampões próprios para cada enzima já descritos na literatura. A reação foi interrompida adicionando-se ácido acético a 5% até que o excesso de corante fosse eliminado. A mobilidade eletroforética foi avaliada, comparando-se com o padrão de diferentes espécies do gênero *Trypanosoma*, empregando 9 sistemas enzimáticos: nucleotidase (NH); phosphoglucomutase (PGM); mannose phosphate dehydrogenase (MPI); 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGDH); malic enzyme (ME); glucose phosphate isomerase (GPI); glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH); malate dehydrogenase (MDH); isocitrate dehydrogenase (IDHNADP); baseado em protocolos descritos na literatura.

Dos valores obtidos foram construídas matrizes para a comparação dos eletromorfos das amostras de cada uma das amostras estudadas. A partir da matriz de dados, contendo os caracteres (enzimas estudadas) e os táxons (zimodemas) foi realizada a análise numérica com auxílio de programas de computador (NTSYS), utilizando-se o Coeficiente de Concordância Simples (“Simple Matching”). Com a utilização deste coeficiente se estabeleceu uma matriz de similaridade entre os isolados. Esta foi então transformada em um dendrograma (fenograma) pelo método não ponderado de agrupamento aos pares por média aritmética (UPGMA).

4. RESULTADOS

4.1. HEMOCULTURAS

No período de agosto de 2004 a julho de 2008 foram examinados 96 morcegos. As capturas foram realizadas nos municípios de Rio de Janeiro, Miracema, Paraty, Itaperuna, Niterói, Maricá, São Gonçalo e Laje do Muriaé, tanto em abrigos naturais como em áreas de voo dos morcegos (Figura 1). Dos exemplares avaliados, 89 possuíam hábitos alimentares hematófagos, sendo 88 da espécie *Desmodus rotundus* e um da espécie *Diaemus yougii*; 4 possuíam hábitos frugívoros, sendo 2 da espécie *Artibeus cinereus*, um da espécie *Glossophaga soricina* e outro da espécie *Carollia perspicillata*. e 3 exemplares insetívoros de espécie *Lonchorhina aurita*.

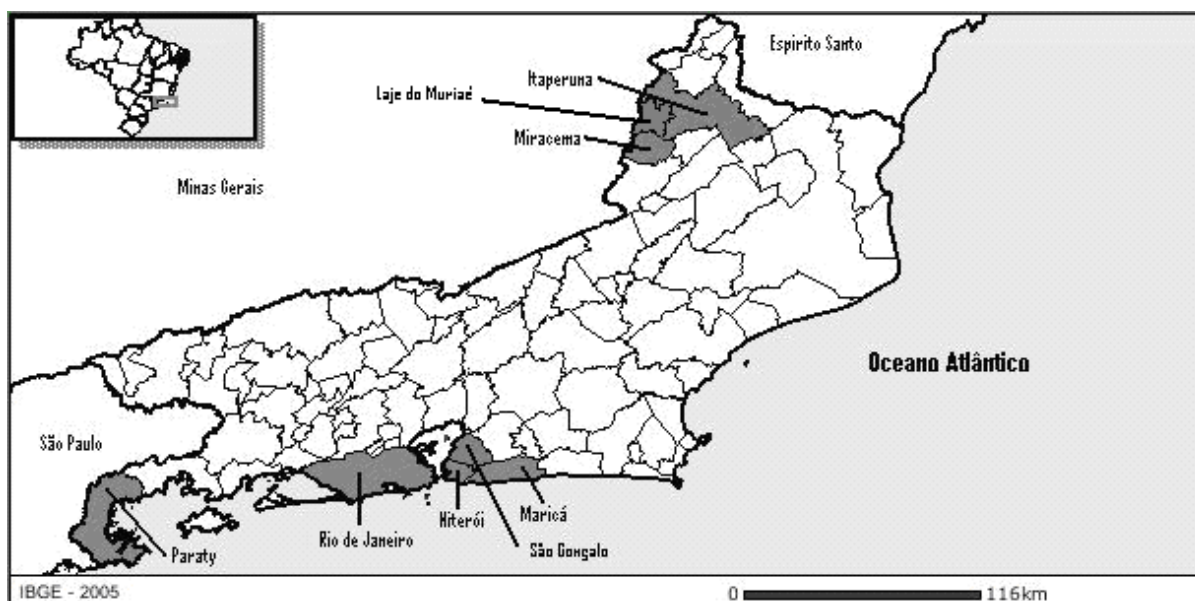


Figura 1: Mapa do Estado do Rio de Janeiro, assinalando os Municípios onde foram realizadas as capturas no período de agosto de 2004 a Julho de 2008 (Fonte: http://www.ibge.gov.br/mapas_ibge/).

Obteve-se isolamento de flagelados tripanosomatídeos em 1 exemplar capturado em Paraty, em 10 exemplares capturados em Miracema, 3 exemplares capturados em Maricá, em 3 exemplares em São Gonçalo, 5 exemplares capturados em Niterói e 7 exemplares em Laje

do Muriaé. Os demais morcegos apresentaram resultados negativos à hemocultura. Uma das amostras obtidas de Miracema, uma amostra de Maricá, um amostra de Laje do Muriaé , 2 amostras de São Gonçalo, 4 amostras de Niterói não evoluíram em meio de cultura. Estes resultados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Resultado da avaliação, por hemocultura, de morcegos capturados em diferentes municípios do Estado do Rio de Janeiro no período de agosto de 2004 a Julho de 2008.

Município	Espécime	Hemocultura	
		Nº de exemplares examinados	Nº de amostras positivas (%)
São Gonçalo	<i>D. rotundus</i>	12	03
Niterói	<i>D. rotundus</i>	06	05
Maricá	<i>D. rotundus</i>	03	03
Miracema	<i>D. rotundus</i>	37	09
	<i>Diaemus youngii</i>	01	0
	<i>Lonchorhina aurita</i>	03	01
	<i>Artibeus cinereus</i>	01	0
Paraty	<i>D. rotundus</i>	01	01
	<i>Glossofaga sorcina</i>	01	0
	<i>Artibeus cinereus</i>	01	0
	<i>Carollia perspicillata</i>	01	0
Itaperuna	<i>D. rotundus</i>	02	0
Rio de Janeiro	<i>D. rotundus</i>	17	0
Laje do Muriaé	<i>D. rotundus</i>	10	07
Total		96	29 (30,21%)

4.2. PARASITAS

Todos os isolados foram mantidos por passagens semanais em meio NNN e Schneider's suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), em estufa à 28°C, apresentando bom crescimento e intenso polimorfismo entre os isolados. Todas as amostras isoladas foram criopreservadas e depositadas na coleção do Laboratório de Vigilância em Leishmanioses (IPEC/FIOCRUZ) e massas parasitárias foram obtidas para realização da técnica de isoenzimas, sendo também estocadas em nitrogênio líquido.

Para a identificação dos flagelados isolados, consideraram-se 12 amostras obtidas no período do estudo (Tabela 2).

Tabela 2: Relação dos isolados de tripanosomatídeos considerados para as metodologias propostas neste estudo.

Data do isolamento	Espécie de morcego	Local da captura	Código do isolado
15/09/04	<i>D. rotundus</i>	Miracema - RJ	R 077 (M8)
15/09/04	<i>D. rotundus</i>	Miracema - RJ	R 069 (M5)
15/09/04	<i>D. rotundus</i>	Miracema - RJ	R 066 (M9)
15/09/04	<i>D. rotundus</i>	Miracema - RJ	R 067 (M10)
31/03/05	<i>D. rotundus</i>	Pendotiba - Niterói	R 209 (M3)
25/04/06	<i>D. rotundus</i>	Itaipuaçu - Maricá	R 387 (M2)
30/05/07	<i>D. rotundus</i>	Paraty - RJ	R. 1008 (M2)
29/06/07	<i>Lonchorhina aurita</i>	Miracema - RJ	R. 1011 (M1)
29/06/07	<i>D. rotundus</i>	Miracema - RJ	R. 1012 (M4)
29/06/07	<i>D. rotundus</i>	Miracema - RJ	R. 1013 (M7)
29/06/07	<i>D. rotundus</i>	Miracema - RJ	R. 1014 (M8)
29/06/07	<i>D. rotundus</i>	Miracema - RJ	R. 1015 (M9)

4.3. ANÁLISE MORFOMÉTRICA

Foram confeccionadas lâminas de todos os isolados nos seguintes tempos de cultivo: 3, 7, 14 dias. Na Figura 2 apresentamos os isolados M1-1011, M5-069 e M7-1013.

As amostras (M9-066, M10-067, M8-077, M5-069, M3-209, M2-387, M2-1008, M4-1012, M7-1013) apresentam as mesmas características nos três tempos de observação. Com 3 dias de cultivo foram observadas formas epimastigotas alongadas, poucas rosetas e algumas formas em divisão. Com 10 dias a cultura apresentou formas epimastigotas muito finas, muitas em processo de divisão. Algumas formas se apresentaram com corpo íntegro com cinetoplasto, mas com ausência de núcleo. Houve formação de grandes rosetas. Com 17 dias, com exceção das amostras M2-1008 e M7-1013 que não resistiram até esse tempo de cultivo, havia ainda formas epimastigotas alongadas, mas também formas mais largas. Presença de formas tripomastigotas. Diminuição no número de rosetas.

Os isolados M8-1014 e M9-1015 destacaram-se por apresentar grande percentual de formas tripomastigotas em todos os períodos de observação. Com 3 e 10 dias foi observada a

presença também de formas epimastigotas alongadas. Ausência de rosetas. Com 17 dias já foi observado muitas formas em destruição, com formas mais arredondadas.

Já o isolado M1-1011 apresentou características distintas. Com 3 dias apresentou formas epimastigotas globosas, arredondadas. Ausência de rosetas. Com 10 e 17 dias a maioria das formas é arredondada, em divisão. Observou-se formas em destruição, ausência de rosetas presença de formas tripomastigotas.

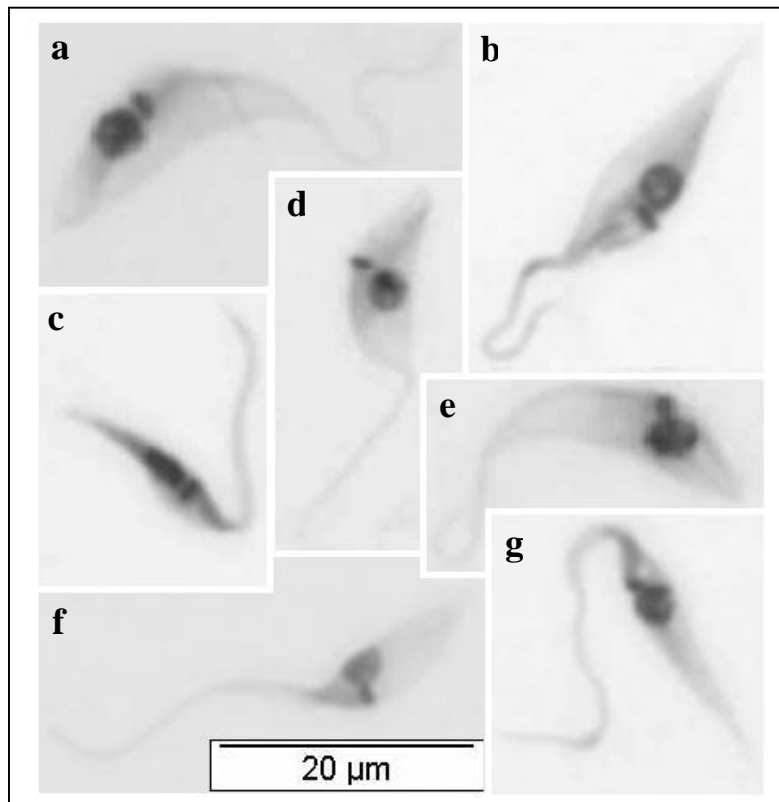


Figura 2 - Fotomicrografia de flagelados tripanosomatídeos isolados de morcegos capturados no município de Miracema: isolado M1-1011(a, d, e); isolado M7-1013 (b, f, g); isolado M5-069 (c). Coloração pelo Giemsa (x 1000) (BARROS et al. 2008).

4.4. AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE AO SISTEMA COMPLEMENTO

Todas as amostras foram avaliadas quanto a sensibilidade ao sistema complemento. Todos os isolados foram sensíveis ao complemento humano apresentando 100% de lise de formas epimastigotas. A utilização de soro inativado inibiu a lise em todas as amostras.

4.5. INDUÇÃO DA METACICLOGÊNESE

Dez dos doze isolados estudados (M9-066, M10-067, M8-077, M5-069, M3-209, M2-387, M2-1008, M1-1011, M4-1012, M7-1013) por apresentarem baixos percentuais de formas tripomastigotas, foram submetidos à indução da metaciclogênese seguindo protocolo descrito na literatura (KOERICH et al. 2002). As amostras foram repicadas em meio RPMI e após 6 dias do repique, apenas uma amostra (M1-1011) apresentou diferenciação de cerca de 13% para formas tripomastigotas avaliado por microscopia ótica em lâmina corada pelo Giemsa. As demais amostras não sobreviveram na condição utilizada, apresentando 100% de morte ao final de 6 dias.

4.6. INFECÇÃO EXPERIMENTAL “IN VITRO”

Para este experimento não foi possível a separação das formas tripomastigotas para a infecção dos macrófagos. Por essa razão o percentual de formas metacíclicas, nessas amostras, foi calculado ao final de 10 dias em meio bifásico (NNN/Schneider) com 10% de SFB, sendo estas utilizadas na infecção das células. Apresentando o seguinte resultado: M9-066 (5%); M3-209 (4%), M5-069 (5%), M8-077 (3%), M2-387 (4%), M10-067 (7%), M2-1008 (4%), M7-1013 (4%) e M4-1014(10%).

Os resultados demonstraram que no intervalo de 3 horas, observou-se inúmeros parasitas aderidos as células e ao substrato (placa), não sendo possível a retirada no momento da lavagem dos parasitas não interiorizados. Após 24 horas da infecção, em todas as situações, observou-se a interiorização dos parasitas, mostrando destruição dos mesmos pelos macrófagos. Nos intervalos de 48 e 72 horas observou-se inúmeras células vacuolizadas, algumas mostrando resídeos de parasitas em seu interior, mostrando que nenhuma das 12 amostras estudadas evoluíram em macrófagos murinos. Estes resultados estão mostrados em detalhes na tabela 3.

Tabela 3: Avaliação da infecção experimental “in vitro” em macrófagos murinos de 12 amos-
tras isoladas de morcegos, em diferentes intervalos de tempo.

Amostra estudada	Período de observação			
	3 horas	24 horas	48 horas	72 horas
M9-066	- Parasitas aderidos às células e no interior das mesmas.	- Parasitas aderidos e no interior das células. Células vacuolizadas.	- Células hipervacuolizadas com resíduos . Parasitas fora das células	- Poucas células vacuolizadas, com resíduos no seu interior.
M3-209	- Parasitas aderidos e dentro das células	- Células hipervacuolizadas, com parasitas e detritos no interior.	- Células hipervacuolizadas. Algumas com parasitas no interior.	Não realizado
M5-069	- Células vacuolizadas com parasitas sendo digeridos.	- Células vacuolizadas com detritos, Fixação de parasitas sobre a célula.	- Células hipervacuolizadas com resíduos no interior. Sem parasitas do lado de fora.	Não realizado
M10-067	- Muitos parasitas aderidos às células e no seu interior.	- Células hipervacuolizadas.	- Células hipervacuolizadas sem parasitas dentro e fora das mesmas.	- Poucas células vacuolizadas.
M8-077	- Célula bastante vacuolizada. - Parasitas dentro e fora das células.	- Células hipervacuolizadas. - Parasitas fora e dentro das células	- Células pouco vacuolizadas. - Não há parasitas dentro e fora das células.	Não realizado.
M2-3087	- Parasitas dentro e fora das células. Algumas com destruição no interior.	- Poucos parasitas fora da célula. Algumas vacuolizadas sem resíduo em seu interior.	- Células com poucos vacúolos. Sem parasitas	- Células com poucos vacúolos. Não há parasitas
M2-1008	- Células vacuolizadas com parasitas interiorizados digeridos.	- Células hipervacuolizadas. Poucos parasitas fora da célula.	- Não há parasitas. Algumas vacuolizadas com resíduos.	- Sem parasitas. Algumas células vacuolizadas.
M4-1012	- Parasitas íntegros no interior das células.	- Muitos parasitas fora das células. Algumas com resíduos e destruição.	Não realizado.	Não realizado.
M7-1013	- Parasitas aderidos às células.	- Parasitas do lado fora e células vazias e vacuolizadas.	- Algumas células vacuolizadas sem parasitas.	- Poucas células vacuolizadas.
M8-1014	- Poucos parasitas fora da célula. Resíduos no interior das células.	- Sem parasitas fora das células. Poucas células vacuolizadas.	- Poucas células vacuolizadas.	- Células sem vacúolos.
M9-1015	- Parasitas aderidos às células e no interior.	- Sem parasitas fora das células. Algumas células com vacúolos.	- Células esprairadas e vacuolizadas, sem resíduos no interior.	- Poucas células esprairadas e vacuolizadas.
M1-1011	- Todos os parasitas entraram nas células.	- Células hipervacuolizadas. Não há parasitas.	- Células com vacúolos pequenos. Não há parasitas.	- Poucas células com vacúolos.

4.7 - INFECÇÃO EM TRIATOMÍNEOS

Todas as amostras foram oferecidas em alimentador artificial para *Triatoma infestans*. Embora 50 exemplares de triatomíneos tenham sido oferecido a alimentação, em média, cerca de 30 ninfas alimentaram-se com cada um dos isolados. Ao final de 45 dias da alimentação o número de insetos avaliados variou de 18 exemplares (M1-1011; M4-1012) a 29 exemplares (M3-209; M7-1013). Em todos os intervalos de tempo não foi evidenciada a presença de nenhuma forma flagelada no tubo digestivo, hemolinfa e glândulas salivares nos exemplares examinados. Estes resultados são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Avaliação da infecção experimental de 12 amostras isoladas de morcegos em *Triatoma infestans*

Amostras	Nº de triatomíneos alimentados	Nº de triatomíneos examinados (dias)			Nº de triatomíneos mortos	Nº total de triatomíneos examinados
		15	30	45		
M9-066	27	4	11	8	4	23
M3-209	30	6	10	13	1	29
M10-067	22	6	8	8	0	22
M5-069	27	6	10	9	2	25
M8-077	20	6	7	6	1	19
M2-387	25	6	8	9	2	23
M2-1008	28	8	9	9	2	26
M1-1011	22	4	7	7	4	18
M4-1012	22	4	9	5	4	18
M7-1013	30	6	10	13	1	29
M8-1014	28	9	8	7	4	24
M9-1015	35	9	7	9	10	25

4.8 - ELETROFORESE DE ENZIMAS

As doze amostras estudadas foram avaliadas por 9 sistemas enzimáticos, todas apresentando padrões eletroforéticos diferentes das amostras de referências de *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli* e *Trypanosoma dsterrensis* empregadas nesta avaliação. A posição dos eletromorfos de cada uma das amostras está apresentada abaixo no Quadro 1. A partir da construção de uma matriz relacionada com a presença ou ausência de bandas obtidas nos diferentes sistemas enzimáticos e analisadas no programa NTSYS, foi possível a construção de um dendrograma (Figura 3), agrupando as amostras isoladas de morcegos em três zimodemas distintos que apresentaram o mesmo perfil entre si em todos os sistemas enzimáticos estuda-

dos: Zimodema ZM1 englobando 7 amostras obtidas do município de Miracema (M3-209, M9-066, M10-067, M5-069, M8-077, M4-1012, M7-1013); 1 amostra obtida no município de Maricá (M2-387) e 1 amostra obtida no município de Paraty (M2-1008); Zimodema ZM2 englobando duas amostras obtidas do município de Miracema (M8-10014, M9-1015) e Zimodema ZM3 englobando uma única amostra, também do município de Miracema (M1-1011). As amostras dos zimodemas M1 e M2 foram todas isoladas de *Desmodus rotundus*, morcego de hábito hematófago e a amostra do zimodema ZM3 foi isolada de *Lonchorhina aurita* espécie de hábito alimentar insetívoro. As amostras de referência, também foram alocadas em diferentes grupos, inclusive *Trypanosoma desterrensis*, que constitui uma amostra isolada de morcego em Santa Catarina.

Amostras estudadas	Sistemas enzimáticos empregados								
	NH	G6P	6PG	PGM	GPI	MPI	IDH	ME	MDH
<i>T. rangeli</i> (Choachi)*	2	2	4	4	2,4	1	3	1	1
<i>T. cruzi</i> (CL Brener)*	2	3	1,2	1,2	3,4,6	2	3	1,3	2
<i>T. cruzi</i> (Y)*	2	3	2	1	.6	2	2,3	1,3	3
<i>T. desterrensis</i> *	1	4	3	4	5	1	4,5	1,4	2
M3 – 209	3	4	4	1,3	5	1	3	1,2	3
M9 – 066	3	4	4	1,3	5	1	3	1,2	3
M10 – 067	3	4	4	1,3	5	1	3	1,2	3
M5 – 069	3	4	4	1,3	5	1	3	1,2	3
M8 – 077	3	4	4	1,3	5	1	3	1,2	3
M2 – 387	3	4	4	1,3	5	1	3	1,2	3
M2-1008	3	4	4	1,3	5	1	3	1,2	3
M4-1012	3	4	4	1,3	5	1	3	1,2	3
M7-1013	3	4	4	1,3	5	1	3	1,2	3
M8-1014	1	2	3	4	7	2	1,2,3,5	1,3	2
M9-1015	1	2	3	4	7	2	1,2,3,5	1,3	2
M1-1011	1	2	3	4	4,6,7	2	3	1	2,3,4

* = amostras de referência

Quadro 1: Posição dos eletromorfos apresentados em nove sistemas enzimáticos de 12 amostras isoladas de morcegos e quatro amostras de tripanosomatídeos utilizadas como referência.

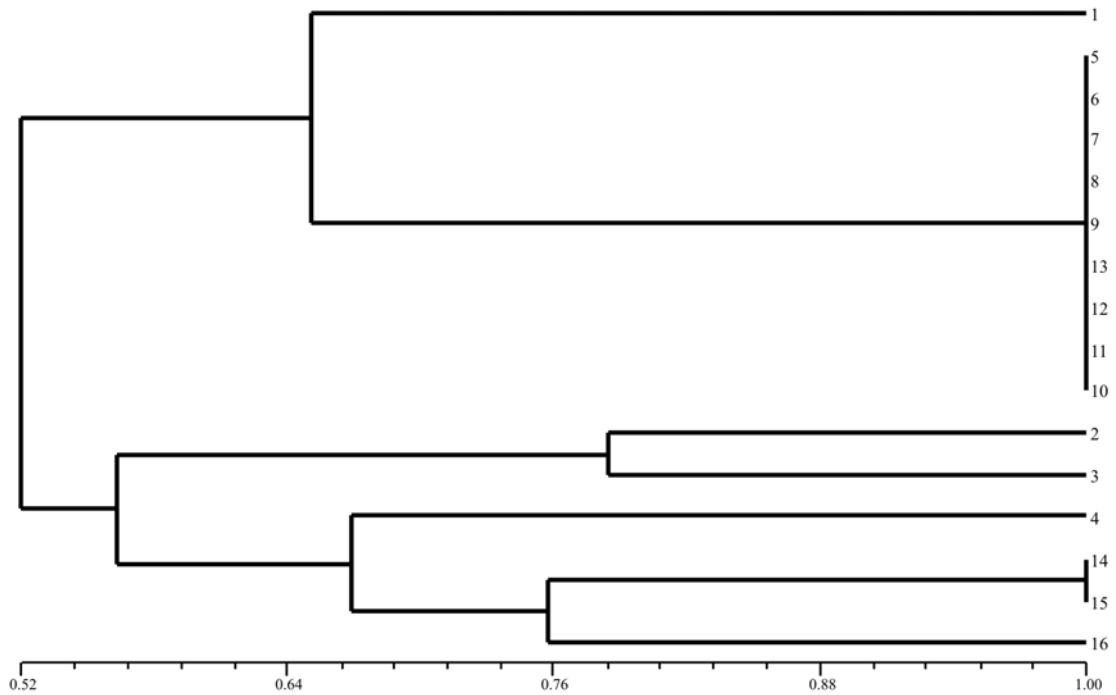


Figura 3: Dendrograma utilizando o coeficiente de similaridade de Simple Matching baseado no perfil fenético obtido por eletroforese de isoenzimas. Amostras de referência: **1** - *Trypanosoma rangeli* (Choachi), **2** e **3** - *Trypanosoma cruzi* (Y; CLBrenner), **4** - *Trypanosoma desterrensis*. Amostras do estudo: **5** a **13** - M3-209, M9-066, M10-067, M5-069, M8-077, M2-387, M2-1088, M4-1012, M7-1013 (Zimodema ZM1); **14** e **15** - M8-1014 e M9-1015 (Zimodema ZM2); **16** - M1-1011(Zimodema ZM3) (Elaborado pelo autor).

5. DISCUSSÃO

Este estudo teve como proposta a avaliação da presença de flagelados tripanosomatídeos em morcegos capturados em diferentes municípios do estado do Rio de Janeiro e a caracterização biológica e bioquímica de 12 (doze) amostras de tripanosomas obtidas desses animais. Pouco se conhece sobre a circulação de flagelados em morcegos no estado do Rio de Janeiro, sendo de grande preocupação a presença de *Trypanosoma cruzi* em quirópteros, uma vez que esses animais trocam eventualmente de abrigo e adaptam-se aos ambientes modificados. Essa característica representa um potencial para a disseminação de patógenos que podem ser agentes de importantes doenças para o homem e animais. Em estudo realizado por LISBOA *et al.* (2008), 14 amostras de *Trypanosoma cruzi* foram isoladas de morcegos nas regiões da Amazônia, Cerrado e Pantanal, demonstrando a importância do monitoramento desses animais, principalmente nos ambientes peridomésticos.

No Estado do Rio de Janeiro, o estudo com morcegos vem sendo feito principalmente para o monitoramento destes animais no ciclo da raiva urbana, sendo tal trabalho realizado rotineiramente pelas Secretarias Estaduais de Saúde e Agricultura (ROMIJN *et al.* 2003), mediante captura de exemplares em diferentes locais do Estado, para avaliação da presença de vírus e anticorpos específicos nesses animais. Associado a este programa, 96 morcegos oriundos dos municípios de Maricá, Niterói, São Gonçalo, Itaperuna, Paraty, Miracema, Laje do Muriaé e Rio de Janeiro, foram avaliados quanto à presença de flagelados tripanosomatídeos. Dos exemplares avaliados, 89 possuíam hábitos alimentares hematófagos, 4 eram frugívoros e 3 eram insetívoros e isolados de tripanosomas foram obtidos de 29 animais (30,2%). Embora sejam os morcegos de hábitos hematófagos os de maior preocupação em saúde pública, pela associação com o vírus rábico, neste estudo obtivemos amostras de tripanosomas, isolados de morcegos com outros hábitos alimentares. Em diferentes regiões do Brasil, *Trypanosoma cruzi* foi isolado de morcegos com hábitos alimentares frugívoros (*Artibeus* sp.) e misto (*Phyllostomus* sp.) (LISBOA *et al.* 2008) e *Trypanosoma desterrensis* foi isolado de morcego com hábito insetívoro (*Eptesicus* sp.) (GRISARD *et al.* 2003). Estes resultados salientam a importância da inclusão de morcegos com diferentes hábitos alimentares nos monitoramentos, como o que foi realizado neste estudo

Diversos outros estudos têm demonstrado a presença de flagelados tripanosomatídeos em morcegos em diferentes regiões brasileiras (DEANE et al. 1963, TORRES et al. 1983, GRISARD et al. 2003, VILAR et al. 2004, LISBOA et al. 2008). Recentemente, na Venezuela foi relatado, pela primeira vez, o isolamento de *Leishmania chagasi* em um exemplar da espécie *Carolia perpicillata* (LIMA et al. 2008). Não se conhece, ainda, qual é o verdadeiro papel que morcegos possam desempenhar no ciclo epidemiológico de diferentes protozoários (SARAIVA et al. 1987), no entanto, o conhecimento das espécies que possam ser encontradas infectadas naturalmente é primordial para que medidas de controle possam ser implementadas. A partir do monitoramento de morcegos no estado de Santa Catarina, foi possível a descrição de uma nova espécie de tripanosoma, *Trypanosoma desterrensis* (GRISARD et al. 2003) Os morcegos de hábitos hematófagos constituem maior importância devido aos ataques aos animais domésticos sendo importantes na transmissão da raiva urbana (DANTAS-TORRES et al. 2004). Em algumas regiões, tem-se o relato de morcegos com comportamento anormal, em contato com pessoas, causando inúmeros acidentes (CARRIERI et al. 2000).

A metodologia utilizada para avaliar a presença de flagelados tripanosomatídeos nos animais capturados foi a hemocultura. Tal método embora altamente específico para protozoários sanguíneos possui sensibilidade relativa, diretamente associada às condições de cultivo e ao volume de sangue que é cultivado. Em todos os morcegos avaliados não foi possível a coleta de volumes maiores que 1 mL, o que pode ter sido um fator de influência para o sucesso de isolamento, embora tenhamos obtido 30,21% de positividade por esta metodologia.

Todos os isolados obtidos, neste estudo, apresentaram bom crescimento em meio NNN/Schneider's suplementado com 10% de soro fetal bovino, com exceção de uma amostra obtida de Miracema e uma de Laje do Muriaé que não evoluíram nesta condição. Todas as demais estão criopreservadas no Banco de amostras do Laboratório de Vigilância em Leishmanioses/IPEC/FIOCRUZ.

Das 29 amostras isoladas de morcegos neste estudo, 12 foram selecionadas para avaliações biológicas e bioquímicas.

A capacidade infectiva de amostras de tripanosomas isoladas de morcegos, para animais de laboratório, tem sido largamente explorada como uma ferramenta auxiliar no estudo e identificação dessas amostras (FUNAYAMA; BARRETO, 1973, FABIÁN, 1991), entretanto, a utilização de ensaios "in vitro" tem sido, atualmente, os mais empregados. Para tal, existe a necessidade da obtenção de formas tripomastigotas, nos meios de cultivo, o que pode garantir o sucesso da infecção "in vitro", já que são estas as formas capazes de infectar células de mamíferos (MARTÍNEZ-DÍAS et al. 2001). Neste estudo, dez dos doze isolados apresenta-

ram baixo percentual dessas formas e por essa razão, foram repicadas para RPMI com pH 8,0, visando induzir a metaciclo-gênese, como já foi descrito para outras espécies de tripanosomas (KOERICH et al. 2002). Nessa condição, somente um isolado (M1-1011) apresentou aumento de formas tripomastigotas (13%) em comparação com o valor de 4% encontrados quando mantidos em NNN/Schneider's. Nove amostras não conseguiram evoluir nessa condição. Este resultado demonstrou diferenças biológicas entre os isolados estudados e sugerem que outros meios de cultura devam ser utilizados para esse fim.

Na avaliação do potencial infectivo para células macrofágicas murinas, verificou-se que nenhuma das amostras estudada foi capaz de infectar estas células. Os parasitas tinham capacidade de adesão e interiorização às células, mas não de multiplicação. O baixo percentual de formas tripomastigotas observado em nove isolados pode ter sido um fator que levou ao resultado apresentado. No entanto, duas das amostras que possuíam altos percentuais de formas tripomastigotas, foram igualmente não infectivas para estas células. BAKER *et al.* (1972) relata que amostras de *Trypanosoma dionisii*, isoladas de morcegos, foram capazes de invadir e infectar células de mamíferos tais como amostras de *Trypanosoma cruzi*.

Outra metodologia de grande aplicabilidade em estudos biológicos de novos isolados é a verificação da sensibilidade ao sistema complemento. Esta metodologia foi descrita por Shotelius em 1982 e desde então tem sido utilizada principalmente na distinção entre *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangeli*, que apresentam os dois extremos: *Trypanosoma cruzi* é sensível e *Trypanosoma rangeli* resistente. Todas as amostras isoladas de morcegos, estudadas, avaliadas por este parâmetro apresentaram 100% de lise. A sensibilidade ao complemento de amostras isoladas de morcegos foi também demonstrada por STEINDEL *et al.* (1998). Tal parâmetro, analisado isoladamente, não confere segurança na identidade de amostras desconhecidas, como foi o caso deste estudo, cujas amostras apresentaram características similares à *Trypanosoma cruzi*, mas quando analisadas por outros parâmetros, não foram concordantes. Um desses parâmetros foi a avaliação da infectividade dessas amostras para triatomíneos, visto que tais artrópodes são vetores para diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi* e, são encontrados facilmente em abrigos de morcegos (DIAS, 1942). Neste estudo, doze amostras de tripanosomas isoladas de morcegos não evoluíram em *Triatoma infestans*. Por esta análise, concluímos que nenhuma das amostras pode ser identificada como *Trypanosoma cruzi* e, corrobora os resultados relatados por STEINDEL *et al.* (1998) que também não conseguiram demonstrar a infectividade de isolados de morcegos para esses insetos.

Inúmeros vetores estão envolvidos na transmissão de diferentes espécies do gênero *Trypanosoma*, entre eles, pulgas (SMITH et al. 2006), moscas (GEIGER et al. 2007), flebó-

tomos (BATES, 2008) e triatomíneos (SCHOFIED, 2000). Não se conhece quais vetores poderiam estar associados aos morcegos e possivelmente estarem atuando como disseminadores de tripanosomatídeos que infectam esses animais. É conhecido que tanto flebótomos (LAMPO et al. 2000) como triatomíneos (ASSIS et al. 2007) alimentam-se naturalmente nesses animais. Triatomíneos do gênero *Cavernícola* (*Cavernicola pilosa* e *Cavernicola lenti*) são descritos como possíveis vetores de algumas espécies de *Schizotrypanum*, tal como *Trypanosoma marinkellei*, amostra isolada de morcego (MARINKELLE, 1982).

Em estudo desenvolvido em cativeiro, THOMAS et al, (2007) demonstraram que morcegos podem se infectar com diferentes espécies de tripanosomas por via oral, a partir da ingestão de triatomíneos, como também por via contaminativa, quando expostos as fezes e urina desses insetos quando parasitados. Tal estudo demonstra a grande importância que os morcegos, independente do seu hábito alimentar, podem possuir no ciclo de transmissão de tripanosomatídeos. A possibilidade da transmissão direta desses protozoários entre os morcegos também tem sido considerada devido o seu hábito de agregação em colônias (MOLYNEUX, 1991).

Parâmetros biológicos são de fundamental importância para o estudo de novos isolados, no entanto, podem não ser definitivos para a identificação ao nível de espécie. Pelos parâmetros aqui aplicados, foi possível excluir a possibilidade das doze amostras estudadas serem identificadas como *Trypanosoma cruzi*, uma vez que nenhuma foi capaz de colonizar tubo digestivo de triatomíneos, característica primordial desta espécie. Da mesma forma, a tentativa de infecção dessas amostras em macrófagos “in vitro” confirma tal afirmação, uma vez que nenhuma das 12 amostras foram capazes de infectar e se manter nessas células.

Biologicamente, as doze amostras avaliadas, demonstraram características comuns, tais como sensibilidade ao complemento, falta de potencial infectivo para triatomíneos e macrófagos murinos. Entretanto, quando avaliadas pela eletroforese de isoenzimas, puderam ser separadas em três zimodemas ou três fenótipos. Através desta metodologia quatro pontos importantes puderam ser destacados:

- 1) As amostras alocadas no zimodema ZM1 foram obtidas de morcegos capturados em diferentes municípios (Miracema, Niterói e Paraty), demonstrando que o mesmo fenótipo pode ser encontrado em regiões distintas. A circulação de mesmas amostras de tripanosomatídeos em diferentes áreas geográficas é observada em várias regiões (LISBOA et al. 2008). Isso pode ocorrer devido à dispersão de seus hospedeiros e vetores para essas regiões carregando tais parasitas. Nesse aspecto é interessante lembrar que os morcegos possuem capacidade de

vão e mudam de habitat freqüentemente, podendo transportar parasitas de uma região para a outra e os resultados demonstrados aqui reforçam esta observação;

- 2) Amostras alocadas no zimodema ZM1 foram obtidas em diferentes períodos: cinco no ano de 2004 e duas no ano de 2007. Este resultado demonstra que certos fenótipos podem ser mantidos entre esses animais por longos períodos;
- 3) Amostras obtidas do município de Miracema puderam ser alocadas nos três zimodemas. Este resultado revela que numa mesma região diferentes fenótipos podem ser detectados, entretanto não foi observado em nosso estudo, infecções mistas nesses animais;
- 4) A única amostra isolada de um exemplar não hematófago apresentou perfil diferenciado sendo alocada no zimodema ZM3.

Atualmente, doenças infecciosas emergentes em animais silvestres, de forma geral, vêm recebendo grande atenção e os morcegos estão listados como tendo papel muito importante como reservatórios e transmissores de inúmeros agentes de importância em saúde pública (MESSENGER et al. 2003; FIELD et al. 2004).

Os resultados obtidos neste estudo, publicados parcialmente na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical (BARROS et al. 2008) demonstram que flagelados do gênero *Trypanosoma* podem ser isolados de morcegos com diferentes hábitos alimentares no estado do Rio de Janeiro. Apesar de nenhuma amostra ter sido identificada como *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli* ou *Trypanosoma desterrensis*, observou-se três padrões fenotípicos distintos entre as doze amostras estudadas. Estes resultados reforçam a importância do monitoramento de hemoflagelados em morcegos, o que poderá constituir um fator de sentinela para as diferentes espécies de parasitas que possam estar circulando, nesses animais em diferentes regiões. As amostras aqui descritas foram também avaliadas por PCR, empregando diferentes alvos moleculares, cujos resultados confirmaram os apresentados nesta Dissertação (BARROS et al., 2009, artigo submetido). Adicionalmente, estes resultados contribuem para as ações de vigilância epidemiológica, principalmente pelo pouco conhecimento que tem sobre o assunto.

6. CONCLUSÃO

1. A presença de flagelados tripanosomatídeos foi confirmada, por hemocultura, em 29 (n=96; 30,2%) morcegos, sendo 28 hematógafos e 1 insetívoro, capturados em diferentes municípios do estado do Rio de Janeiro;
2. As doze amostras de *Trypanosoma* sp. estudadas apresentaram padrões biológicos semelhantes, demonstrando 100% de sensibilidade ao sistema complemento; não foram capazes de infectar macrófagos murinos “in vitro” nem tampouco puderam infectar e colonizar glândulas salivares, hemolinfa e o trato intestinal de *Triatoma infestans*;
3. Análise dos perfis eletroforéticos obtidos demonstraram, entre as doze amostras selecionadas, a presença de três zimodemas, todos distintos de amostras de referência de *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli* e *Trypanosoma desterrensis*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves VR, Freitas RA, Barret T. *Lutzomyia maruaga* (Diptera: Psychodiade), a new bat-cave sand fly from Amazonas, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008;103(3): 251-3.
- Assis GFM., Azeredo BVM, Fuente ALC, Diotaiuti L, Lana M. Domiciliation of *Triatoma pseudomaculata*(Corrêa e Espínola 1964) in the Jequitinhonha Valley, State of Minas Gerais. Revta Soc Bras Med Trop. 2007; 40(4): 391-6.
- Baker JR, Miles MA, Godfey DG, Barret TV. Biochemical characterization of some species of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) from bats (Microchiroptera). Am J Trop Med Hyg. 1978; 27(3): 483-91.
- Baker JR, Thompson GB. Two species of Tripanosoma from British Chiroptera (Bats). Trans R Soc Trop Med Hyg. 1971; 65:427.
- Barrett MP, Burchmore RJS, Lazzari A, Frasc AC, Cazzulo JJ, Krishna S. The trypanosomiases. (Seminar). The Lancet, n.362.9394, p.1469. 2003.
- Barreto MP, Siqueira AF, Ferriolli F, Carvalheiro JR, Albuquerque RD, Funayama GK. Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XXVII. Infecção natural de quirópteros *T. vespertilionis* Battaglia 1904. Revta Bras Biol. 1968; 28(2):147-155.
- Barros JHS, Romijn PC, Baptista C, Pinto AGS, Madeira MF. Relato da infecção natural de morcegos por flagelados tripanosomatídeos em diferentes municípios do Estado do Rio de Janeiro. Revta Soc Bras Med Trop. 2008; 41(6): 683-5.
- Battaglia M. Alcune ricerche sopra due tripanosomi (*Trypanosoma vespertilionis* = *Trypanosoma lewisi*). Ann. Méd. Nav. 1904; 2:517.
- Bates PA. Leishmania sand fly interaction: progress and challenges. Curr Opin Microbiol. 2008; 11:340-4.
- Berghe LVD, Chardome M, Peel E. An African bat trypanosoma in *Sctriaticimex brevispinosis* Usinger, 1959. J. Protozool. 1963; 10(2):135-38.
- Bettencourt A, França C. Sur un trypanosome de la chauve-souris. Compte rendu dès séances de la Société de biologie. 1905; 59:305-7
- Bower SM, Woo PTK. Two new species of trypanosomes (subgenus *Schizotrypanum*) in bats from southern Ontario. Can J Zool. 1981a; 59:530-45.
- Bower SM, Woo PTK. Development of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *hedrick* in *Cimex brevis* (Hemiptera:Cimicidae). Can J Zool. 1981b; 59:546-54.

- Carrieri M, Favoretto SRL, Carnieli P, Queiroz LH, M. Souza MMCAM, Panachão MR, et al. *Desmodus rotundus* como transmissor da raiva canina e felina no estado de São Paulo. Seminário Internacional de Raiva, 2000; v.Anais., p.15.
- Cartaya JT. Nueva filaria y otros parasitos en la sangre del murcielgo *Artibeus perpicilatus*. Rev Sanid Benef Minic. 1910; 3:503-6.
- Chatton E, Courrier R. Sur un trypanosome de la chauve-souris *Vesperugo pipistrellus*, à formes crithiennes intratissulaire et cystigènes. Hypothèse relative à l'étiologie du goître endémique. Compte rendu hebdomadaire dès séances de l'Académie dès sciences. 1921a; 172:1254-7.
- Chatton E, Courrier R. Un Schizotrypanum chez lès chauve-souris (*Vesperugo pipistrellus*) en Basse-Alsace. Schizotrypanose et goiter endémique. Compte rendu des séances de la Société de biologie. 1921b; 84:943-6.
- Dantas-Torres F, Valença C, Andrade-Filho GV. Captura de dois espécimes de *Desmodus rotundus* em área urbana do município de Olinda, Pernambuco, nordeste do Brasil. Congresso Norte Nordeste de Zoonoses e Bem Estar Animal, 2004 v.Anais., p.1.
- De Lima H, Rodríguez N, Barrios MA, Ávila A, Cañizales I, Gutiérrez S. Isolation and molecular identification of *Leishmania chagasi* from a bat (*Carollia perspicillata*) in northeastern Venezuela. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008; 103(4): 412-4.
- Deane LM, Sugay W. *Trypanosoma Pessoai* N. Sp., in Vampire bats *Desmodus rotundus rotundus* from the state of São Paulo, Brazil. Revta Inst Med Trop S Paulo. 1963; 90:165-9.
- Deane LM. Trypanosomidae in mammals of the Amazon region. 3. Hematoscopy and xenodiagnosis of wild animals of the environs of Belém, Pará. Revta Inst Med Trop S Paulo. 1964; 35:225-32.
- Dias E. On a *Schizotrypanum* from a bat of Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1933; 27(2):143-8.
- Dias E. Estudos sobre o *Schizotrypanum cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1934; 28(1):1-111.
- Dias E. Revisão geral dos hemoflagelados de quirópteros. 9a. Reun.Soc. Argent. Patol. Reg. Norte. 1936; 1:10-88.
- Dias E, Romana C. Algumas investigações sobre *Schizotrypanum* de quirópteros. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1939; 34(4): 619-625.
- Dias E. Sobre um *Schizotrypanum* dos morcegos *Lonchoglossa ecaudata* e *Carollia perspicillata* do Brasil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1940; 35(2): 399-409.
- Dias E, Melo GB, Costa D, Damasceno R, Azevedo M. Investigações sobre esquizotripanose de morcegos no Estado do Pará. encontro do barbeiro "*Cavernicola pilosa*" como transmissor. Revta Bras Biol. 1942; 2(1): 103-10.

- Fabián ME. Contribuição ao estudo da infecção de morcegos por hemoflagelados do gênero *Trypanosoma*. Cadernos de Saúde Pública. 1991; 7(1):69-81.
- Field H, Mackenzie J, Daszak P. Novel viral encephalitides associated with bats (Chiroptera) – host management strategies. Arch Virol. 2004; 18(suppl):113-21.
- Funayama GK, Barreto MP. Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XXXVIII: Infecção natural do morcego *Desmodus rotundus rotundus* (Geoffroy, 1810) pelo *T. cruzi*. Rev. Brasil. Biol. 1970a; 30(1): 13-9.
- Funayama GK, Barreto MP. Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XLI: Infecção natural do morcego, *Tadarida laticaudata* (Geoffroy, 1805) pelo *T. cruzi*. Revta Bras. Biol. 1970b; 30(3):439-45.
- Funayama GK, Barreto MP. Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. LIV: Infecção natural do morcego, *Epitesicus brasiliensis brasiliensis* (Desmarest, 1819) pelo *T. cruzi*. Revta Bras. Biol. 1973; 33(3):439-44.
- Gardner RA, Molyneux DH. Schizotrypanum in British bats. Parasitol. 1988; 97(Pt 1): 43-50.
- Geiger A, Ravel S, Mateille T, Janelle J, Patrel D, Cuny G, et al.. Vector Competence of *Glossina palpalis gambiensis* for *Trypanosoma brucei* s.l. and Genetic Diversity of the Symbiont *Sodalis glossinidius*. Mol. Biol. Evol. 2007. 24(1):102–9.
- Goedbloed E, Cremers-Hoyer L, Perie NM. Blood parasites of bats in the Netherlands. Ann Trop Med Parasitol. 1964; 58:257-60.
- Grisard EC, Sturm NR, Campbell DA. A new species of trypanosome, *Trypanosoma desterrensis* sp. n., isolated from South American bats. Parasitol. 2003; 127(3):265-71.
- Hedrick RM. A trypanosome from the big brown bat, *Epitesicus fuscus fuscus* (Beauvois), in Minnesota. J Parasitol. 1955; 41(6): 629-34.
- Hoare CA. The Trypanosomes of Mammals: A zoological monograph. Blackweel Scientific Publications, Oxford and Edinburg, UK, 1972. p. 327-400.
- Killick-Kendrick R, Molyneux DH, Hommel M, Leaney AJ, Robertson ES. *Leishmania* in phlebotomid sandflies. V. The nature and significance of infections of the pylorus and ileum of the sandfly by leishmaniae of the braziliensis complex. Proc R Soc Lond B Biol Sci. 1977; 198(1131):191-9.
- Koerich LB, Emmanuelle-Machado P, Santos K, Grisard EC, Steindel M. Differentiation of *Trypanosoma rangeli*: high production of infective trypomastigote forms in vitro. Parasitol Res. 2002; 88(1):21-5.
- Johnson CM. A natural infection of *Trypanosoma hippicum* darling in the vampire bat *Desmodus rotundus rotundus* Wagner. Am J. Trop Med. 1936; 16:59-62.

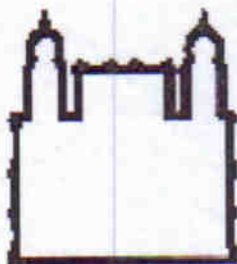
- Lainson R, Da Silva FMM, Franco CM. *Trypanosoma (Megatrypanum) saloboense* n. sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) parasite of *Monodelphis emiliae* (Marsupialia: Didelphidae) from Amazonian Brazil. *Parasite*. 2008; 15:99-103.
- Lampo M, Feliciangeli MD, Márques LM, Bastidas C, Lau P. A possible role of bats as a blood source for the *Leishmania* vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Am J Trop Med Hyg*. 2000; 62(6): 718-9.
- Lisboa CV, Pinho AP, Herrera HM, Gerhardt M, Cupolillo E, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) genotypes in neotropical bats in Brazil. *Veterinary Parasitology*. (2008); doi:10.1016/j.vetpar.2008.06.004.
- Maia da Silva F, Marcili A, Lima L, Cavazzana Jr M, Ortiz PA, Campaner M et al. *Trypanosoma rangeli* isolates of bats from Central Brasil: genotyping and phylogenetic analysis enable description of a new lineage using spliced-leader gene sequences. *Acta Trop*. 2008; doi: 10.1016/j.actatropica.2008.11.005.
- Marinkelle CJ. *Trypanosoma (Herpetosoma) longiflagellum* sp.n. from the tomb bat, *Tapnozous nudiventris* from Iraq. *J Wildl Dis*. 1977; 13:262-4.
- Marinkelle CJ. Developmental stages of *Trypanosoma cruzi*-like flagellates in *Cavernicola pilosa*. *Rev Biol Trop*. 1982; 30(2): 107-11.
- Martínez-Díaz RA, Escario JA, Nogal-Ruiz JJ, Barrio AG. Biological Characterization of *Trypanosoma cruzi* Strains. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001; 96(10): 53-9.
- Mayen F. Haematophagous bats in Brazil, their role in rabies transmission, impact on public health, livestock industry and alternatives to an indiscriminate reduction of bat population. *J Vet Med*, 2003; 50(10): 469-72.
- Mazza S. Hallazgo de tripanosomas en murcielagos del Chaco y Ledesma, Jujuy. Publicação nº22, M.E.P.R.A. Buenos Aires; 1935. p.3-11.
- Messenger SL, Rupprecht CE, Smith SJ. Chapter 14 - Bats, emerging virus infections and the rabies paradigm. *Bat Ecology*, Kunz TH & Fenton MB (Ed). The University of Chicago Press, Chicago. 2003. p.622-79.
- Molyneux DH. Trypanosomes of bats. In: *Parasitic protozoa*, J. P. Kreier and J. R. Baker (eds). Academic Press, San Diego. 1991, p.195-224.
- Morsy TA, Salama MMI, Abdel Hamig MY. Detection of *Leishmania* antibodies in bats. *J Egypt Soc Parasit*. 1987; 17:797-8.
- Nascentes GAN, Meira WSF, Lages-Silva E, Rampírez LE. Absence of experimental cross-protection induced by a *Trypanosoma cruzi*-like strain isolated from bats. *Revta Soc Bras Med Trop*. 2008; 41(2):152-7.
- Newnton BA. DNA of stercorarian trypanosomes. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1971; 65: 425-6.

- Pifano CE, Dias E. Investigações sobre o *Schizotrypanum* do morcego *Phyllostomus hastatis*. Revta Bras. Biol. 1942; 2(1):99-102.
- Pinto AS, Bento DNC. *Trypanosoma cruzi*-like bloodstream trypomastigotes in bats from the state of Piauí, Northeastern Brazil. Revta Soc Bras Med Trop. 1986; 19(1):31-4.
- Regendram P, Chatterjee SN, Dhanda V, Dhiman RC. Observation on the role of vespertilionid bats in relation to non-human vertebrate reservoirs in Indian kala-azar. Indian J Pathol Microbiol. 1985; 28: 153-8.
- Reis NR, Percchi AL, Pedro WA, Lima IP (eds). Mamíferos do Brasil. Londrina; 2006. p. 437.
- Romanã C. Hallazgo de tripanosoma de murcielagos en Villa Ana (Santa Fé). IX Reun Soc Arg Patol Reg Norte. 1936; 1:232-4.
- Romijn PC, Van Der Poel WHM, Van Der Heide R, Cattaneo CAM, Silva RCF. Study of Lyssaviruses of bat origin as a source of rabies for other animal species in the State of Rio de Janeiro – Brazil. Am J Trop Med Hyg. 2003, 69: 81-6.
- Rotureau B, Catzefflis F, Carme B. Absence of *Leishmania* in Guianan bats. Am J Trop Med. 2006 ; 74(2) : 318-321.
- Saravia NG, Holguin AF, Cibulskis RE, D'Alessandro A. Divergent isoenzyme profiles of sylvatic and domiciliary *Trypanosoma cruzi* in the eastern plains, piedmont, and highlands of Colombia. Am J Trop Med Hyg. 1987; 36: 59-69.
- Shofield CJ. *Trypanosoma cruzi* - The Vectos-parasite paradox. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2000, 95(4): 535-44.
- Sergent E, Sergent E. Sur des trypanosomes des chauves-souris. Compte rendu dès séances de la Societé de biologie. 1905; 58:53-5.
- Smith A, Telfer S, Burthe S, Bennett M, Begon M. Trypanosomes, fleas and field voles: ecological dynamics of a host-vector-parasite interaction. Parasitol. 2005; 3:355-65. 2005.
- Steindel M, Grisard EC, Pinto CJC, Cordeiro FD, Ribeiro-Rodrigues R, Romanha AJ. Characterization of trypanosomes from the subgenus *Schizotrypanum* isolated from bats, *Eptesicus sp.* (Chiroptera:Vespertilionidae), captured in Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. J Parasitol. 1998; 84(3):601-07.
- Telleria J, Lafay B, Virreira M, Barnabé C, Tybayrenc M, Svoboda M. *Trypanosoma cruzi*: sequence analysis of the variable region of kinetoplast minicircles. Exp Parasitol. 2006; 114(4): 279-88.
- Thomas ME, Rasweiler JJ, D'Alessandro A. Experimental transmission of the parasitic flagellates *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* between triatomine bugs or mice and captive neotropical bats. Mem Inst Oswaldo Cruz . 2007; 102:559-65.

- Torres D, Dias RM, Chieffi PP, Tolezano JE, Nagamori AH. Hemoparasitas de quirópteros e marsupiais capturados no Estado de São Paulo, Brasil. *Revta Inst. Adolfo Lutz*. 1983; 4(1-2): 47-53.
- Vickerman K. Diversity of the kinetoplastid flagellates. In: *Biology of the Kinetoplastida*. WHR Lumsden, D.S. Evans (eds). Academic Press, London/New York/San Francisco, 1976.
- Vilar TD, Gitti CB, Valim MP, Desidério MHG, Sá-Freire L, Serra-Freire NM. Registro de *Trypanosoma (Megatrypanum) pessoai* Deane & Sugay, 1963 em morcego hematófago *Desmodus rotundus* (Geoffroy, 1810) de Vargem Pequena, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. *Entomol Vec*. 2004; 11(3):535-39.
- Wenyon CM. *Protozoology*. London: Ballière, Tindall and Cox. 1926.
- Woo PTK; Hawkins JD. Trypanosomes and experimental trypanosomiasis en east African bats. *Acta Trop*. 1975; 32(1):57-64.
- Zeledón R, Rosabal R, *Trypanosoma leonidasdeanei* sp. nov. in insectivorous bats of Costa Rica. *Ann Trop Med Parasitol*. 1969; 63(2):221-28.
- Zeledón R, Vieto PL. Hallazgo de *Schizotrypanum vespertilionis* (Bataglia, 1904) em la sangre de murciélagos de Costa Rica. *Revta Bras Biol*. 5:123-8.

ANEXOS

Anexo 1 – Licença da Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA/Fiocruz).



MINISTÉRIO DA SAÚDE / FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
VICE-PRESIDÊNCIA DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA-FIOCRUZ

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo intitulado “**Avaliação da circulação de tripanosomatídeos (Protozoa: Kinetoplastida) em morcegos hematófagos no estado do Rio de Janeiro**” sob a responsabilidade da **Dra. Maria de Fátima Madeira**, foi licenciado pelo nº **L-0051/08** e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA - FIOCRUZ) Na presente formatação, este programa está licenciado e tem validade até 28 de maio de 2012.

Rio de Janeiro, 28 de maio de 2008.

Octavio Augusto França Presgrave -
Coordenador da CEUA
FIOCRUZ

Anexo 2 – Artigo publicado na revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical apresentando resultados parciais desta Dissertação.

Barros JHS, Romijn PC, Baptista C, Pinto AGS, Madeira MF. Relato da infecção natural de morcegos por flagelados tripanosomatídeos em diferentes municípios do Estado do Rio de Janeiro. *Revta Soc Bras Med Trop.* 2008; 41(6): 683-5.

Relato de infecção natural de morcegos por flagelados tripanosomatídeos em diferentes municípios do Estado do Rio de Janeiro

Report on natural infection of bats by trypanosomatid flagellates in different municipalities in the State of Rio de Janeiro

Juliana Helena da Silva Barros¹, Phyllis Catharina Romijn², Cibele Baptista¹,
Andressa G. de Souza Pinto¹ e Maria de Fátima Madeira¹

RESUMO

Este trabalho objetivou avaliar a infecção natural de morcegos por tripanosomatídeos. Foram examinados, por hemocultura, 86 exemplares de diferentes gêneros, sendo 22 (25,58%) amostras isoladas de *Desmodus rotundus* e *Lonchorhina aurita*. Os resultados obtidos contribuem para o conhecimento da ocorrência de tripanosomatídeos em morcegos no Estado do Rio de Janeiro.

Palavras-chaves: Chiroptera. Hemocultura. Trypanosomatidae. Brasil.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate natural infection of bats by trypanosomatids. Using blood culturing, 86 specimens from different genera were examined, and 22 samples (25.58%) of *Desmodus rotundus* and *Lonchorhina aurita* were isolated. These results contribute towards knowledge of the occurrence of trypanosomatids in bats in the State of Rio de Janeiro.

Key-words: Chiroptera. Blood culture. Trypanosomatidae. Brazil.

Os morcegos são mamíferos que possuem hábitos alimentícios diversificados, importantes no equilíbrio ambiental, e na manutenção da diversidade biológica de espécies vegetais, apresentando espécies atuantes e na transmissão de doenças para seres humanos e animais⁶. Das inúmeras espécies de morcegos descritas, apenas três são hematófagas, *Desmodus rotundus*, *Diphylla ecaudata* e *Diaemus youngii*, de ocorrência exclusiva no continente americano. Entre essas, *Desmodus rotundus*, por ser o único que se alimenta de sangue de mamíferos, constitui maior interesse nas questões de saúde pública, principalmente pelo papel que representa na transmissão de vírus da raiva⁸.

Os morcegos atuam como hospedeiros de bactérias, fungos, protozoários e vírus e também podem atuar como vetores mecânicos de *Trypanosoma evansi*. Diferentes espécies de flagelados tripanosomatídeos são descritas nesses animais, sobretudo do gênero *Trypanosoma*^{1 3 6 7 10 13}. Nas Américas, sua

importância aumenta devido à infecção natural por *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, muito embora seja desconhecido como esses animais atuam no ciclo desse protozoário em ambiente silvestre¹².

No Estado do Rio de Janeiro, o estudo com morcegos vem sendo feito principalmente para o monitoramento desses animais no ciclo da raiva urbana, sendo tal trabalho realizado rotineiramente pelas Secretarias Estaduais de Saúde e Agricultura¹¹, mediante captura de exemplares em diferentes locais do estado, para avaliação da presença de vírus e anticorpos específicos nesses animais.

Este trabalho objetivou avaliar por hemocultura a infecção natural por protozoários tripanosomatídeos em morcegos capturados em diferentes municípios do Estado do Rio de Janeiro, em associação ao Programa de manutenção de morcegos realizados por pesquisadores da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro (PESAGRO-RIO).

1. Laboratório de Vigilância em Leishmanioses, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ. 2. Laboratório de Biologia Animal, Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro, Niterói, RJ.

Apoio financeiro: Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ)

Endereço para correspondência: Dra. Juliana Helena da Silva Barros. Laboratório de Vigilância em Leishmaniose/ IPEC/FIOCRUZ. Av. Brasil 4365, Mangueiras, 21040-900 Rio de Janeiro, RJ.

Tel: 55 21 3865-9541

e-mail: juliana.helena@ipecc.fiocruz.br

Recebido para publicação em 02/05/2008

Aceito em 29/10/2008

Os espécimes foram capturados em áreas urbanas, peri-urbanas e em locais pré-estabelecidos como próximo a currais, forros de casas, manilhas de água, cavernas ou abrigos naturais de morcegos, empregando redes de neblina (*mist-nets*), puçã e luvas de raspa de couro. Após a captura os animais eram imediatamente anestesiados utilizando uma combinação de 1/1 de xilocaína e ketamina (0,1mg/100g peso corporal), por via intramuscular na pata posterior esquerda. Para a coleta de sangue o animal era colocado em decúbito dorsal sobre uma superfície rígida com as asas abertas para a realização da punção cardíaca, utilizando seringa de 1mL acoplada a agulha 25x7mm para *Desmodus rotundus* e espécies maiores, e seringa de tuberculina com agulha intradérmica para as espécies menores. De acordo com a massa corporal, foi coletado até 1mL de sangue. Após este procedimento o animal foi identificado com colar e liberado no mesmo local da captura.

O sangue coletado foi enviado ao Laboratório de Vigilância em Leishmanioses/Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas/Fundação Oswaldo Cruz (IPEC/FIOCRUZ) sob refrigeração (+/- 4°C), no prazo máximo de 24 horas. Após ser submetido à centrifugação durante 20 minutos a 3.500rpm a 4°C, o sedimento de hemácias foi ressuspense em cerca de 6mL de meio de cultura Schneider's suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos (penicilina e estreptomicina). A suspensão foi homogeneizada e distribuída para 4 tubos contendo meio sólido NNN (Novy, Nicolle e MacNeal). Os tubos semeados foram acondicionados em estufa biológica à temperatura de 28°C e examinados, por microscopia ótica, coletando-se amostras da fase líquida do meio e depositadas entre lâmina e lamínula para pesquisa de formas flageladas. Os exames foram realizados semanalmente durante dois meses, sendo que com 30 dias foi adicionado em cada tubo de cultura cerca de 1mL de meio de cultura Schneider com 10% de SFB.

No período de agosto de 2004 a fevereiro de 2007, foram examinados 86 morcegos, capturados nos Municípios de São Gonçalo, Miracema, Niterói, Maricá, Paraty, Itaperuna e Rio de Janeiro. Dos exemplares avaliados, 78 possuíam hábitos alimentares hematófagos, sendo 77 da espécie *Desmodus rotundus* e um da espécie *Diaemus youngii*; 4 possuíam hábitos frugívoros: 2 da espécie *Artibeus cinereus*, um da espécie *Carollia perspicillata* e outro da espécie *Glossophaga soricina* e 3 exemplares de espécie de hábitos insetívoros (*Lonchorbina aurita*).

Das 86 hemoculturas realizadas, foi possível o isolamento de flagelados tripanosomatídeos em 21 exemplares hematófagos (nº 78; 26,5%) e de um exemplar insetívoro (nº 3; 33,3%) (Tabela 1). Vinte e uma hemoculturas foram perdidas por contaminantes e as demais apresentaram resultados negativos. Das 22 (25,6%) amostras de protozoários flagelados isolados, 5 não evoluíram nos meios de cultura utilizados e as demais estão sendo mantidas por passagens semanais no mesmo meio de cultura descrito acima, apresentando intenso polimorfismo entre os isolados (Figura 1).

A investigação de parasitas hemoflagelados, em animais silvestres e domésticos, tem sido foco de estudo em diferentes

Tabela 1 - Resultado da avaliação, por hemocultura, de morcegos capturados em diferentes municípios do Estado do Rio de Janeiro.

Município	Espécie	Hemocultura	
		exemplares examinados (nº)	amostras positivas (nº)
São Gonçalo	<i>Desmodus rotundus</i> *	12	3
Niterói	<i>Desmodus rotundus</i> *	6	5
Maricá	<i>Desmodus rotundus</i> *	3	3
Itaperuna	<i>Desmodus rotundus</i> *	2	0
Rio de Janeiro	<i>Desmodus rotundus</i> *	17	0
Miracema	<i>Desmodus rotundus</i> *	37	9
	<i>Diaemus youngii</i> *	1	0
	<i>Lonchorbina aurita</i> **	3	1
Paraty	<i>Artibeus cinereus</i> ***	1	0
	<i>Desmodus rotundus</i> *	1	1
	<i>Glossophaga soricina</i> ***	1	0
	<i>Artibeus cinereus</i> ***	1	0
Total	<i>Carollia perspicillata</i> ***	1	0
		86	22

*hematófago, **insetívoro, ***frugívoro.

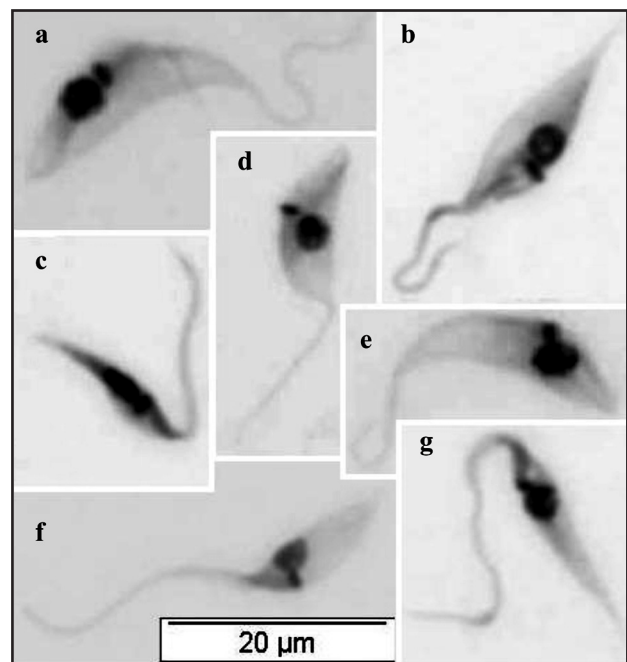


Figura 1 - Fotomicrografia de flagelados tripanosomatídeos isolados de morcegos capturados no município de Miracema: isolado R.1011 (a, d, e); isolado R.1013 (b, f, g); isolado R.069 (c). Coloração pelo Giemsa (x 1000).

áreas geográficas. Nesse contexto, os morcegos vêm recebendo atenção já que atuam como reservatórios e transmissores de agentes de importância em Saúde Pública^{4,9}. Este estudo demonstrou a infecção natural de morcegos por flagelados tripanosomatídeos em cinco Municípios do Estado do Rio de Janeiro.

A hemocultura embora altamente específica para protozoários sanguíneos, possui sensibilidade relativa, diretamente associada às condições de cultivo e ao volume de sangue semeado². Em todos os animais, não foi possível a coleta de volumes maiores que 1mL, o que pode ter sido um fator de influência para o sucesso de isolamento.

Com o crescimento das populações, muitas vezes ocorrendo de forma desordenada, mamíferos, como os morcegos, vêm encontrando espaço de desenvolvimento em áreas urbanas. Tais fatos favorecem a urbanização de agentes patogênicos ao homem¹⁴, como o vírus da raiva e possivelmente tripanosomatídeos, demonstrando a importância de estudos envolvendo a infecção natural desses animais.

Embora pouco se saiba sobre o papel que os morcegos assumem no ciclo epidemiológico de certas espécies de tripanosomas, o fato de albergarem parasitas como *Trypanosoma cruzi*⁵, *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma equiperdum*¹⁰ constitui elemento de grande preocupação para a saúde humana e animal. Por essa razão, *Desmodus rotundus* foi a espécie mais investigada neste estudo, uma vez que morcegos de hábitos hematófagos podem no ato de hematofagia adquirir e veicular agentes patogênicos, como é descrito no ciclo da raiva em ambiente rural¹¹.

No Estado do Rio de Janeiro, são poucos os relatos da infecção natural de morcegos por flagelados tripanosomatídeos e o encontro de 22 amostras demonstra claramente o envolvimento desses animais com esses protozoários. Tal achado torna-se relevante, já que muitas espécies de morcegos adaptam-se aos ambientes modificados e instalam-se em áreas domiciliares, representando um risco potencial para a disseminação no ambiente doméstico e peridoméstico. Deve-se levar em conta, também, que as colônias de morcegos eventualmente trocam de abrigo, aumentando assim a possível dispersão de algumas espécies de tripanosomatídeos que, por sua vez, podem ser agentes/vetores de importantes doenças. Os isolados obtidos estão sendo estudados para identificação etiológica.

Os resultados deste estudo podem contribuir para o conhecimento e mapeamento das espécies de tripanosomatídeos que estejam circulando entre morcegos no Estado do Rio de Janeiro.

AGRADECIMENTOS

Aos técnicos da Equipe de Vigilância Hospedeiros, Reservatórios e Animais Peçonhentos da Secretaria Estadual de Saúde e Defesa Civil do Rio de Janeiro (SESDEC-RJ), pela adesão e participação no trabalho de campo.

REFERÊNCIAS

1. Bower SM, Woo PTK. Two new species of trypanosomes (subgenus *Schizotrypanum*) in bats from southern Ontário. *Canadian Journal of Zoology* 59: 530-545, 1981.
2. Chiari E, Dias JCP, Lana M, Chiari CA. Hemoculture for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas disease. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 22:19-23, 1989.
3. Deane L. Tripanosomatídeos de mamíferos da Região Amazônica I. Alguns flagelados encontrados no sangue de mamíferos silvestres do estado do Pará. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 3:15, 1961.
4. Field H, Mackenzie J, Daszak P. Novel viral encephalitides associated with bats (Chiroptera) – host management strategies. *Archives of Virology* 18(suppl):113-121, 2004.
5. Funayama GK, Barreto MP. Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XXXVIII: Infecção natural do morcego *Desmodus rotundus rotundus* (Geofroy, 1810) pelo *T. cruzi*. *Revista Brasileira de Biologia* 30:13-19, 1970.
6. Hoare CA. The Trypanosomes of Mammals: A zoological monograph. Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburg, UK, p. 327-400, 1972.
7. Marinkelle CJ. The biology of the trypanosomes of bats. In: Lumsden WHR, Evans DA (eds) *Biology of the Kinetoplastida*. Academic Press New York, p.175-216, 1976.
8. Mayen F. Haematophagus bats in Brazil, their role in rabies transmission, impact on public health, livestock industry and alternatives to an indiscriminate reduction of bat population. *Journal of Veterinary Medicine, Series B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health* 50:469-472, 2003.
9. Messenger SL, Rupprecht CE, Smith SJ. Chapter 14 - Bats, emerging virus infections and the rabies paradigm. In: Kunz TH, Fenton MB (eds) *Bat Ecology*. The University of Chicago Press, Chicago, p.622-679, 2003.
10. Molyneux DH. Trypanosomes of bats. In: Kreier JP, Baker JR (eds) *Parasitic protozoa*. Academic Press, San Diego, p. 195-224, 1991.
11. Romijn PC, Van Der Poel WHM, Van Der Heide R, Cattaneo CAM, Silva RCF. Study of Lyssaviruses of bat origin as a source of rabies for other animal species in the State of Rio de Janeiro – Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 69:81-86, 2003.
12. Saravia NG, Holguín AF, Gibulskis RE, D'Alessandro A. Divergent isoenzyme profiles of sylvatic and domiciliary *Trypanosoma cruzi* in the eastern plains, piedmont, and highlands of Colômbia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 36: 59-69, 1987.
13. Steindel M, Grisard EC, Pinto CJC, Cordeiro FD, Ribeiro-Rodrigues R, Romanha AJ. Characterization of trypanosomes from the subgenus *Schizotrypanum* isolated from bats, *Eptesicus* sp. (Chiroptera:Vespertilionidae), captured in Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. *Journal of Parasitology* 84:601-607, 1998.
14. Taylor LH, Latham SM, Wollhouse MEJ. Risk factors for human disease emergente. *Philosophical Transactions of the Royal Society London B* 356:983-989, 2001.

Anexo 3 – Artigo submetido ao periódico *Parasitology*.



**Biological and molecular study of trypanosomatids
flagellates isolated from bats in the State of Rio de Janeiro,
Brazil**

Journal:	<i>Parasitology</i>
Manuscript ID:	PAR-2009-0059
Manuscript Type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	30-Jan-2009
Complete List of Authors:	Barros, Juliana; Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas Romijn, Phyllis; Embrapa, Laboratório de Biologia Animal Baptista, Cibele; Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas Fagundes, Aline; Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas Pinto, Andressa; Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas Madeira, Maria de; Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas
Key Words:	Chiroptera, Trypanosoma, Rio de Janeiro, zimodeme, isoenzyme, PCR

1
2
3 Biological and molecular study of trypanosomatids flagellates isolated from bats in the
4
5 State of Rio de Janeiro, Brazil
6
7
8
9

10 J.H.S. BARROS^{1*}, P.C. ROMIJN², C. BAPTISTA¹, A. FAGUNDES¹, A.G.S. PINTO¹
11
12 and M.F. MADEIRA¹
13
14
15
16

17 ¹ *Laboratório de Vigilância em Leishmanioses, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro*
18 *Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil*
19
20
21

22 ² *Laboratório de Biologia Animal, Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do*
23 *Rio de Janeiro, Niterói, RJ, Brasil*
24
25
26
27
28

29 Running title: *Trypanosoma* spp. from bats in State of Rio de Janeiro
30
31
32
33

34 * Corresponding author. Laboratório de Vigilância em Leishmanioses, Instituto de
35 Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, 21045-
36
37 900 Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Tel: +55 21 3865 9541. Fax: +55 21 3865 9541. E-mail:
38
39 juliana.helena@ipecc.fiocruz.br
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

SUMMARY

Different species of parasites of the genus *Trypanosoma* are described in bats. This paper aimed to identify 12 isolated samples from chiroptera caught in the State of Rio de Janeiro. All samples have been obtained by blood culture and assessed as to the sensitivity to the complement system; infecting potential to in vitro murine macrophages; infecting potential to triatomine; analysis of the isoenzymatic profile (MLEE) and assessment by PCR using different molecular targets. Biological characteristics showed similar standards among the isolates: all were sensitive to complement, presenting 100% lysis of epimastigote forms; they neither evolved to macrophages, nor could infect and colonize salivary glands, hemolymph and the intestinal tract of *Triatoma infestans*. Three zymodemes were observed by MLEE, all of which differed from the samples of *Trypanosoma cruzi*, *T. rangeli* and *T. dsterrensensis*, which have been employed in this analysis. No amplification products were obtained by PCR using specific sequences of *T. rangeli* (R1/R2). Using primers D71/D72 (*T. cruzi*-specific), products with about 450, 520, 850 and 900bp were observed in zymodeme ZM1 and a product about 120bp in zymodemes ZM2 and ZM3. Therefore, using primers D75/D76 (generic for trypanosomatids) products with about 250, 260 and 260bp were observed in zymodemes ZM1, ZM2 and ZM3, respectively. Bats change shelters, and this characteristic is a potential factor for disseminating pathogenic agents. The finding of the same phenotype in different Municipal Districts of the State of Rio de Janeiro shown in this study evidences such characteristic, which epidemiologic implications are discussed.

Key words: Chiroptera, *Trypanosoma*, Rio de Janeiro, zimodeme, isoenzyme, PCR.

1
2
3 INTRODUCTION
4

5 Bats are mammals that belong to the Chiroptera order that have quite distinct alimentary
6 habits, which, in accordance with such characteristics, may represent an important
7 ecological role or be potential transmitters of important agents in public health (Hoare,
8 1972). Infectious diseases emerging in wild animals in general are being largely
9 considered (Daszak *et al.* 2000) and the Chiroptera may be listed as an important focus
10 within this context (Messenger *et al.* 2003; Field *et al.* 2004).
11
12
13
14
15
16
17
18

19 The natural infection by different species of the *Trypanosoma* gender is described in
20 these animals in several regions of the world (Hoare, 1972; Marinkelle, 1976; Bower
21 and Woo 1980a,b; Molyneux, 1991; Grisard *et al.* 2003; Maia da Silva *et al.* 2008),
22 however, the presence of the *T. cruzi*, etiologic agent of the Chagas disease, is one of
23 the main concerns. There is little knowledge on the natural cycle of such agents in these
24 animals and, despite bats may act as hosts and possibly as vectors of some species of
25 *Trypanosoma*. Experimental studies that could be extremely clarifying are scarce due to
26 the difficulty of keeping Chiroptera in captivity situations (Freitas *et al.* 2006).
27 Recently, *Leishmania chagasi* was first described in a specimen caught in Argentina, a
28 fact that may widen the focus of interest in these animals in areas of occurrence of the
29 visceral leishmaniasis (De Lima *et al.* 2008).
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44

45 In the State of Rio de Janeiro, in the Southeast region of Brazil, studies with
46 Chiroptera are mainly centered in the monitoring of the rabies virus in species with
47 hematophagous habits, which are the main disseminators of Rabies to herbivore
48 (Romijn *et al.* 2003). Related to this, Trypanosomatids flagellates have been isolated
49 from bats with different alimentary habits (Barros *et al.* 2008), showing the importance
50 of a comprehensive assessment of the parasites that may be circulating in these animals,
51 and the identification of these isolates is critical for such knowledge. In this study we
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 describe the biological, biochemical and molecular characteristics of 12 samples of
4
5 parasites of the genus *Trypanosoma* isolated from *Desmodus rotundus* and *Lonchorhina*
6
7 *aurita*, which were caught at different Municipal Districts of the State of Rio de Janeiro.
8
9

10 11 12 MATERIALS AND METHODS

13 14 15 *Parasites*

16
17 Twelve samples have been studied, all of which acquired by blood culture from bats
18
19 caught in the Municipal Districts of Miracema (M066, M067, M069, M077, M1011,
20
21 M1012, M1013, M1014, M1015); Paraty (M1008); Maricá (M387) and Niterói (M209),
22
23 in the State of Rio de Janeiro. All samples have been kept in a biphasic medium
24
25 (NNN/Schneider's) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) at 28°C .
26
27
28
29
30
31

32 33 34 *Induction of metacyclogenesis*

35
36 Epimastigote forms of 10 isolates (M066, M067, M069, M077, M209, M387, M1008,
37
38 M1011, M1012, M1013) were transferred at 1×10^6 parasites/mL ratio to a RPMI
39
40 medium with 5% FCS in pH 8.0, for purposes of differentiation and acquisition of
41
42 trypomastigote forms, following a protocol described by Koerich *et al.* (2002).
43
44
45

46 47 48 *Evaluation of the sensitivity to the complement system*

49
50 Epimastigote forms of all isolates have been exposed to the complement system,
51
52 following protocols described by Steindel *et al.* (1998). The lysis was assessed in
53
54 triplicate, upon counting parasites in the Neubauer chamber. Inactivated human serum
55
56 and samples of *T. cruzi* (Y strain) and *T. rangeli* (SC-58) were used as control of the
57
58 assays.
59
60

In vitro Experimental Infection

The infecting potential of mammals' cells was investigated for all studied isolates. Murine peritoneal macrophages were taken from Swiss webster adult mice (outbreed) by peritoneal lavage. Plating and incubation were performed in slides for culture at 37°C in 5% CO₂. After the 24-hour-plating, culture forms were put in contact with the macrophage monolayer. The cellular infection was assessed at intervals of 3, 24, 48 and 72 hours after infection by optical microscopy, in triplicate.

Infection in Triatomines

Nymphs of the 4th and 5th stage of the *Triatoma infestans* kindly assigned by the center of the Triatomine Collection of Fiocruz have been employed. Rabbit's erythrocytes were washed in physiologic solution and mixed with culture forms at a 1:1 ratio (v/v) and placed in the artificial feeder connected to a double boiler with water circulating at 37°C. At different times (15, 30 and 45 days), about 10 triatomines, fed with each isolate were dissected, assessing the presence of flagellates in the digestive tube, in hemolymph and salivary glands.

Multilocus enzyme electrophoresis (MLEE)

The isoenzyme electrophoresis technique was used in accordance to the protocols described by Cupolillo *et al.* (1994). Nine enzymatic systems have been analyzed: nucleotidases (NH - E.C.3.2.2.1); phosphoglucomutase (PGM - E.C.2.7.5.1); mannose phosphate dehydrogenase (MPI - E.C.5.3.1.8); 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGDH - E.C.1.1.1.43); malic enzyme (ME - E.C.1.1.1.40); glucose phosphate isomerase (GPI - E.C. 5.3.1.9); glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6P - E.C.1.1.1.49); malate dehydrogenase (MDH - E.C.1.1.1.37); isocitrate dehydrogenase

1
2
3 (IDH - E.C.1.1.142). The electrophoretic mobility of the isolates was compared to the
4
5 reference samples: *Trypanosoma cruzi* (Y and CL strains), *Trypanosoma rangeli*
6
7 (Choachi strain) and *Trypanosoma desterrensis* (Grisard *et al.* 2003). A matrix
8
9 identifying either the presence or absence of bands was created from acquired data and
10
11 it was analyzed by the NTSYS application using the Simple Matching Coefficient.
12
13 Upon using this coefficient, it was established a similarity matrix between isolates,
14
15 which was transformed into a dendrogram by the non-weighting method of grouping to
16
17 pairs by arithmetic mean (UPGMA).
18
19
20
21
22
23
24

25 *PCR assay*

26
27 The cultured epimastigotes were harvested by centrifugation and washed in sterile PBS.
28
29 DNA was extracted by DNAzol (Invitrogen) according to the manufacturer instruction.
30
31 For molecular analysis, several PCR assay were applied in this study. Specific
32
33 sequences have been used for *T. cruzi* (D71: 5' AAGGTGCGTCGACAGTGTGG 3'
34
35 and D72: 5' TTTTCAGAATGGCCGAACAGT 3') (Souto and Zingales, 1993);
36
37 specific sequences for *T. rangeli* (R1: 5' CGCGGCTCGCACTGCACCTC 3' and R2:
38
39 5' GGCGCATCCACCGAGCACTG 3') (Vargas *et al.* 2000) and conserved sequences
40
41 targeted to all trypanosomatids (D75: 5' GCAGATCTTGGTTGGCGTAG 3' and D76:
42
43 5' GGTTCTCTGTTGCCCTTTT 3') (Souto *et al.* 1999). The PCR products and a
44
45 DNA ladder (100bp) as molecular size marker were loaded onto the slots of agarose
46
47 gels. Electrophoresis was performed at 70-73 V, for 1-2 h and the gels were stained with
48
49 ethidium bromide, examined, and photographed under ultraviolet light.
50
51
52
53

54 RESULTS

55 *Parasites*

56
57
58
59
60

1
2
3 The parasites were kept by weekly passages in NNN/Schneider's medium, showing a
4 great polymorphism among the isolates. Samples M1014 and M1015 were outstanding
5 for presenting 60% of trypomastigote forms. Through the induction of
6 metacyclogenesis in RPMI medium (pH 8.0) only one isolate (M1011) managed to
7 progress, showing an increase of trypomastigote forms (13%) compared to 4% found
8 when they were kept in NNN/Schneider's. The other samples did not progress under
9 the established conditions.
10
11
12
13
14
15
16
17
18

19 20 21 22 *Assessment by Complement System*

23 All isolates were sensitive to human complement showing 100% lysis of epimastigote
24 forms. The use of inactivated serum inhibited the occurrence of lysis in all samples.
25
26
27
28
29
30
31

32 *In vitro Experimental Infection*

33 Of the 12 samples studied, none of them progressed to macrophagic cells assessed in
34 vitro. Generally, after the 3-hour-interaction, parasites were seen adhered to the surface
35 of cells, and at the 24 and 48 hours points the internalization and destruction of
36 protozoan in all samples was noticed. After 72 hours, macrophages were found full of
37 vacuoles with no sign of parasites inside the cells.
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47

48 *Infection in Triatomines*

49 There was no evidence of the presence of any flagellate form in the digestive tube,
50 hemolymph and salivary glands in all isolates studied up to 45 days after feeding.
51
52
53
54
55
56
57

58 *Enzyme Electrophoresis*

59 The standard of the electrophoretic profile of the 12 samples isolated from bats differed
60

1
2
3 from the reference samples in the nine enzymatic systems employed in the study.
4
5 However, it was possible to group the samples in three distinct zymodemes: ZM1
6
7 (M066, M067, M069, M077, M209, M387, M1008, M1012, M1013), ZM2 (M1014,
8
9 M1015) and ZM3 (M1011) (Figure 1).
10
11

12 13 14 15 *PCR*

16
17 Using primers R1/R2 (*T. rangeli*-specific), no amplification product was observed in all
18
19 bats isolated (Figure 2A). When primers D71/D72 (*T. cruzi*-specific) were used, four
20
21 products about 450, 520, 850 and 900bp were observed in zymodemes ZM1 and one
22
23 product of about 120bp was noticed in ZM1 and ZM2 (Figure 2B). Therefore, using
24
25 primers D75/D76 (generic for trypanosomatids) products of about of 250, 260 e 260bp
26
27 were observed in ZM1, ZM2 and ZM3, respectively (Figure 2C).
28
29
30
31
32

33 34 DISCUSSION

35
36 Bats are animals with quite distinct alimentary habits, presenting as frugivore,
37
38 pollenivore, folivore, insectivore and hematophagous species. In this paper, 11 samples
39
40 were obtained from hematophagous species and one sample was taken from an
41
42 insectivore specimen, showing that, irrespectively of the alimentary habits, the
43
44 trypanosomatids are able to infect bats' blood.
45
46
47

48
49 The classic identification of trypanosomatid protozoan counts on several tools, and
50
51 the isolation and in vitro maintenance is critical in this process. All specimens studied
52
53 here were easily isolated, showing a good growth in NNN/Scheneider's medium
54
55 supplemented with 10% fetal calf serum. Our group has shown that some trypanosomes
56
57 samples isolated from bats can not evolve in vitro (Barros *et al.* 2008), maybe
58
59 suggesting that a great range of flagellates can be infecting bats in the State of Rio de
60

1
2
3 Janeiro. The sensitivity to the complement system is a biological characteristic quite
4 used in the distinction between *T. cruzi* and *T. rangeli* (Schottelius, 1982). In this study,
5
6 all samples isolated from bats were sensitive to the complement, showing 100% lysis.
7
8 In the same manner, studies carried out by Steindel *et al.* (1998) showed that samples
9
10 isolated from bats also lysed upon exposure to the complement. These findings may
11
12 suggest that biological characteristics common to trypanosomes that infect bats.
13
14
15
16

17 The infective potential of trypanosomatid protozoan to mammals' cells, as an
18 auxiliary tool in the identification of new isolates, has been reported (Martínez-Días *et*
19 *al.* 2001). In this study, it has been noticed that the bats isolates did not present this
20 potential to murine macrophagic cells. The low percentage of trypomastigote forms
21 noticed in the studied samples may have been a relevant factor, as the higher the
22 percentage of these forms, the more successful the in vitro infection (Martínez-Días *et*
23 *al.* 2001). However, this same finding was noticed with two samples (M1014 and
24 M1015), which presented a high percentage of trypomastigote forms.
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35

36 It is not known which trypanosomatid vectors may be associated to bats. However,
37 it is known that both phlebotomies (Lampo *et al.* 2000) and triatomines (Assis *et al.*
38 2007) naturally feed in these animals, being able to be, thus, potential disseminators of
39 such parasites. Thomas *et al.* (2007) experimentally showed the infection of bats, both
40 by oral administration, from the ingestion of triatomines, and by contaminating
41 pathway, exposing bats to triatomines infected with parasites. Such study shows the
42 importance the bats can assume in the transmission cycle of different species of
43 trypanosomatids, irrespectively of its alimentary habit and the results found here
44 reinforce such statement.
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56

57 The biologic methods are critically important in the study of these parasites, being
58 explored in different contexts. However, they may not be definitive in the etiologic
59
60

1
2
3 identification process. In this study, through biological approaches, all the 12 samples
4
5 isolated from bats showed common characteristics: they were sensitive to complement
6
7 and they neither infected *in vitro* cells, nor triatomines. However, these findings have
8
9 not been confirmed by biochemical and molecular tools, disclosing differences among
10
11 the isolates.
12
13

14
15 By MLEE, we noticed that the samples studied could be gathered in three distinct
16
17 groups or three zymodemes. An interesting result was that the same zymodeme (ZM1)
18
19 was found in bats caught in different Municipal Districts (Miracema, Niterói, Maricá
20
21 and Paraty), reinforcing a so common characteristic of these animals, which is the habit
22
23 of migrating to other regions. Considering such characteristic, it is possible to state that
24
25 bats can transport parasites from a region to others, representing a warning to the
26
27 epidemiologic surveillance. Besides, zymodeme ZM1 found in the Municipal District
28
29 of Miracema was obtained at distinct time points (4 samples in the year of 2004 and 2 in
30
31 the year of 2007), evidencing that certain phenotypes can be kept among these animals
32
33 for long term. Another result observed was that three zymodemes (ZM1, ZM2 and
34
35 ZM3) were found in bats from the same Municipal District (Miracema), evidencing that
36
37 different species of parasites can circulate within the same region. With regard to the
38
39 possibility of direct transmission of flagellates among bats, despite being considered,
40
41 mainly due to the habit of aggregation of specimens in colonies (Molyneux, 1991), we
42
43 did not notice mixed infections in any of the studied regions. The sample isolated from
44
45 a sole insectivore specimen constituted the ZM3.
46
47
48
49
50
51

52
53 The PCR findings, using specific primers, showed that there was no *T. cruzi* in any
54
55 studied sample. Recently Lisboa *et al.* (2008) described the isolation of *T. cruzi* in 14%
56
57 of the bats assessed in several regions of Brazil. Despite the *T. cruzi* being quite
58
59 reported in bats, the real importance of these animals in the natural transmission cycle is
60

1
2
3 ignored (Saravia *et al.* 1987). However, it is known that they are deemed important
4
5 links between the wild and the domestic environment.
6
7

8 The results found here show that different species of parasites of the genus
9
10 *Trypanosoma* are circulating among bats, being such results important, as there is little
11
12 information on the subject, mainly in the State of Rio de Janeiro. The identification and
13
14 monitoring of these parasites are relevant in the epidemiologic surveillance actions.
15
16
17

18
19
20 This study is supported by grants from Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio de
21
22 Janeiro (FAPERJ). The authors thank the Laboratory of Triatomines, Instituto Oswaldo
23
24 Cruz, Rio de Janeiro, for the donation of the triatomine bugs used in this study. The
25
26 project was approved by the Committee of Ethics of Use of Animals of Fiocruz under
27
28 license number L-051/08.
29
30
31

32 33 34 REFERENCES

- 35
36 **Assis, G. F. M., Azeredo, B. V. M., Fuente, A. L. C., Diotaiuti, L. and Lana, M.**
37
38 (2007). Domiciliation of *Triatoma pseudomaculata* (Corrêa e Espínola 1964) in the
39
40 Jequitinhonha Valley, State of Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de*
41
42 *Medicina Tropical* **40**, 391-396. doi: 10.1590/S0037-86822007000400003.
- 43
44 **Barros, J. H. S., Romijn, P. C., Baptista, C., Pinto, A. G. S. and Madeira, M. F.**
45
46 (2008). Relato da infecção natural de morcegos por flagelados tripanosomatídeos
47
48 em diferentes municípios do Estado do Rio de Janeiro. *Revista da Sociedade*
49
50 *Brasileira de Medicina Tropical* **41**, 683-685. doi: 10.1590/S0037-
51
52 86822008000600025.
- 53
54 **Bower, S. M. and Woo, P. T. K.** (1981a). Two new species of trypanosomes (subgenus
55
56 *Schizotrypanum*) in bats from southern Ontario. *Canadian Journal Zoology* **59**,
57
58 530-545.
- 59
60 **Bower, S. M. and Woo, P. T. K.** (1981b). Development of *Trypanosoma*
(*Schizotrypanum*) *hedrick* in *Cimex brevis* (Hemiptera:Cimicidae). *Canadian*
Journal Zoology **59**, 546-554.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
- Cupolillo, E., Grimaldi, J. R. G. and Momen, H.** (1994). A general classification of new world *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **50**, 296-311.
- Daszak, P., Cunningham, A. A. and Hyatt, A. D.** (2000). Emerging infectious diseases of wildlife – threats to biodiversity and human health. *Science* **287**, 443-449.
- De Lima, H., Rodríguez, N., Barrios, M. A., Ávila, A., Cañizales, I. and Gutiérrez, S.** (2008). Isolation and molecular identification of *Leishmania chagasi* from a bat (*Carollia perspicillata*) in northeastern Venezuela. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **103**, 412-414. doi: 10.1590/S0074-02762008000400018.
- Field, H., Mackenzie, J. and Daszak, P.** (2004). Novel viral encephalitides associated with bats (Chiroptera) – host management strategies. *Archives of Virology* **18**, 113-121.
- Freitas, M. B., Welker, A. F. and Pinheiro, E. C.** (2006). Seasonal variation and food deprivation in common vampire bats (Chiroptera: Phyllostomidae). *Brazilian Journal of Biology* **66**, 1051-1055. doi: 10.1590/S1519-69842006000600012.
- Grisard, E. C., Sturm, N. R. and Campbell, D. A.** (2003). A new species of trypanosome, *Trypanosoma desterrensis* sp. n., isolated from South American bats. *Parasitology* **127**, 265-71.
- Hoare, C. A.** (1972). *The Trypanosomes of Mammals: A zoological monograph*. Blackwell Scientific Publications, Oxford-Edinburgh, UK.
- Koerich, L. B., Emmanuelle-Machado, P., Santos, K., Grisard, E. C. and Steindel, M.** (2002). Differentiation of *Trypanosoma rangeli*: high production of infective trypomastigote forms in vitro. *Parasitology Research* **88**, 21-25. doi: 10.1007/s004360100501.
- Lampo, M., Feliciangeli M. D., Márquez, L. M., Bastidas C. and Lau, P.** (2000). A possible role of bats as a blood source for the *Leishmania* vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **62**, 718-719.
- Lisboa, C. V., Pinho, A. P., Herrera, H. M., Gerhardt, M., Cupolillo, E. and Jansen, A.M.** (2008). *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) genotypes in neotropical bats in Brazil. *Veterinary Parasitology*. doi:10.1016/j.vetpar.2008.06.004.
- Maia da Silva, F., Marcili, A., Lima, L., Cavazzana, J. M., Ortiz, P. A., Campaner,**

- 1
2
3 **M., Takeda, G. F., Paiva, F., Nunes, V. L., Camargo, E. P. and Teixeira, M. M.**
4
5 (2008). *Trypanosoma rangeli* isolates of bats from Central Brasil: genotyping and
6
7 phylogenetic analysis enable description of a new lineage using spliced-leader gene
8
9 sequences. *Acta Tropica*. doi: 10.1016/j.actatropica.2008.11.005.
- 10 **Marinkelle, C. J.** (1976). The biology of the trypanosomes of bats. In: *Biology of the*
11
12 *Kinetoplastida* (ed Lumdsen, W.H.R.& Evans, D.A.), pp.175-216. Academic Press,
13
14 New York.
- 15 **Martínez-Díaz, R. A., Escario, J. A., Nogal-Ruiz, J. J. and Barrio, A.G.** (2001).
16
17 Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. *Memórias do Instituto*
18
19 *Oswaldo Cruz* **96**, 53-59. doi: 10.1590/S0074-02762001000100006.
- 20 **Messenger, S. L., Rupprecht, C. E. and Smith, S. J.** (2003). Bats, emerging virus
21
22 infections and the rabies paradigm. In *Bat Ecology*, (ed Kunz, T.H. & Fenton,
23
24 M.B.), pp.622-679. The University of Chicago Press, Chicago.
- 25 **Molyneux, D. H.** (1991). Trypanosomes of bats. In: *Parasitic protozoa* (ed Kreier, J. P.
26
27 & Baker, J. R.), pp. 195-223. Academic Press, New York.
- 28 **Romijn, P. C., Van Der Poel, W. H. M., Van Der Heide, R., Cattaneo, C. A. M. and**
29
30 **Silva, R. C. F.** (2003). Study of Lyssaviruses of bat origin as a source of rabies for
31
32 other animal species in the State of Rio de Janeiro – Brazil. *American Journal of*
33
34 *Tropical Medicine and Hygiene* **69**, 81-86.
- 35 **Saravia, N. G., Holguin, A. F., Cibulskis, R. E. and D'Alessandro, A.** (1987).
36
37 Divergent isoenzyme profiles of sylvatic and domiciliary *Trypanosoma cruzi* in the
38
39 eastern plains, piedmont, and highlands of Colombia. *American Journal of Tropical*
40
41 *Medicine and Hygiene* **36**, 59-69.
- 42 **Schottelius, J.** (1982). Differentiation between *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* by
43
44 their different complement sensitivity. *Tropical Medicine and Parasitology* **33**, 147-
45
46 150.
- 47 **Souto, R. P., Zingales, B.** (1993). Sensitive detection and strain classification of
48
49 *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. *Molecular and*
50
51 *Biochemical Parasitology* **62**, 45-52. doi:10.1016/0166-6851(93)90176-X.
- 52 **Souto, R. P., Vargas, N., Zingales, B.** (1999). *Trypanosoma rangeli*: Discrimination
53
54 from *Trypanosoma cruzi* based on a variable domain from the large subunit
55
56 ribosomal RNA gene. *Experimental Parasitology* **91**, 306-314.
57
58 doi:10.1006/expr.1998.4380.
- 59
60 **Steindel, M., Grisard, E. C., Pinto, C. J. C., Cordeiro, F. D., Ribeiro-Rodrigues, R.**

1
2
3 **and Romanha, A. J.** (1998). Characterization of trypanosomes from the subgenus
4 *Schizotrypanum* isolated from bats, *Eptesicus* sp. (Chiroptera:Vespertilionidae),
5 captured in Florianópolis, Santa Catarina. Brazilian. *Journal of Parasitology* **84**,
6 601-607.
7
8
9

10 **Thomas, M. E., Rasweiler, J. J. and D'Alessandro, A.** (2007). Experimental
11 transmission of the parasitic flagellates *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma*
12 *rangeli* between triatomine bugs or mice and captive neotropical bats. *Memórias do*
13 *Instituto Oswaldo Cruz* **102**, 559-565.
14
15
16

17 **Vargas, N., Souto, R. P., Carranza, J. C., Vallejo G. A. and Zingales, B.** (2000).
18 Amplification of a specific repetitive DNA sequence for *Trypanosoma rangeli*
19 identification and its potential application in epidemiological investigations.
20 *Experimental Parasitology* **96**, 147-159. doi: 10.1006/expr.2000.4563.
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

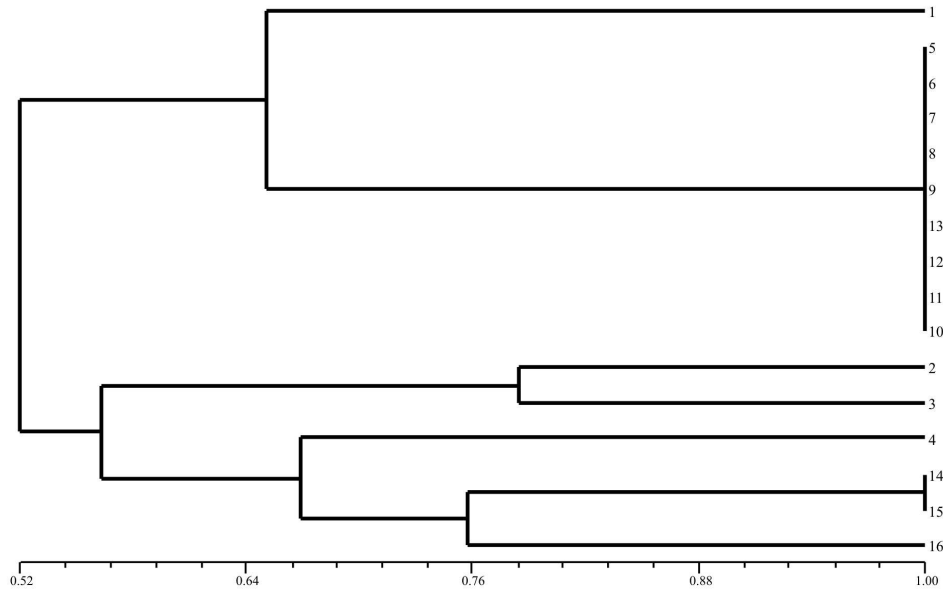


Fig 1. UPGMA dendrogram built with the simple matching coefficient of similarity based on the phenetic profiles obtained from isoenzyme analysis (MLEE). Reference strains: 1 - *Trypanosoma rangeli* (Choachi); 2 and 3 - *Trypanosoma cruzi* (Y, CLBrenner), 4 - *Trypanosoma desterrensis*. Bats samples: 5 to 13 - ZM1 (M209, M066, M1067, M069, M077, M387, M1008, M1012, M1013); 14 and 15 - ZM2 (M1014, M1015); 16 - ZM3 (M1011).
164x106mm (300 x 300 DPI)

Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

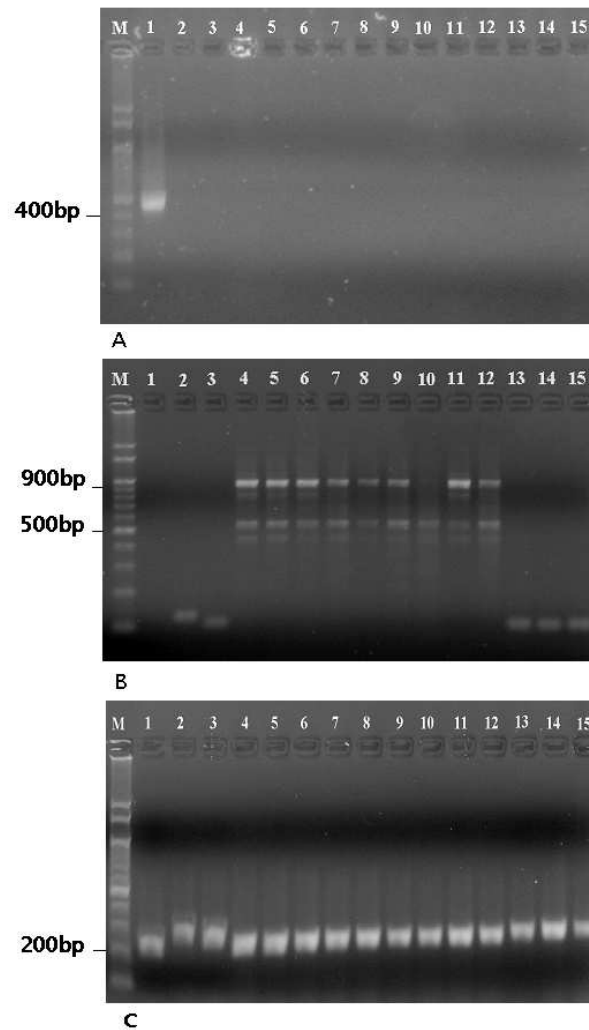


Fig. 2. Products amplified by PCR assays. A - *Trypanosoma rangeli*-specific with primers R1/R2; B - *Trypanosoma cruzi*-specific with primers D71/D72; C- Family Trypanosomatidae-specific with primers D75/D76. Slots: (M)100bp ladder; (1) *Trypanosoma rangeli* (Choachi strain); (2) *Trypanosoma cruzi* II (Y strain); (3) *Trypanosoma cruzi* I (Dm28c clone); (4) M209; (5) M066; (6) M067; (7) M069; (8) M077; (9) M387; (10) M1008; (11) M1012; (12) M1013; (13) M1014; (14) M1015; (15) M1011.
190x275mm (96 x 96 DPI)