



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76
Recredenciamento pelo Decreto nº 17.228 de 25/11/2016



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

XXVI SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS **SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - 2022**

Vigilância molecular de protozoários zoonóticos em tecidos de quirópteros

Matheus Oliveira de Melo¹; Aristeu Vieira da Silva², Téo Veiga de Oliveira³ e Maria da Conceição Borges Gomes⁴ (*in memoriam*)

1. Bolsista FAPESB, Graduando em Bacharelado em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: matheuso.demelo@gmail.com
2. Aristeu Vieira da Silva, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, bolsista Produtividade em Pesquisa CNPq, e-mail: aristeuvsilva@uefs.br
3. Téo Veiga de Oliveira, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: teo.oliveira@uefs.br
- 4- Maria da Conceição Borges Gomes, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana.

Palavras-Chave: Quiróptera; Sarcocystidae; Trypanosomatidae.

INTRODUÇÃO

Em ambientes naturais o comportamento dos parasitos em relação a seus hospedeiros é o resultado de uma interação complexa e duradoura, resultando no equilíbrio entre as partes, cientificamente conhecida como coevolução (SANGIONI et al., 2005). As alterações no ambiente causadas pelo avanço agrícola, urbanização e invasão do habitat natural pelos seres humanos, têm aumentado o contato entre animais selvagens, seus parasitos e o homem, possibilitando a circulação de zoonoses emergentes e reemergentes (SANGIONI et al., 2005).

A Bahia conquistou a segunda posição do ranking de desflorestamento em 2019, fruto da intensa exploração ambiental, resultando numa crescente relação entre o homem, animais domésticos e a fauna silvestre nativa, potencializando o intercâmbio de seus parasitos e de agentes patogênicos transmitidos por eles (AYRES et al., 2005; ALHO, 2012).

A comunidade científica mundial relata a urgência em se pesquisar todos os aspectos relacionados às zoonoses associadas aos animais selvagens, já que os surtos dessas doenças são cada vez mais frequentes (JONES et al., 2008). O estudo de agentes zoonóticos em morcegos vem apresentando elevado interesse por parte da comunidade científica, devido aos inúmeros nichos ecológicos ocupados por esses animais e pela oportunidade de adaptação de agentes infecciosos dos quirópteros a outras espécies animais e ao homem (THOMPSON et al., 2021).

Estudos realizados no Brasil apontam que há circulação de protozoários em morcegos, como Jesus et al (2017) que encontraram frequência de 2% para *T. gondii* e CABRAL (2021) que encontraram frequência de 3% para Sarcocystidae em morcegos. Trabalhos sobre a presença de protozoários, como *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma* spp e *Leishmania* spp ainda são escassos na literatura sobre parasitos de quirópteros, assim

este trabalho teve como objetivo a detecção molecular de protozoários em tecidos de quirópteros coletados em Feira de Santana, BA.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi apresentado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (Ofícios do CEUA de 28 de junho de 2018 e 28 de agosto de 2019).

Os quirópteros foram capturados com puçá em ambientes fechados e pela instalação de redes de neblina em locais abertos. Todas as coletas foram realizadas na área urbana de Feira de Santana no período de maio de 2019 a julho de 2021. As coletas foram feitas de acordo com os procedimentos sugeridos pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV, 2013). Fêmeas grávidas e lactantes não sofreram eutanásia, sendo imediatamente liberadas. Os animais coletados foram tombados e depositados na Coleção de Mamíferos da Divisão de Mamíferos do Museu de Zoologia da UEFS. As amostras de tecidos foram coletadas e maceradas no Laboratório de Análises Clínicas e Parasitologia da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS). O DNA de *pools* de fígado e baço foi extraído com kit PureLink® Genomic DNA e mantido a -80°C até a execução das análises moleculares.

Para detecção de protozoários pertencentes à família Trypanosomatidae (*Trypanosoma* spp e *Leishmania* spp) foi realizada a reação da cadeia polimerase (PCR) conforme descrito por Uliana et al (1991). A pesquisa de DNA de protozoários da família Sarcocystidae foi realizada pela *nested*-PCR conforme descrita por Da Silva et al (2009). As amostras que apresentaram bandas fortes com peso molecular de aproximadamente 300 pares de base (pb) foram submetidas a análise de polimorfismo dos comprimentos de fragmentos de restrição (RFLP) para maior especificidade. A RFLP foi realizada com as enzimas *DdeI*, *MspI* e *Hpy188III* (*New England Labs*) conforme o fabricante, em banho seco a 37°C por 60 minutos. A eletroforese em gel de agarose foi realizada com 5µL dos produtos amplificados em gel 1%, corante *GelRed*®, marcador de peso molecular de 1000 pares de base (pb) e corrida de 80 volts por 80 minutos; para os produtos da RFLP o gel 3% e marcador de peso molecular de 100bp. A visualização foi feita com transiluminador e a imagem capturada com câmera acoplada.

Os resultados da PCR ou RFLP foram tabulados com as variáveis sexo, espécie, guilda alimentar e bairro de coleta e analisadas em tabelas de contingência pelo teste de χ^2 de Pearson com correção de continuidade, considerando-se $\alpha=0,05$. Em todas essas análises foi utilizado o programa EpiInfo 7 (DEAN et al., 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

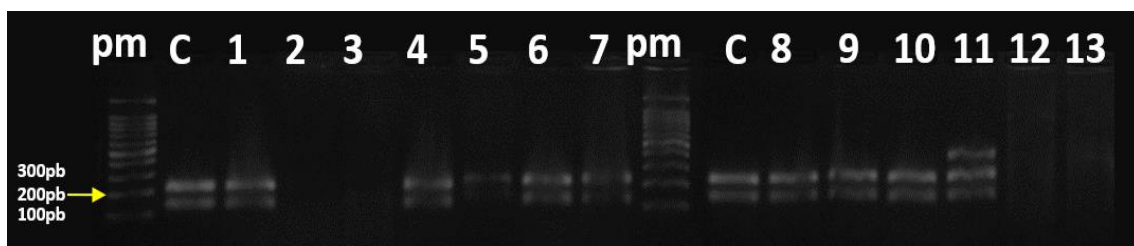
Foram realizadas oito coletas em cinco bairros da zona urbana de Feira de Santana: Novo horizonte, Jardim Acácia, SIM, Queimadinha e Mangabeira, este último com duas coletas em pontos diferentes, num total de 32 morcegos coletados.

Os morcegos coletados foram identificados no Museu de Zoologia da UEFS, apresentando quatro famílias diferentes e cinco espécies: *Artibeus obscurus* (Schinz, 1821) n=1 (3,1%), *Molossus molossus* (Pallas, 1966) n=20 (62,5%), *Eumops auripendulus* (Shaw, 1800) n=8 (25,0%), *Myotis nigricans* (Schiz, 1821) n=1 (3,1%) e *Glossophaga soricina* (Pallas, 1766) n=2 (6,3%). Estas espécies já possuem registro pela literatura na Bahia, sendo espécies muito adaptadas ao meio urbano.

Na PCR para pesquisa de protozoários da família Trypanosomatidae, apesar de ajustes na concentração de reagentes e no tempo de anelamento, não foi possível amplificar o fragmento de DNA de interesse.

Dos 32 *pools* de fígado e baço de morcegos foi encontrada 13 (40,62%; IC95%: 23,60% - 57,64%) amostras com a presença de ácidos nucleicos com tamanho compatível com os esperados para protozoários da família Sarcocystidae. A leitura dos resultados da RFLP mostra que dessas 13 amostras, oito (61,53%) tem padrão de restrição similar ao controle positivo (DNA de taquizoítos de *T. gondii*), sendo indicativo de DNA do protozoário, totalizando oito de 32 (25,00%; IC95%: 9,99% - 40,00%) das amostras positivas (Figura 1).

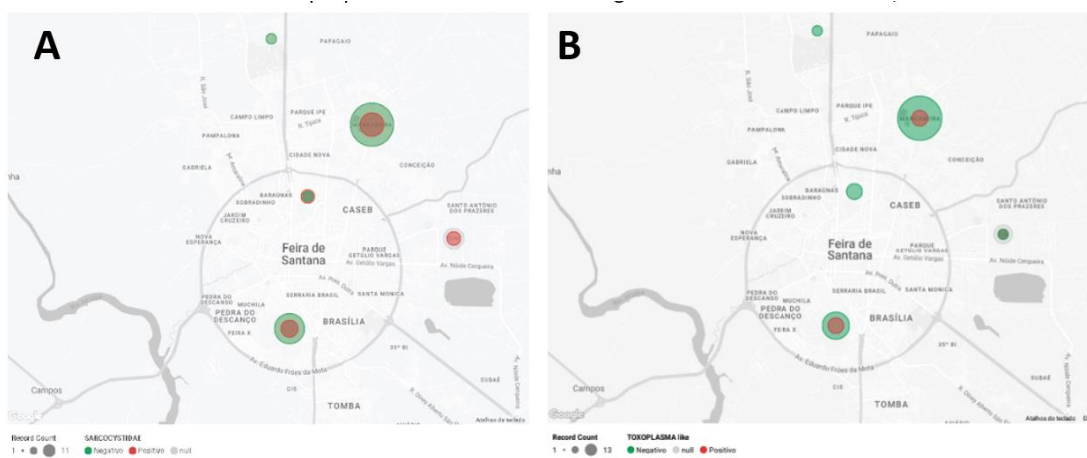
Figura 1. Gel de eletroforese em agarose 3% com produto da análise de fragmentos de restrição da reação em cadeia pela polimerase dirigida para amplificação de DNA de protozoários da família Sarcocystidae em amostra de fígado e baço de morcegos coletados em Feira de Santana, Bahia.



As amostras amplificadas serão submetidas ao sequenciamento tipo Sanger para obtenção da sequência nucleotídica completa e confirmação dos resultados com comparação destas sequências com aquelas depositadas no NCBI.

Os morcegos positivos para Sarcocystidae estão distribuídos em quatro bairros conforme indicado no mapa (Figura 3). Os testes estatísticos não apresentaram relação significativa entre a presença de fragmentos de ácidos nucleicos pertencentes a protozoários da família Sarcocystidae e as variáveis abordadas neste estudo.

Figura 3: A) Frequência de quirópteros positivos (em círculo vermelho) e negativos (círculo verde) para presença de fragmentos de DNA de protozoários da família Sarcocystidae, sendo o tamanho do raio círculo proporcional a ao número de registros. B) Frequência de quirópteros positivos (em círculo vermelho) e negativos (círculo verde) para presença de fragmentos de DNA de *Toxoplasma gondii*, sendo o tamanho do raio círculo proporcional a ao número de registros em Feira de Santana, Bahia 2019-2021.



A frequência de 40,62% positivos para Sarcocystidae encontrada neste trabalho difere de outros trabalhos realizados também com testes moleculares, mas em outros tecidos de morcegos, como CABRAL et al (2021), que analisaram 2892 amostras de

tecidos de morcegos coletados em São Paulo e detectaram 68 amostras de cérebro positivas para *T. gondii* e 26 amostras de *pool* de músculo peitoral e coração positivas para Sarcocystidae.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram detectados fragmentos de DNA compatíveis com Sarcocistidae e *T. gondii* em amostras de fígado e baço de quirópteros coletados em Feira de Santana, BA.

REFERÊNCIAS

- ALHO, C. J. R. **Estudos Avançados**. 26: 151-166, 2012.
- AYRES, J. M. et al. **Os corredores ecológicos das florestas tropicais do Brasil**. Belém, Sociedade Civil. Mamirauá, 256p. 2005.
- CABRAL, A. D. et al. **Int J Parasitol: Paras Wildlife** 14:91–96. 2021.
- DA SILVA, R.C.; SU, C. LANGONI, H. **Vet Parasitol**, 165: 332-336, 2009.
- DEAN, A. G. et al. **Epi info™, a Data Base and Statistics Program for Public Health Professionals**. CDC, Atlanta, GA, USA, 2011.
- JESUS, R.F. et al. **J Wildlife Dis** 53: 144–147. 2017.
- JONES et al. **Nature** 451:990-3, 2008.
- SANGIONI, L.A. et al. **Emerg Infect Dis** 11:265-270, 2005.
- THOMPSON, R.C. A. **International Journal for Parasitology** 43:10791088. 2013.