

Envolvimento do *Desmodus rotundus* no ciclo epidemiológico das leishmanioses na Bahia, Brasil

Involvement investigation of the brazilian vampire-bat "Desmodus rotundus" in leishmaniasis epidemiological cycle

CUNHA, Rogério de Magalhães¹; CARNEIRO, Aroldo José Borges¹; GONÇALVES, Rafaela de Sousa¹; BECERRA, Dinah Ribeiro Dantas¹; STÖCKER, Andreas²; BARROUIN-MELO, Stella Maria¹; FRANKE, Carlos Roberto^{1*}

¹Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Laboratório de Infectologia Veterinária, Salvador, Bahia, Brasil.

²Universidade Federal da Bahia, Hospital Professor Edgar Santos, Laboratório de Pesquisa em Infectologia, Salvador, Bahia, Brasil.

*Endereço para correspondência: franke@ufba.br

RESUMO

As leishmanioses são protozoonoses causadas por diferentes espécies do gênero *Leishmania*. Pouco se sabe sobre o papel de algumas espécies de mamíferos na epidemiologia dessas doenças. Alguns relatos apontam quirópteros como potenciais hospedeiros. Este estudo visa avaliar a presença de infecção por *Leishmania* spp. em *Desmodus rotundus*. Métodos moleculares capazes de identificar fragmentos de DNA de *Leishmania* foram empregados para as análises dos 100 quirópteros envolvidos neste estudo. Em 16% das amostras foram detectados presença de DNA de *Leishmania* sp. com a PCR (*Polymerase Chain Reaction*) convencional. Contudo, tal resultado não se repetiu quando avaliadas pela PCR em Tempo Real, aplicada com finalidade de distinção das espécies de *Leishmania*, o que sugeriu a ocorrência de contaminação das amostras na análise prévia. Apesar deste resultado, aspectos comportamentais e da biologia do *D. rotundus* sugerem que eles, assim como outras espécies de quirópteros, sejam potenciais hospedeiros destes protozoários.

Palavras-chave: Leishmania, morcegos, PCR, quirópteros, zoonose

SUMMARY

Leishmaniasis are protozoonosis caused by different *Leishmania* species. The role of some wild mammal's species in the epidemiology of these diseases is not well known. A few studies point to chiropteran as possible hosts. The aim of this study was to evaluate the presence of *Leishmania* spp. infection in *Desmodus rotundus* (vampire bat). Molecular methods capable of amplifying the DNA of *Leishmania* were used to evaluate one hundred chiropters from this species. In 16% of the samples, the DNA of *Leishmania* sp. was detected through PCR (*Polymerase Chain Reaction*), in the trial stage. However, the result was not repeated when evaluated through Real Time PCR, which suggested the occurrence of prior sample contamination. In spite of this result, some behavioral and biological aspects of *D. rotundus* suggest that they, in a similar vein to other bat species, are potential hosts for these protozoans.

Keywords: bat, Leishmania, PCR, wild animals, zoonosis

INTRODUÇÃO

As leishmanioses estão listadas pela Organização Mundial de Saúde dentre as principais zoonoses causadas por protozoários. O conhecimento sobre a participação das espécies de mamíferos no ciclo de transmissão das *Leishmania* sp. é fundamental para o aperfeiçoamento das medidas de controle dessas doenças (WHO, 2010), uma vez que as medidas preconizadas, especialmente para a leishmaniose visceral, não apresentam resultados satisfatórios (DANTAS-TORRES & BRANDÃO-FILHO, 2006; QUINNELL & COURTENAY, 2009). Espécies de mamíferos ainda pouco estudadas devam estar envolvidas no ciclo de transmissão destes parasitos (QUINNELL & COURTENAY, 2009). Poucos estudos mencionam o envolvimento de quirópteros com espécies do gênero *Leishmania* (ROTUREAU et al., 2006; DE LIMA et al., 2008; SAVANI et al., 2010; SHAPIRO et al., 2013), apesar da sua importância em outras doenças (WIBBELT et al., 2010), pertencerem a um dos grupos de mamíferos de maior abundância e diversidade de espécies e estarem presentes em todos os ecossistemas brasileiros, inclusive em áreas antropizadas (DOS REIS et al., 2007). Os locais de abrigo dessas espécies (cavernas, grutas, boeiros e sótãos), geralmente, são os mesmos frequentados por flebotômíneos vetores (SHERLOCK, 1996; DE OLIVEIRA et al., 2009). O relato de Lampo et al. (2000) sobre o repasto de *Lutzomyia longipalpis* em morcegos realizado experimentalmente reforça a suspeita da existência de um ciclo de transmissão envolvendo esses mamíferos.

O *Desmodus rotundus*, popularmente conhecido como morcego vampiro, é uma espécie hematófaga abundante nas

Américas, com registros de ocorrência desde o norte do México ao norte da Argentina (MARTINS & BATALHA, 2007). É uma das principais espécies de interesse médico por seu papel na transmissão do vírus rábico para seres humanos e animais (DA ROSA et al., 2006; CARNEIRO et al., 2010). Nas zonas rurais, costuma formar colônias numerosas, pois sua principal fonte de alimentação são os animais de produção (VILAR et al., 2004).

Considerando que não há registro sobre o envolvimento do *D. rotundus* na epidemiologia das leishmanioses, apesar de fatores comportamentais e biológicos sugerirem essa possibilidade, o presente estudo investigou a ocorrência de infecção por *Leishmania* spp. em quirópteros dessa espécie, capturados em diferentes municípios do estado da Bahia, Brasil, todos considerados endêmicos para essas zoonoses, segundo dados da Secretaria Estadual da Saúde do Estado da Bahia (SESAB/SUVISA/DIS/SINAN).

MATERIAL E MÉTODOS

Ao longo das ações de controle populacional de morcegos da espécie *Desmodus rotundus*, conforme preconizado pelo Programa de Controle da Raiva dos Herbívoros (BRASIL, 2009), realizadas entre os meses de outubro e dezembro de 2012 pela Agência de Defesa Agropecuária do Estado da Bahia, foram capturados 126 morcegos da espécie *Desmodus rotundus* em 16 abrigos: grutas, boeiros e galerias de águas pluviais construídas sob as rodovias de 12 municípios do estado da Bahia (Figura 1). Os animais doados para o presente estudo foram eutanasiados no mesmo dia da captura, identificados pela chave

sistemática de Vizotto & Taddei (1973) e acondicionados à -80°C até realização das necropsias e coleta de amostras de fígado e baço.

Cerca de 25mg de fígado foram macerados e o DNA extraído com a utilização do Purelink® Genomic DNA Mini Kit, conforme orientações do fabricante. Aproximadamente 75 μL de DNA eluído foram obtidos de cada amostra. A qualidade e a concentração dos produtos foram avaliadas por corrida em eletroforese em gel de

agarose (0,8%), utilizando o marcador de peso molecular (1 Kb Plus DNA Ladder®, Invitrogen) como parâmetro, e por espectrofotometria (Thermo Scientific NanoDrop® 1000), respectivamente. Amostras com degradação aparente percebida no gel, com concentração de DNA inferior a 50 $\text{ng}/\mu\text{L}$ e ou com taxas de pureza fora do intervalo: $1,65 < 260/280 > 1,9$ e $1,75 < 260/230 > 2,3$, conforme recomendação do manual do espectrofotômetro, foram excluídas.

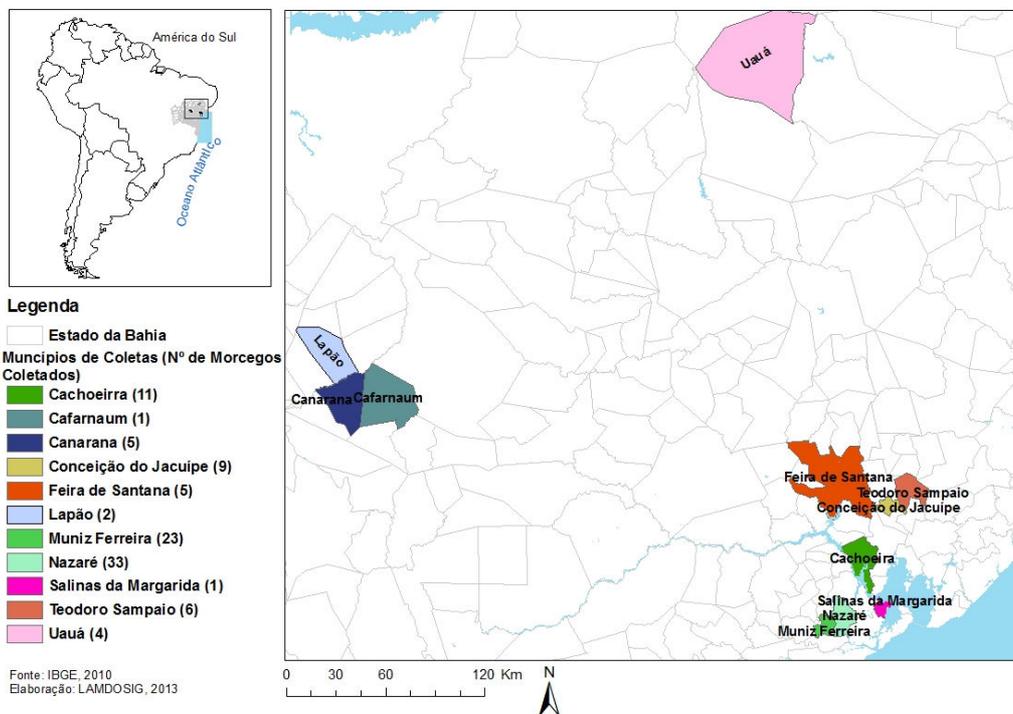


Figura 1. Municípios nos quais foram realizadas as capturas e o número de espécimes de *Desmodus rotundus* capturados por município. Estado da Bahia, Brasil

A cada procedimento de extração, um microtubo de 1,5 mL, contendo 75 μL de água ultrapura para PCR, era deixado aberto sobre a bancada, como forma de verificar a possibilidade de contaminação dos produtos extraídos por partículas de DNA de *Leishmania* provenientes do ambiente e materiais utilizados. Esses

controles, assim como, todos os reagentes do kit de extração foram avaliados com a mesma técnica da PCR empregada na análise das amostras. Para avaliação da presença de DNA de *Leishmania* spp. nas amostras de fígado foi empregada a PCR, com os *primers* descritos por Degraive et al. (1994):

5'-GGGGAGGGGCGTTCTGCGAA-3' (150),
5'-CGCCCCTATTTTACACCAACCCC-3' (152) e
5'-GCCCACTATATTACACCAACCCC-3' (152'),

capazes de amplificar uma banda de 120pb. O protocolo estabelecido (quadro 1) foi capaz de amplificar três cepas de referência de *L. chagasi* (IOC/L579 – MHOM/BR/1974/PP75,1ng), *L. amazonensis* (IOC/575 – IFLA/BR/1967/PH8,1ng) e *L. braziliensis* (IOC/L566 – MHOM/BR/1975/M2903,1 ng).

Foram utilizados para as análises das amostras um marcador molecular de 100pb, um controle positivo com 1ng de DNA de *L. chagasi* (cepa - IOC/L579 – MHOM/BR/1974/PP75) e um controle negativo (água ultrapura para PCR). Após corrida de eletroforese (100 V, 400 mA, ~55 minutos), os géis de agarose a 2% corados com brometo de etídio, foram revelados em fotodocumentador (BioDocAnalyse® Biometra) e analisados quanto a presença de bandas de 120pb.

Para a obtenção dos produtos (*amplicons*) a serem enviados para o sequenciamento, optou-se pela extração de DNA de amostras de baço dos morcegos positivos na PCR (150/152/152). As extrações foram feitas com o PureLink® DNA Mini Kit (Invitrogen), de acordo com o protocolo do fabricante, com as seguintes alterações: na fase de lise celular, em criotubo com capacidade de 2mL foram adicionadas microesferas metálicas, 20µL de proteinase K, 180µL de tampão de digestão, juntamente com um fragmento de aproximadamente 25mg de baço de cada indivíduo. Após incubação em banho-seco à 55°C, por 30', o material foi macerado por agitação em vórtex vertical durante 2', novamente levado à 55°C/1', seguido de nova agitação por 1'. As alterações na fase de purificação foram: duas lavagens com o tampão de lavagem II,

seguidas de centrifugações, sendo a primeira a 10.000g/30'' e a segunda a 16.000g/1' com a inserção de um novo tubo coletor no tubo de filtração, para a remoção total do etanol. O eluato foi obtido pela adição de 55µL do tampão de eluição, previamente aquecido à 72°C. A quantificação do DNA nos produtos foi feita com o emprego do fluorômetro Qubit/Invitrogen.

Para a obtenção do *amplicon* foi desenvolvido um protocolo de PCR em Tempo Real (Figura 2). O par de *primers* utilizado foi o HSP 70 - 234 (5'- GGA CGA GAT CGA GCG CAT GGT -3' e 5'- ACC ATG CGC TCG ATC TCG TCC -3') (DA GRAÇA et al., 2010), capaz de amplificar bandas de aproximadamente 234 pb. A capacidade de detecção deste protocolo foi avaliada pela análise de sete diluições (10x) seriadas da cepa de referência *L. chagasi* (IOC/L579 – MHOM/BR/1974/PP75, 1 ng).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após triagem para averiguação da qualidade restaram para a execução do estudo 100 amostras de DNA de fígado de morcegos de *D. rotundus*, cuja análise realizada pela PCR (150/152/152) demonstrou que 16% apresentaram resultado positivo, com a presença de bandas de aproximadamente 120pb, em sua maioria de fraca intensidade.

A baixa intensidade das bandas observada pode ter sido decorrente dos sucessivos e inevitáveis congelamentos e descongelamentos dos morcegos, ocorridos antes do processo de extração do DNA. A posteriori, verificou-se que o

DNA extraído do baço dos morcegos possuía melhor qualidade do que os extraídos do fígado. Tal fato pode ser explicado pela maior quantidade de enzimas digestivas presente neste órgão. Para realização do sequenciamento e identificação das espécies de *Leishmania*, os produtos da amplificação foram obtidos pela utilização das amostras de DNA de baço dos quirópteros positivos na PCR (150/152/152'), por meio da

técnica PCR em Tempo Real (HSP 70 – 234), que demonstrou ser capaz de detectar DNA de *Leishmania* em duas das dez diluições do controle positivo utilizado. No entanto, não foi constatada a presença de DNA do gênero *Leishmania* em nenhuma das amostras analisadas. Resultado este que não permite afirmar o envolvimento da espécie *D. rotundus* na epidemiologia das leishmanioses no estado da Bahia.

Técnica	Reagentes/concentrações		Parâmetros da termociclagem	
			Temperatura	Tempo
PCR (150/152/152') Volume final = 50 µL	Água ultrapura para PCR Tampão (Tris-HCl) MgCl ₂ dNTP Primers (cada) Platinum® Taq DNA Polimerase DNA	-	94 °C	2'
			94 °C	1'
			65 °C	30"
			72 °C	30"
			72 °C	5'
			35 ciclos	
PCR em Tempo Real (HSP 70 – 234) Volume final = 25 µL	Power SYBR® Green PCR Master Mix BSA Primer (cada) DNA	1 x 0,04 mg/mL 0,3 µM 5 µL	95 °C	10'
			94 °C	20"
			61 °C	20"
			62 °C	35"
			45 ciclos	

Figura 2. Protocolos da PCR (150/152) e PCR em Tempo Real (HSP 70 – 234): reagentes utilizados, concentrações e parâmetros da termociclagem

Considerando que na execução da PCR em Tempo Real foram utilizadas amostras de baço dos morcegos positivos na PCR, a diferença mais relevante entre a execução dos dois testes é o fato da PCR em Tempo Real ter sido realizada em um laboratório projetado especialmente para pesquisas com biologia molecular e mais bem equipado para esta finalidade. Como as etapas de pré e pós PCR foram executadas em espaços exclusivos, excluiu-se o risco de contaminação, o que permitiu revelar que os resultados anteriores se tratavam de falso-positivos. O estudo realizado por Rotureau et al.

(2006) na Guiana Francesa também não identificou a presença de *Leishmania* spp. no único exemplar de *D. rotundus*, bem como, nas outras espécies de quiróptero analisadas. No entanto, estudos também realizados na América Latina registram a ocorrência de outras espécies de quirópteros infectadas por *L. chagasi* (DE LIMA et al., 2008), *L. chagasi* e *L. amazonensis* (SAVANI et al., 2010) e *Leishmania braziliensis* (SHAPIRO et al., 2013), apesar de nenhuma delas ser *D. rotundus*.

O número de espécimes avaliados no presente estudo foi pequeno em relação

ao tamanho populacional destes animais no Brasil (DOS REIS et al., 2007). E, ao considerar que o número de casos humanos das leishmanioses pode variar em decorrência de sazonalidades (FRANKE et al., 2002; VIANA et al., 2011) e de surtos episódicos (FOLLADOR et al. 1999), verifica-se a a necessidade de se ter cautela ao analisar o resultado obtido neste estudo. Não é apropriado afirmar que o *D. rotundus* não participe do ciclo de transmissão das espécies endêmicas de *Leishmania* nos municípios estudados.

Tendo em vista os relatos de infecção por *Leishmania* spp. em outras espécies de quirópteros e observando também que o *D. rotundus* ocorre em áreas endêmicas das leishmanioses, alimenta-se tanto em humanos quanto em animais domésticos (potencialmente infectados) e frequenta abrigos semelhantes aos descritos para flebotomíneos vetores, é justificável a realização de novos estudos a fim de se investigar o possível envolvimento dessa espécie na epidemiologia dessas zoonoses.

AGRADECIMENTO

A CAPES pela bolsa de mestrado, à Agência de Defesa Agropecuária da Bahia, por ceder os animais do estudo, ao Laboratório de Virologia do Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN/Bahia), por cederem espaço e equipamentos para a realização das necrópsias e ao Laboratório de Pesquisa em Infectologia (LAPI/HUPES) pela confirmação dos resultados. O presente estudo foi financiado pela FAPESB (PRONEM 498/2011) e contou com as aprovações do ICMBIO (licença nº 15304-1) e do Comitê de Ética em Experimentação e Uso de Animais da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da UFBA (nº 12/2013 - CEUA/EMEVZ/UFBA).

REFERÊNCIAS

- BRASIL. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Controle da raiva dos herbívoros: manual técnico.** Brasília, 2009.
- CARNEIRO, A.J.B.; FRANKE, C.R.; STOCKER, A.; DOS SANTOS, F.; ÚNGAR-DE-SA, J.E.; MORAES-SILVA, E.; ALVES, J.N.M.; BRÜNINK, S.; CORMAN, V.M.; DROSTEN, C.; DREXLER, J.F. Rabies virus RNA in naturally infected vampire bats, northeastern Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.16, n.12, p.2004-2006, 2010.
- DA GRAÇA, G.C.; VOLPINI, A.C.; ROMERO, G.A.S.; DE OLIVEIRA-NETO, M.P.; DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.48, n.3, p.151-156, 2006.
- DA ROSA, E.S.T.; KOTAIT, I.; BARBOSA, T.F.S.; CARRIERI, M.L.; BRANDÃO, P.E.; PINHEIRO, A.S.; BEGOT, A.L.; WADA, M.Y.; DE OLIVEIRA, R.C.; GRISARD, E.C.; FERREIRA, M.; LIMA, R.J.da.S.; MONTEBELLO, L.; MEDEIROS, D.B.A.; SOUSA, R.C.M.; BENSABATH, G.; CARMO, E.H.; VASCONCELOS, P.F.C. Bat-transmitted human rabies outbreaks, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases**, v.12, n.8, p.1197-1202, 2006.
- DEGRAVE, W.; FERNANDES, O.; CAMPBELL, D.; BOZZA, M.; LOPES, S. Use of molecular probes and PCR for detection and typing *Leishmania* – a mini-review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.89, n.3, p.463-469, 1994.

- DE LIMA, H.; RODRÍGUEZ, N.; BARRIOS, M. A.; AVILA, A.; CAÑIZALES, I.; GUTIÉRREZ, S. Isolation and molecular identification of *Leishmania chagasi* from a bat (*Carollia perspicillata*) in northeastern Venezuela. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.103, n.4, p.412-414, 2008.
- DE OLIVEIRA, P.R.; SILVA, D.A.R.; ROCHA, J.H.; DE MELO, S.M.A.; BOMBONATO, N.G.; CARNEIRO E SILVA, F.O. Levantamento, cadastramento e estimativa populacional das habitações de morcegos hematófagos, antes e após atividades de controle, no município de Araguari, Mg. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v.76, n.4, p.553-560, 2009.
- DOS REIS, N.R.; PERACCHI, A.L.; PEDRO, W.A.; DE LIMA, I.P. **Morcegos do Brasil**. Londrina, SP: UNESP, 2007.
- FRANKE, C.R.; ZILLER, M.; STAUBACH, C.; LATIF, M. **Impact of the El Niño/Southern Oscillation on visceral leishmaniasis, Brazil**. **Emerging Infectious Diseases**, v.8, n.9, p.914-917, 2002.
- FOLLADOR, I.; ARAUJO, C.; CARDOSO, M.A.; TAVARES-NETO, J.; BARRAL, A.; MIRANDA, J.C.; BITTENCOURT, A.; CARVALHO, E.M. Surto de leishmaniose tegumentar americana em Canoas, Santo Amaro, Bahia, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.32, n.5, p.497-503, 1999.
- LAMPO, M.; FELICIANGELI, M.D.; MÁRQUEZ, L.M.; BASTIDAS, C.; LAU, P. A possible role of bats as a blood source for the *Leishmania* vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.62, n.6, p.718-719, 2000.
- MARTINS, F. Q.; BATALHA, M. A. Mitochondrial DNA phylogeography reveals marked population structure in the common vampire bat, *Desmodus rotundus* (Phyllostomidae). **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v.45, n.4, p.372-378, 2007.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Control of the leishmaniasis**. Geneva, 2010. p.1-186. (WHO technical report series, v.949).
- QUINNELL, R.J.; COURTENAY, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasitology**, v.136, p.1915-1934, 2009.
- ROTUREAU, B.; CATZEFLIS, F.; CARME, B. Short report: Absence of *Leishmania* in Guianan bats. **American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene**, v.74, n.2, p.318-321, 2006.
- SAVANI, E.S.M.M.; DE ALMEIDA, M.F.; CAMARGO, M.C.G.deO.; D'AURIA, S.R.N.; SILVA, M.M.S.; DE OLIVEIRA, M.L.; SACRAMENTO, D. Detection of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in Brazilian bats. **Veterinary Parasitology**, v.168, p.5-10, 2010.
- SHAPIRO, J.T.; LIMA-JUNIOR, M.S.deC.; DORVALC, M.E.C.; FRANC, A.deO.; MATOSE, M.deF.C.; BORDIGNON, M.O. First record of *Leishmania braziliensis* presence detected in bats, Mato Grosso do Sul, southwest Brazil. **Acta Tropica**, v.128, n.1, p.171-174, 2013.
- SHERLOCK, I.A. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.91, n.6, p.671-683, 1996.

VIANA, G.M.deC.; NASCIMENTO, M.doD.S.B.; RABELO, É.M.F.; DINIZ-NETO, J.A.; BINDA-JÚNIOR, J.R.; GALVÃO, C.deS.; DOS SANTOS, A.C.; SANTOS-JUNIOR, O.M.; DE OLIVEIRA, R.A.S.; GUIMARÃES, R.S. Relationship between rainfall and temperature: observations on the cases of visceral leishmaniasis in São Luis Island, State of Maranhão, Brazil.

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.44, n.6, p.722-724, 2011.

WIBBELT, G.; MOORE, M.S.; SCHOUNTZ, T.; VOIGT, C.C.

Emerging diseases in Chiroptera: why bats? Biology Letters, 2010. v.6.

Data de recebimento: 15/08/2014

Data de aprovação: 25/09/2014