

PREVALÊNCIA DE ZONOSES PARASITÁRIAS EM MORCEGOS DO MUNICÍPIO DE SÃO PAULO, BRASIL

Savani, E.S.M.M¹; Pinto, P.L.S².; Almeida, M.F¹; D'auria S.R.N¹; Camargo, M.C.G.O¹; Rosa, A.R¹; Melo, L.C.V.², Yai, L.E.O¹; Maeda, M.M¹ e Sacramento, D.R.V.³

RESUMO

Existem 1.198 espécies de morcegos no mundo, sendo que 167 delas são encontradas no Brasil. É um animal de relevante papel ecológico como agente controlador da população de insetos noturnos (insetívoros) e excelente polinizador (fitófagos), embora seja, também, reservatório de algumas zoonoses, sendo a raiva e a histoplasmoze as mais conhecidas. Esse projeto se propoe a estudar o potencial zoonótico parasitário dos morcegos no Município de São Paulo, recebidos ou capturados pelo Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura de São Paulo, no período de abril a dezembro de 2007. Foram realizados diagnóstico em 340 espécimes para tripanossomatídeos dos gêneros *Tripanossoma* e *Leishmania* (sorologia, exame direto, cultivo de vísceras e PCR), pesquisa de parasitas do tubo digestório (helmintos, *Cryptosporidium* e *Microsporidium*) e produção de conjugado anti-morcego para dosagem de anticorpos nos testes sorológicos. Paralelamente, foi feita a identificação da espécie e registrados dados morfológicos e biológicos tais como sexo, faixa etária, estágio reprodutivo, entre outros. Dos 340 morcegos, 160 pertenciam à Família Molossidae, morcegos insetívoros, 147 à Família Phyllostomidae, morcegos nectarívoros ou frugívoros e 33 à Família Vespertilionidae, morcegos insetívoros. Onze morcegos foram positivos na técnica PCR para tripanossomatídeos e 48 morcegos foram reagentes na sorologia (doze para leishmaniose e 36 Chagas). Cinquenta e quatro tubos digestórios apresentaram algum tipo de infecção por helmintos, correspondendo a 15,88% de positividade. Todas as amostras foram negativas para *Cryptosporidium* ssp e microsporídios. Somente com estudos que esclareçam o potencial zoonótico desses animais em área urbana é que se pode estabelecer medidas preventivas e/ou de controle de zoonoses, bem como transmitir informações que orientem a população a conviver de maneira harmoniosa com as populações destes animais.

INTRODUÇÃO

Os morcegos pertencem à Ordem Chiroptera (cheiros=mão e pteron=asa) e representam cerca de um quarto de toda a fauna de mamíferos do mundo; constituem o segundo maior grupo de mamíferos, superado apenas pela ordem Rodentia. Estão distribuídos por todo o mundo com exceção de regiões polares e de ilhas afastadas dos continentes. Cento e sessenta e sete dessas espécies são encontradas no Brasil, um dos países com maior diversidade e com representantes de todos os hábitos alimentares (insetívoros, nectarívoros, frugívoros, hematófagos, onívoro, piscívoro e carnívoros). Sua importância ecológica está estabelecida, tanto como participante na cadeia alimentar dos mais diversos ecossistemas (entre eles o de cavernas), e também como dispersor de sementes (frugívoros), polinização de flores (nectarívoros) ou na predação de algumas populações de insetos noturnos (insetívoros). Os morcegos insetívoros ocorrem em quase todo mundo e compreendem cerca de 70% das espécies. Os morcegos fitófagos (frugívoros e nectarívoros) ocorrem em áreas urbanas e rurais, explorando frutas nos pomares e flores de arborização urbana em ruas e praças.

Vinte e nove das 144 espécies brasileiras já foram observadas explorando abrigos em habitações humanas (sótão, porão, juntas de dilatação de construções, ocos de árvores em quintais de residências, entre outros). Essa proximidade aumenta a probabilidade de contato desses animais com humanos e/ou com seus animais de estimação e, conseqüentemente, o risco de transmissão dos agentes patogênicos que esses animais podem carregar como reservatório.

OBJETIVO

Estudar o potencial zoonótico parasitário dos morcegos do Município de São Paulo, recebidos ou capturados pelo Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura de São Paulo, no período de abril a dezembro de 2007.

MATERIAL E MÉTODO

Foram submetidos a diagnóstico, animais vivos ou mortos, de todas as espécies e de ambos os sexos. O animal era pesado e anestesiado com quantidade adequada (peso/volume) de Cloridrato de Cetamina, via intramuscular, para coleta de sangue por

punção cardíaca com seringa de 1ml e agulha 13x4. Após a coleta do sangue, o animal era sacrificado em câmara de CO₂ e transferido para capela de fluxo laminar na qual era feita a retirada asséptica das vísceras.

Tripanosomatídeos:

1-Sorologia

As amostras de soros foram testadas, por meio da reação de imunofluorescência indireta (RIFI), na diluição 1:4 utilizando como antígenos promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, cepa IFLA/BR/67/PH8 (cedida pelo Instituto Evandro Chagas) e epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (cepa Y IAL – 1784, antígeno cedido pelo Instituto Adolfo Lutz), fixados em lâminas de vidro. Caso o resultado se apresentasse reagente, a reação era repetida, diluindo-se o soro na razão 2 a partir da diluição 1:4, para titulação do soro até a maior diluição reagente.

2-Exame direto (método de Giemsa)

Foram realizados esfregaços de sangue circulante dos morcegos e de macerados de fragmentos do baço e fígado. As lâminas foram fixadas em metanol por 2 minutos, coradas com Giemsa por uma hora e examinadas por microscopia (100X), a fim de pesquisar formas características de *Trypanosoma* e *Leishmania*.

3-Cultura em meio acelular

O baço e fígado dos morcegos foram macerados, em condições estéreis, com solução salina com cloranfenicol (200mg/l) e inoculados em tubos com meio de cultura BAB (Blood Agar Base) acrescido de caldo BHI (Brain Heart Infusion) e incubados a 23°C por 45 dias, sendo observados ao microscópio (40X) semanalmente

4- Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para cada amostra foram realizadas duas PCR, a primeira utilizando o DNA extraído e empregando-se os oligonucleotídeos S4 (5'- GAT CCA GCT GCA GGT TCA CC -3') e S12 (5'- GGT TGA TTC CGT CAA CGG AC -3') que amplificam um fragmento de 520 pb. A segunda PCR (nested-PCR), utilizando como molde o produto da primeira, com um par de oligonucleotídeos S17 (5'- CCAAG CTGCC CAGTA GAAT -3') e S18 (5'- TCGGG CGGAT AAAAC ACC- 3'), sendo que o fragmento amplificado é de cerca de 490 bp.

Enteroparasitas

Os tubos digestórios dos morcegos foram retirados no Laboratório de Zoonoses e Doenças Transmitidas por Vetores (LabZoo/CCZ) e encaminhados para exames parasitológicos no IAL-Instituto Adolfo Lutz.

1-Pesquisa de helmintos

Os órgãos foram separados em três segmentos: esôfago e estômago, intestino delgado, e intestino grosso. Cada parte foi analisada em estereomicroscópio e os parasitas encontrados foram fixados em álcool 70%.

2- Coloração para *Cryptosporidium* e *Microsporidium*

Para a identificação de *Cryptosporidium* ssp, as lâminas foram coradas pela técnica da Auramina. Para a identificação de *Microsporidium* spp, as lâminas foram coradas pela técnica do Gram-cromotrope.

RESULTADOS

População Amostral

De 02 de abril a 31 de dezembro de 2007 foram recebidos ou capturados 340 morcegos (média de 37,8 animais/mês). Dos 340 morcegos, 160 pertenciam à Família Molossidae, morcegos de hábito alimentar insetívoro, 147 à Família Phyllostomidae, morcegos que se alimentam de pólen, néctar (nectarívoros) ou flores e frutas (frugívoros) e 33 à Família Vespertilionidae, morcegos que se alimentam de insetos, portanto a maioria da amostra foi constituída de morcegos insetívoros (56,8%). Os morcegos nectarívoros e frugívoros representaram 43,2%. Durante o período foram identificadas 19 espécies.

Considerando o sexo, 64,4% dos animais eram fêmeas e 11 delas estavam prenhes. Os machos representaram 35,6% da amostra. A maioria dos espécimes foi classificada como adulto (85,3%). Os indivíduos considerados jovens, subadultos ou filhotes representaram a 9,7%, 4,7% e 0,3%, respectivamente.

Tripanosomatídeos

1-Sorologia

Dos 340 morcegos, foi possível obter soro de 252 animais.

RIFI frente a *Trypanosoma cruzi*:

Em 12 morcegos, a amostra de soro foi insuficiente para realização do teste. Entre as 240 amostras processadas, 204 foram não reagentes (85%) e 36 reagentes (15%). Considerando o ponto de corte da RIFI utilizado para outras espécies animais (título igual ou maior a 40) a prevalência de anticorpos foi de 3,75% (9/240).

RIFI frente a *L. (L.) amazonensis*:

Em 23 morcegos, a amostra de soro foi insuficiente para realização do teste. Entre as 229 amostras processadas, 217 foram não reagentes (94,8%) e 12 reagentes (5,2%). Considerando o ponto de corte da RIFI utilizado para outras espécies animais (título igual ou maior a 40) a prevalência de anticorpos foi de 0,44% (1/229).

2-Exame direto

Foram realizados esfregaços de sangue circulante de 304 morcegos e de fragmentos macerados de baço e fígado de 335 morcegos. Todas as amostras analisadas foram negativas.

3-Cultura em meio acelular

Todas as amostras foram negativas, com exceção de 12 amostras nas quais ocorreram contaminações fúngicas.

4-Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Dentre os 340 baços e fígados analisados 11 foram positivas para tripanosomatídeos (3,23%), sendo que os produtos das PCR com S17 e S18 dessas amostras serão purificados para realização da reação de seqüência para determinar se o fragmento amplificado era originário de parasita do gênero *Leishmania* ou *Trypanosoma* e, se possível, determinar qual é a espécie.

Enteroparasitas

1-Pesquisa de helmintos

Entre os 340 tubos digestórios examinados, 54 apresentaram algum tipo de infecção por helmintos, correspondendo a 15,88% de positividade.

Analisando os dados de acordo com os locais de coleta dos morcegos, foi possível verificar que 202 (59,41%) foram coletados em locais usados como abrigos pelos morcegos, com 32 (15,84%) animais positivos; 89 (26,18%) foram capturados em decorrência de adentramentos em locais habitados por seres humanos, com 17 (19,10%) positivos e 49 (14,41%) em ato alimentar, com 5 (10,20%) animais positivos.

2- Cryptosporidium e Microsporidium

Nas pesquisas de enteroparasitas emergentes todas as amostras apresentaram resultados negativos.

DISCUSSÃO

A despeito da possibilidade de reação cruzada na sorologia, os resultados parciais de 15% de prevalência na RIFI frente ao *Trypanossoma cruzi* e 5,2% na RIFI frente a *L. (L.) amazonensis*, mesmo considerando o ponto de corte 1:40, utilizado para outras espécies, que mostraria uma prevalência diminuída para 3,75% e 0,44% respectivamente, são expressivos considerando a falta de informação existente sobre morcegos e as zoonoses parasitárias.

Os resultados da sorologia podem estar superestimados em função da possibilidade de ocorrência de reações cruzadas com outros patógenos, principalmente, em títulos menores a 40. Esse fato já tem sido relatado na literatura e é observado tanto para humanos quanto para as espécies animais já estudadas.

O comprometimento de 15,8% dos animais analisados na pesquisa de helmintos representando 47% das espécies de morcegos capturadas, indicam a necessidade de prosseguimento dos estudos até o esgotamento de todas as informações referentes à fauna parasitária desses animais, principalmente devido ao fato destes conviverem próximo à população humana, como foi observado ao analisar as características dos locais onde estes animais foram coletados.

Projeto financiado pela Fapesp-Fundação para Pesquisa do Estado de São Paulo 06/60575-3

¹ Centro de Controle de Zoonoses-COVISA-SMS-PMSP - Rua Santa Eulália, 86 – Santana – CEP 02031-020 – telefone: 55 (11) 2224.5571 / fax: 55 (11) 2251.2249 – Laboratório de Zoonoses e Doenças Transmitidas por Vetores - Setor de Quirópteros da Subgerência de Vigilância e Controle de Roedores e Animais Sinantrópicos
autor para correspondência: Elisa@prefeitura.sp.gov.br

² Seção de Enteroparasitoses - Serviço de Parasitologia do Instituto Adolfo Lutz.

³ Genomic- Genomic Engenharia Molecular – Rua Itapeva, 500 cj 5AB SP- SP, Brasil