

TRIPANOSSOMA DO SUBGÉNERO SCHIZOTRYPANUM EM MORCEGOS PORTUGUESES

P. ABRANCHES (1) e Fátima BACELAR (1)

RESUMO

Examinando 56 morcegos de diferentes áreas de Portugal, encontramos tripanossomas no sangue de 6 exemplares de 3 espécies: 2 *Myotis myotis*, 1 *Eptesicus serotinus* e 3 *Pipistrellus pipistrellus*. A infecção de *M. myotis* é aqui assinalada pela primeira vez em Portugal. Pela morfologia das formas sanguíneas situamos esses tripanossomas no subgénero *Schizotrypanum*, mas com os dados de que dispomos não nos atrevemos a identificar a sua espécie. Não vimos ninhos parasitários nos cortes de vísceras mas num dos morcegos encontramos esferomastigotas nos decalques de coração, alguns em divisão. Em meio NNN obtivemos hemoculturas de 3 morcegos; em 2 que pudemos acompanhar os tripomastigotas metacíclicos eram longos e finos. Todas as infecções foram encontradas na Primavera e no Verão.

INTRODUÇÃO

No subgénero *Schizotrypanum* estão agrupadas várias espécies de tripanossomas praticamente indistinguíveis uns dos outros na sua morfologia e ciclo de vida. Estes tripanossomas, cuja espécie-tipo é o *T. cruzi*, são encontrados parasitando vários mamíferos entre os quais 70 espécies de morcegos em todo o mundo¹².

Os quirópteros têm sido várias vezes estudados quanto a problemas de saúde pública humana e veterinária, contudo o conhecimento da biologia e taxonomia dos tripanossomas de morcegos não é muito grande.

A primeira referência à existência de tripanossomas no sangue de um morcego foi feita em Itália, por DIONISI⁹ em 1898, num *Nyctalus noctula*. Em 1904, BATTAGLIA⁴ descreveu o parasita num morcego da mesma espécie e o denominou *Trypanosoma vesperilionis*. Pouco depois, em 1905, BETTENCOURT & FRANÇA⁵ designaram como *Trypanosoma dionisii* ao hemoflagelado que observaram em *Pipistrellus pipistrellus*, entre outras espécies de morcegos de Portugal, mas posteriormente os

mesmos Autores⁶ o colocaram na sinonímia de *T. vesperilionis*. Assim, até 1921, todos os tripanossomas do subgénero *Schizotrypanum* encontrados em diferentes países da Europa e África foram considerados como *T. vesperilionis*¹². Nesse ano foram descobertas as formas viscerais de multiplicação destes tripanossomas. CHATTOM & COURRIER⁸ estudando *P. pipistrellus*, na Alsácia, encontraram um tripanossoma que se multiplicava sob a forma de epimastigota dentro de pseudoquistos, em vários órgãos. Em cultura, esse tripanossoma desenvolvia formas de tripomastigotas metacíclicos muito longas e finas, com a extremidade posterior em forma de bico e cinetoplasto subterminal. A esse parasita os Autores chamaram *Schizotrypanum pipistrelli*. FRANCHINI¹⁰, também em 1921, descobriu amastigotas no pulmão e fígado de vários *P. pipistrellus* e os interpretou como sendo formas de multiplicação dos tripanossomas por ele observados no sangue periférico. Os achados de CHATTOM & COURRIER foram confirmados por RODHAIN¹⁹ e RODHAIN & HENRY²⁰ e os tripa-

(1) Disciplina de Protozoologia. Instituto de Higiene e Medicina Tropical. Rua Junqueira, 96 — 1300 — Lisboa-Portugal

nossomas longos e finos das culturas foram encontrados por outros Autores^{2,11,16}. Porém, quanto a amastigotas, não voltaram a ser vistos até 1971, ano em que MOULINEAUX & BAFORT¹⁶ encontraram, em vários órgãos de *P. pipistrellus*, quistos contendo amastigotas. No ano seguinte BAKER & col.³ verificaram que o tripanossoma por eles isolado de *P. pipistrellus* se multiplicava sob a forma de amastigotas em cultura de tecidos e simultaneamente como epimastigotas e amastigotas em macrófagos provenientes de exudado peritoneal de murganho. Em cultura os parasitas apresentavam tripomastigotas longos e finos. NEWTON¹⁸ que estudou os tripanossomas isolados por BAKER & THOMPSON² de *P. pipistrellus* e *N. noctula*, demonstrou haver diferenças entre ambos, na densidade de flutuação do DNA. BAKER & col.³ chamaram *T. (Schizotrypanum) dionisii* à espécie isolada do *P. pipistrellus* adoptando o nome inicialmente dado por BETTENCOURT & FRANÇA⁵.

Quanto à classificação destes tripanossomas, HOARE¹² e MARINKELLE¹⁵ aceitam provisoriamente a existência de duas espécies: *T. (Schizotrypanum) vespertilionis* cujas formas de reprodução no mamífero hospedeiro são desconhecidas, e *T. (Schizotrypanum) pipistrelli* que se reproduz no estado de epimastigota. BAKER & col.³ por seu lado, admitem a possibilidade de existirem três espécies, *T. vespertilionis*, de várias espécies de quirópteros e por eles observado em *N. noctula*; e duas outras, *T. pipistrelli* e *T. dionisii*, de *P. pipistrellus*. Ambas as últimas produziram tripomastigotas longos e finos em cultura mas dividir-se-iam no hospedeiro vertebrado como epimastigotas a primeira e amastigotas a segunda. Quanto às formas de cultura *in vitro* HOARE¹² considera que estão ainda insuficientemente estudadas para servir de critério classificativo enquanto que MARINKELLE¹⁵ as acha idênticas às do *T. cruzi*. Este Autor¹⁵, apesar de admitir a existência de duas espécies de esquizotripanos de morcegos europeus defende que a designação de *T. cruzi*-like deveria ser adoptada até existirem dados concludentes sobre este problema.

Na continuação dos nossos estudos sobre os hematozoários dos morcegos de Portugal encontramos alguns quirópteros infectados por tripanossomas que isolámos em culturas e estudámos com a intenção de estabelecer sua

posição sistemática, conforme expomos nas linhas que se seguem.

MATERIAL E MÉTODOS

Até ao momento examinámos 68 morcegos provenientes de diversos locais do país. Os 12 primeiros foram objecto de publicação anterior, em que damos conta da presença de plasmódios e outros parasitas intraeritrocíticos em morcegos portugueses¹. No presente trabalho temos portanto 56 morcegos, numerados por ordem de captura, do n.º 13 ao 68. Destes quirópteros, 40 foram capturados em grutas calcárias, por meio de redes e camaroeiros, ou apanhados à mão quando hibernantes; 16 foram capturados no forro de edificações.

Todos os exemplares foram transportados vivos para o laboratório onde, um ou dois dias depois da captura, foram anestesiados com clorofórmio e o sangue extraído por meio de um corte na veia do cotovelo da membrana alar ou por punção cardíaca a céu aberto. Do sangue fizemos esfregaços e gotas espessas e observamos a fresco, entre lâmina e lamela, em contraste de fase. Quando esta pesquisa resultou positiva semeamos o sangue colhido por punção cardíaca em meio de NNN ao qual adicionávamos no próprio dia, soluto fisiológico contendo penicilina na proporção de 1.000 U por ml, conservando as culturas na estufa a 28°C.

Com os órgãos (coração, fígado, baço e pulmão) fizemos decalques; fragmentos destes órgãos, bem como do estômago e intestino, foram conservados em formol a 10% para posteriores cortes histológicos. Os esfregaços e decalques foram fixados com álcool metílico e, juntamente com as gotas espessas, corados pelo soluto de Giemsa a 5% em água destilada de pH 7,2 — 7,4. Os fragmentos dos órgãos dos morcegos em cujo sangue se encontraram tripanossomas foram incluídos em parafina e cortados para preparações histológicas coradas pela Hematoxilina-Eosina.

O desenvolvimento das estirpes em cultura foi estudado por meio de contagens em câmara de Neubauer, das formas móveis na fase líquida da cultura, com a ampliação de 320 x. As diferentes formas do ciclo foram estudadas em esfregaços da cultura, corados pelo mesmo método usado no exame do sangue. Para obter

os esfregaços, retiramos 0,5 ml da cultura, centrifugando-a duas vezes a 3.000 r.p.m. com 1,5 ml de solução de Locke²³. Devido à pequena quantidade de líquido de cultura existente nos tubos de ensaio as observações foram poucas, quase sempre de 2 em 2 dias, ou em dias seguidos, até ao 15.º dia no máximo.

RESULTADOS

Os 56 morcegos capturados estão distribuídos pelas 11 espécies citadas no Quadro I, juntamente com o resultado do exame do seu sangue para pesquisa de tripanossomas.

QUADRO I

Presença de tripanossomas no sangue de morcegos portugueses, durante o presente inquérito

Espécie de morcego	N.º	
	Examinados	Positivos N.º %
<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	6	— —
<i>Rhinolophus euryale</i>	5	— —
<i>Rhinolophus mehelyi</i>	3	— —
<i>Rhinolophus hipposiderus</i>	6	— —
<i>Myotis blythi</i>	5	— —
<i>Myotis myotis</i>	7	2 28,6
<i>Myotis nathalinae</i>	1	— —
<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	12	3 25,0
<i>Miniopterus schreibersii</i>	7	— —
<i>Eptesicus serotinus</i>	3	1 33,3
<i>Plecotus austriacus</i>	1	— —
TOTAL	56	6 10,7

A percentagem de positividade foi de 10,7%. Todos os morcegos parasitados foram apanhados na Primavera e Verão (no ano de

1977 capturamos 29 do total de 46 morcegos de Abril a Julho, no ano seguinte, na mesma época, 7 de 10).

A parasitemia é, em geral, pouco intensa, mas num dos nossos quirópteros (n.º 34) encontramos uma infecção relativamente alta (9 parasitas, em média, por cm² de esfregaço sanguíneo).

Os tripomastigotas vistos a fresco exibiam movimentos de torção muito rápidos, mas pouco se deslocavam no campo microscópico. Nos esfregaços corados os parasitas mostravam as características do subgênero *Schizotrypanum* (HOARE, 1972).

Em todos os morcegos infectados se observaram tripomastigotas nos decalques dos órgãos profundos (coração, fígado, baço e pulmões), principalmente de coração, devido ao sangue que sempre acompanha estas preparações. Num dos animais (n.º 32), os decalques de coração, além dos tripomastigotas sanguícolas apresentavam esferomastigotas: formas ovaladas ou arredondadas, com cerca de 6 por 4 µ, cinetoplasto em barra ou redondo, intensamente corado e o núcleo em geral ovalado, central ou no polo oposto do cinetoplasto; o flagelo livre é visível num grande número delas, mas em nenhuma se observa a membrana ondulante. Algumas destas formas apresentavam-se em divisão (Figs. 1 e 2). Os esferomastigotas não aparecem dentro de qualquer estrutura quística mas também não estão dispersos nas preparações como acontece com os tripomastigotas, antes aparecem agrupados em faixa nos decalques, como se procedessem todos do mesmo sítio. Nos cortes histológicos dos órgãos dos

QUADRO II

Dados referentes aos morcegos portugueses encontrados com tripanossomas no sangue durante o presente inquérito

Morcego n.º	Espécie	Data da captura	Local da captura	Formas sanguí- colas	Formas viscerais (decalques)	Hemo- cul- tura
32	<i>M. myotis</i>	12/4/77	Marvão (gruta)	Tripomas- tigotas	Esferomastigo- tas (coração)	...
34	<i>E. serotinus</i>	24/4/77	Gerês (igreja)	"	—	+
43	<i>P. pipistrellus</i>	23/4/77	Moura (telhado)	"	—	—
49	"	9/7/77	"	"	—	—
50	"	"	"	"	—	+
68	<i>M. myotis</i>	18/6/78	Alcanena (gruta)	"	—	+

morcegos não encontramos qualquer parasita.

Do morcego n.º 32 não tentamos a hemocultura. Dos 5 parasitados restantes conseguimos hemoculturas positivas de 3 (n.º 34, 50 e 68). Alguns dados referentes aos morcegos positivos encontram-se resumidos no Quadro II.

As culturas têm-se conservado por passagens cada 15 dias. Conseguimos manter vivos os tripanossomas em alguns tubos por cerca de 90 dias, pela adição de algumas gotas de soro fisiológico com penicilina, para evitar a secagem.

As estirpes n.º 34 e 50, cujo desenvolvimento em culturas pudemos acompanhar, evoluíram de modo semelhante: os tripomastigotas metacíclicos longos e finos (Figs. 3 e 4) começaram a evidenciar-se por volta do 4.º dia, aumentando progressivamente de número, até o 9.º ou 10.º dias, quando as culturas se estabilizam e os tripomastigotas e epimastigotas atingem proporções equivalentes. Observamos também esferomastigotas, cada vez mais numerosos com o envelhecimento das culturas. Nunca vimos tripomastigotas em divisão, mas somente epimastigotas.

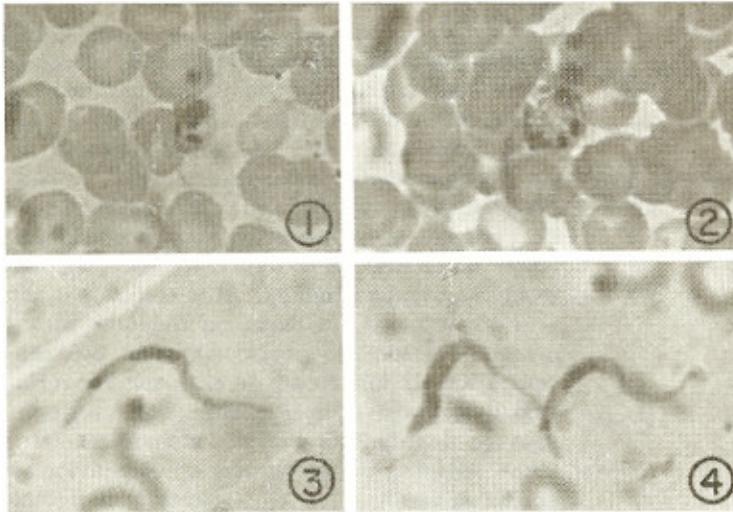


Fig. 1 — Esferomastigota em decalque de coração do morcego n.º 32. Fig. 2 — Esferomastigota em divisão, decalque de coração do morcego n.º 32. Fig. 3 — Tripomastigota metacíclico em hemocultura do morcego n.º 50. Fig. 4 — Epimastigota e tripomastigota metacíclico em hemocultura do morcego n.º 34. Microfotografias de Alexandre Paula.

DISCUSSÃO

Os resultados por nós constatados permitem-nos salientar os seguintes factos: 1) Encontramos tripanossomas em morcegos portugueses mais de setenta anos decorridos dos achados de BETTENCOURT & FRANÇA⁵. Duas das espécies parasitadas coincidem com as descobertas por esses Autores, *Pipistrellus pipistrellus* e *Eptesicus serotinus*, mas constatamos também a infecção em *Myotis myotis*, que está sendo aqui pela primeira vez assinalada em Portugal. Cremos, também, ser esta a segunda vez que se descreve um esquizotripano num *M. myotis*, já que o morcego apanhado por SERGENT & SERGENT²² deve ser considerado como *Myotis blythi*, a espécie do género que existe no Norte de África¹³, a primeira referência à infecção de *M. myotis* deve-se a NAJERA, em 1945, na Espanha¹⁷. 2) Pela morfologia das formas sanguícolas situamos os tripanossomas no subgênero *Schizotrypanum*. Os

dados que obtivemos não foram suficientes para um diagnóstico específico, mas o aspecto dos tripomastigotas metacíclicos das culturas difere do atribuído ao *T. vespertilionis*, coincidindo com o de *T. pipistrelli* e *T. dionisii*, segundo a concepção de BAKER & col.³ 3) Os esferomastigotas encontrados nos decalques de coração do morcego n.º 32 mostram imagens de divisão, diferentemente do que observaram MOLINEAUX & BAFORT¹⁶. Esta diferença pode ser explicada se se der razão às críticas formuladas por LUMSDEN¹⁴ àquele termo criado por BRACK em 1968⁷. LUMSDEN admite que o esferomastigota é destituído de significado sendo apenas um aspecto morfológico tomado transitoriamente por uma das outras formas do ciclo. BAKER & col.³ por seu lado fazem notar que o esferomastigota pode ser um estágio de curta duração. RODRIGUEZ & MARINKELLE²¹ citam três mecanismos de evolução intracelular de amastigota a tripomastigota no *T. cruzi*: a) por alongamento formando

epimastigotas, b) por alongamento sem formação de epimastigotas, e c) "desenrolando-se" para formar directamente tripomastigotas. Quando se faz o decalque das vísceras pode-se obter, de células rompidas, as formas que nelas estavam se desenvolvendo, em várias fases (a-, esfero-, epi- e tripo-mastigotas). Os esferomastigotas por nós observados corresponderiam a uma fase do terceiro mecanismo de evolução atrás citado. 4) É de realçar o encontro de morcegos positivos exclusivamente na Primavera e no Verão, em coincidência com os dados de RODHAIN & HENRY²⁰, na Bélgica. Nas zonas temperadas, durante o Inverno os morcegos passam por períodos de letargia em que o seu metabolismo decresce, não sendo impossível que este facto tenha influência no parasitismo, além da biologia dos possíveis vectores, aliás insuficientemente conhecidos.

SUMMARY

Trypanosomes of the subgenus Schizotrypanum in portuguese bats

Examining 56 bats from different areas in Portugal, we found trypanosomes in the blood of 6 specimens belonging to three species: 2 *Myotis myotis*, 1 *Eptesicus serotinus* and 3 *Pipistrellus pipistrellus*. The infection in *M. myotis* is here recorded for the first time in Portugal. By the morphology of the blood forms we placed these trypanosomes in the subgenus *Schizotrypanum*, but our data did not encourage us for species identification.

We found no pseudocysts in sections of the viscera, but in heart smears from one of the bats there were sphaeromastigotes, some in division. Haemocultures in NNN were obtained from three bats; in two, which we were able to follow, long and slender metacyclic trypomastigotes developed.

All infections were detected during Spring and Summer.

AGRADECIMENTOS

Os Autores agradecem ao Professor LEONIDAS M. DEANE, da Universidade de Carabobo, Venezuela, pela sua ajuda na elaboração deste trabalho e a J. PALMEIRIM, da Faculdade de Ciências de Lisboa, pela identificação das espécies de morcegos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ABRANCHES, P. & MAGALHÃES, C. — Achado de hemocitozoários em morcegos de Portugal. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 19: 361-365, 1977.
2. BAKER, J. R. & THOMPSON, G. B. — Two species of *Trypanosoma* from British Chiroptera (Bats). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 65: 427, 1971.
3. BAKER, J. R.; GREEN, S. M.; CHALONER, L. A. & GABORACK, M. — *Trypanosoma (Schizotrypanum) dionisii* of *Pipistrellus pipistrellus* (Chiroptera): intra and extracellular development in vitro. *Parasitology* 65: 251-263, 1972.
4. BATTAGLIA, M. — Alcune ricerche sopra due tripanosomi (*T. vespertilionis* e *T. lewisi*). *Ann. Med. Navale (Rome)* 10: 517, 1904. In HOARE (12).
5. BETTENCOURT, A. & FRANÇA, C. — Sur un trypanosome de la chauve-souris. *Compt. Rend. Séances Soc. Biol.* 59: 305-307, 1905.
6. BETTENCOURT, A. & FRANÇA, C. — Sur un trypanosome de la chauve-souris. *Arch. R. Inst. Bact. Câmara Pestana* 1: 187-194, 1906.
7. BRACK, C. — Elektronenmikroskopische Untersuchungen zum Lebenszyklus von *Trypanosoma cruzi*. Unter besonderer Berücksichtigung der Entwicklungsformen im Ueberträger *Rhodnius prolixus*. *Acta Trop.* 25: 289-356, 1968.
8. CHATTOM, E. & COURRIER, R. — Un *Schizotrypanum* chez les chauve-souris (*Vesperugo pipistrellus*) en Basse — Alsace. *Schizotrypanose et goitre endémique. Compt. Rend. Soc. Biol.* 84: 943-946, 1921.
9. DIONISI, A. — I parassiti endoglobulari dei pipistrelli. *Atti A. Accad. Lincei (ser. V)* 7(2): 254-258, 1898.
10. FRANCHINI, G. — Trypanosome de la chauve-souris en Italie. Formes viscerales et stades de developpement chez un acarien gamaside, le *Leignathus laverani* n. sp. *Bull. Soc. Path. Exot.* 14: 542-546, 1921.
11. HOARE, C. A. — The classification of mammalian trypanosomes. *Ergebnisse der Mikrobiologie immunitätsforschung und experimentellen therapie* 39: 43-57, 1966.
12. HOARE, C. A. — The trypanosomes of mammals (A Zoological Monograph). Oxford, Blackwell Scientific Publ., 1972, pp. 749.
13. LANZA, B. — III — Chiroptera in Fauna d'Italia. Bologna, Vol. IV, Ed. Calderini, 1959, pp. 187-475.
14. LUMSDEN, W. H. R. — Leishmaniasis and Trypanosomiasis: the causative organism compared and contrasted, in *Trypanosomiasis and Leishmaniasis with special reference to Chagas disease. Ciba Foundation Symposium Associated Scientific Publ.*, 1974.
15. MARINKELLE, C. J. — Biology of trypanosomes of bats. In *Biology of the Kinetoplastida*, Vol. I, Ed. W.

- H. R. LUMSDEN & D. A. EVANS. New York, Academic Press, 1976, pp. 175-216.
16. MOLINEAUX, D. H. & BAFORT, J. M. — Observations on the trypanosome of *Pipistrellus pipistrellus* in Britain, *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *vespertilionis*. *Ann. Soc. Belge Med. Trop.* 51: 335-348, 1971.
17. NAJERA-ANGULO, L. — Sobre el tripanosoma de los lirones (*Trypanosoma blanchardi*) y de los morcielagos (*Schizotrypanum vespertilionis*) hallados en España y su interés biológico. *Rev. Ibérica de Parasitología*, Tomo extraordinario, Libro de homenaje ao Prof. López-Neyra, 1945, pp. 216-245.
18. NEWTON, B. A. — DNA of stercorarian trypanosomes. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 65: 425-426, 1971.
19. RODHAIN, J. — Sur la spécificité morphologique et biologique de *Trypanosoma pipistrelli* E. CHATTON et R. COURRIER. *Acta Biol. Belge* I: 55-58, 1942.
20. RODHAIN, J. & HENRY, E. — Sur la existence de *Trypanosoma vespertilionis* BATTAGLIA et *T. pipistrelli* E. CHATTON et COURRIER. *Acta Biol. Belge* 2: 261-264, 1942.
21. RODRIGUEZ, G. & MARINKELLE, C. J. — *Trypanosoma cruzi*. Development in tissue culture. *Expl. Parasit.* 27: 78-87, 1970.
22. SERGENT, ED. & SERGENT, ET. — Sur de Trypanosomes des chauve-souris. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 57: 53-55, 1905.
23. SORIA, C. A. & DUSANIC, D. G. — Comparative studies of *Trypanosoma vespertilionis* BATTAGLIA and *Trypanosoma dionisii* BETTENCOURT & FRANÇA. *J. Protozool.* 22: 509-513, 1975.
24. WENYON, C. M. — *Protozoology. A Manual for Medical Men, Veterinarians and Zoologists.* vol. I e II. London, Baillière, Tindall and Cox, 1926.

Recebido para publicação em 1/3/1979.