Estudo experimental de um "Schizotrypanum" do morcego "Hemiderma perspicillatum" da Venezuela *

Pelos doutores

Emmanuel Dias

е

Felix Pifano C.

Serviço de Estudo das Grandes Endemias Instituto Oswaldo Cruz Rio de Janeiro, Brasil Instituto Nacional de Higiene Caracas, Venezuela

(Com 2 estampas)

INDICE

	Págs.
Introdução	79
Hemoflagelados de morcegos da Venezuela	
Infecção natural de H. perspicillatum	82
Morfologia no sangue e nos tecidos	
Transmissibilidade por Artrópodes	
Cultura	\sim
Transmissão a animais	^ -
Infecção experimental de H. perspicillatum	91
Discussão	00
Resumo e conclusões	96
Bibliografia	97

INTRODUÇÃO

A existência de tripanosomas no sangue de quirópteros é conhecida há muitos anos, e já tem sido objeto de muitos trabalhos. Foi, porem, depois que Chatton & Courrier (1921-a, b) encontraram nos orgãos de um morcego europeu as formas de multiplicação do parasito a que denominaram Schizotry-panum pipistrelli, que os hemoflagelados destes mamíferos se tornaram mere-

^{*} Recebido para publicação a 31 de março e dado à publicidade em maio de 1941.

cedores de maior interesse científico, pela possibilidade, então entrevista, de terem esses tripanosomas alguma relação com o *Schizotrypanum cruzi*, agente causal da tripanosomose humana na América do Sul.

Do ponto de vista morfológico, as relações entre S. pipistrelli e o S. cruzi mais se estreitaram, ao verificar Franchini (1921) que o primeiro, tal como o segundo, se multiplicava nos tecidos tambem sob a forma de leishmania. Por outro lado, assemelhavam-se extraordinariamente as formas de tripanosoma de ambos os parasitos, conforme o assignalou Robertson (1929): "the trypanosome of the bat endemic in Italy, in Alsace and in other parts of Europe bears an extraordinary resemblance to T. cruzi".

Mais interessante ainda tornou-se a questão quando, nas zonas de doença de Chagas endêmica, foi sendo observada a frequência do parasitismo natural dos morcegos por hemoflagelados aparentemente idênticos ao *S. cruzi* humano, impondo-se então com maior premência o problema da unidade ou da pluralidade das espécies do gênero *Schizotypanum*. Alem disto, na hipótese de existirem parasitos estritamente específicos dos quirópteros, a possibilidade do próprio *S. cruzi* virulento infectar morcegos na natureza viria ainda, evidentemente a aumentar a complexidade e a importância do problema.

Em numerosas localidades infestadas pelos transmissores naturais da moléstia de Chagas, desde a Califórnia até à República Argentina, teem sido encontrados no sangue de morcegos tripanosomas morfologicamente parecidos com o S. cruzi. A multiplicação destes flagelados sob a forma de leishmania, a facil cultivabilidade, a transmissibilidade por reduvídeos e até mesmo a inoculabilidade a outros animais, já foram em alguns casos demonstradas: compreende-se, em tais circunstâncias, a dificuldade e mesmo a impossibilidade de distinção biológica entre os parasitos de certos morcegos e o S.cruzi.

Na revisão que fez dos hemoparasitos de quirópteros, DIAS (1936), após aprofundado estudo experimental do *Schizotrypanum* do *Phyllostomus hastatus*, não chegou a diferençá-lo do *S. cruzi*, a despeito de certas diferenças observadas, nem lhe foi possivel demonstrar cabalmente a identidade entre um e outro protozoário, apesar das semelhanças que possuem. E, embora tendendo ao unicismo por julgar "impossivel distinguir-se com precisão dentro do gênero *Schizotrypanum* diversas espécies", DIAS considerou então insoluvel a questão da unidade, dualidade ou pluralidade das espécies que compõem o gênero" (p. 76).

Procurando contribuir ainda para a elucidação dos problemas relacionados com a biologia dos *Schizotrypanum* de morcegos, relatados no presente trabalho o resultado de nossas investigações sobre o parasito de *Hemiderma*

perspicillatum da Venezuela, as quais tiveram por mira estabelecer, tanto quanto possivel, as relações deste flagelado com o *S. cruzi* e outros parasitos do mesmo gênero, que infectam morcegos.

HEMOFLAGELADOS DE MORCEGOS DA VENEZUELA

A primeira referência à existência de tripanosomas no sangue de morcegos venezuelanos foi feita por ITURBE & GONZALEZ (1916), que encontraram no Vampirops lineatus o flagelado a que deram o nome de Trypanosoma lineatus, que parece ser um verdadeiro Trypanosoma e não um Schizotrypanum do grupo vespertilionis, conforme o considerou DIAS (1936). Em 1938 um de nós (P.) tornou a encontrar este tripanosoma.

Estudando um Schizotrypanum que encontrou na espécie Molossus obscurus, PIFANO (1939-a) observou a semelhança de suas formas de tripanosoma e de leishmania com as do Schizotrypanum cruzi e conseguiu a evolução em Rhodnius prolixus, porem, não obteve inoculação positiva em cobaio, a partir de inseto.

Por primeira vez no Novo Mundo, PIFANO (1939-b) verificou tripanosomas de grandes dimensões, do grupo megadermae (DIAS, 1936), no sangue de Myotis nigricans da Venezuela. Segundo comunicação verbal de Evandro Chagas a um de nós, no Norte do Brasil foi tambem achado pelo Serviço de Estudo das Grandes Endemias uma espécie não determinada de morcego infectada com um tripanosoma deste grupo.

E' interessante notar que o Myotis nigricans já foi verificado portador de Schizotrypanum no Brasil e na Argentina (Dias, 1933-1934; Romaña, 1936; Dias & Romaña, 1939), afim de assinalar que as infecções isoladas ou mistas por parasitos dos grupos vespertilionis e megadermae, tal como foi observado no Myotis nigricans (infecção isoladas) e em Lonchoglossa ecaudata e Carollia perspicillata (H. perspicillatum) do Rio de Janeiro (infecções isoladas e mistas) (Dias, 1940). Nestes casos não se trata de estádios de evolução do mesmo flagelado, como já o quiseram alguns autores, mas sim de parasitos de espécie e gênero diferentes (Schizotrypanum e Trypanosoma), infectando isoladamente ou concomitantemente a mesma espécie de morcego.

Em dezembro de 1938 PIFANO verificou por primeira vez, na Venezuela, a infecção de *H. perspicillatum*, dando início às investigações cujos primeiros resultados já foram resumidos em nota prévia (PIFANO & DIAS, 1940) e que são agora expostas em maior detalhe.

INFECÇÃO NATURAL DE CAROLLIA PERSPICILLATA

Esta foi a primeira espécie de quiróptero achada com tripanosomas neste Hemisfério, por Cartaya (1910), na ilha de Cuba. O autor referiu-se ao morcego como Artibeus perspicillata e como Phyllostoma perspicillatum, dando ao parasito o nome Trypanosoma phyllostomae. Hemiderma perspicillatum é o nome do morcego aquí adotado, de acordo com a opinião do Dr. E. VIEIRA, do Museu Paulista.

No Brasil, H. perspicillatum foi achado infectado por um Schizotrypanum (Dias, 1936) semelhante ao do morcego Lonchoglossa ecaudata, porem, distinto do S. cruzi pela morfologia, pela não infectividade para animais de laboratório e pela incapacidade de evoluir em triatomídeos (Dias, 1940). Suas propriedades distinguem-se de outros parasitos de morcegos, inclusive do Schizotrypanum de H. perspicillatum da Venezuela que ora estudamos (Dias, 1940, Pifano & Dias, 1940).

No Panamá, em ativo foco de tripanosomose americana, Clark & Dunn (1932) determinaram a infecção de H. perspicillatum aztecum; examinaram 75 exemplares, 24% dos quais estavam parasitados pelo flagelado, que foi considerado como o próprio S. cruzi. Quase todos os morcegos infectados haviam sido capturados numa gruta onde abundavam Panstrogylus geniculatus contaminados e tambem outros mamíferos parasitados.

Na Venezuela, a infecção de *H. perspicillatum* foi verificada por PIFANO em 1938, nas seguintes circunstâncias. No povoado de Guarativana (Distrito de Subre, Estado Yaracuy) foram capturados 25 quirópteros desta espécie, numa casa rústica, onde foi achado um caso agudo de moléstia de Chagas (com típico sinal de ROMAÑA) e um cão tambem infectado. Dois dos morcegos tinham tripanosomas no sangue. No mesmo povoado são numerosos os *R. prolixus* com flagelados cujo inoculação à cobaia resulta facilmente positiva, tendo sido aí diagnosticados (F. P. C.) outros nove casos de moléstia de Chagas e tambem encontrados tatús e gambás atingidos pela infecção. Convem assinalar que morcegos desta espécie, apanhados em regiões venezuelanas indenes de schizotripanose humana, ainda não se mostraram parasitados. De 30 *H. perspicillatum* examinados, quatro (13,3%) apresentavam *Schizotrypanum* no sangue.

H. perspicillatum é um pequeno morcego da família Phyllostomidae, à qual pertence a maioria dos morcegos americanos até agora reconhecidos como infectados. Desde a Argentina até os Estados Unidos são conhecidas 19 espécies (inclusive algumas sub-espécies) parasitadas, conforme indica o quadro 1, no qual figuram o nome e família do quiróptero, o país onde primeiro se deu o achado e o autor deste.

QUADRO 1

Lista dos morcegos americanos naturalmente infectados por Schizotrypanum

Familia	— Espécie — País — Autor
NOCTILIONIDAE MOLOSSIDAE	Dirias albiventer — Brasil — Dias, 1936 Nyctinomus macrotis — Argentina — Mazza, 1935. Nyctinomus macrotis — Brasil — Dias, 1936.
,,	Eumops bonariensis beckeri — Argentina — Dias & Romaña, 1939.
	Molossus obscurus — Venezuela — Pifano, 1939.
VESPERTILIONIDAE	
**	Myotis nigricans — Argentina — Rомаña, 1936.
* *	Myotis dinellii — Argentina — Mazza, 1940.
, ,	Antrozous pallidus pacificus — Estados Unidos — Dias, 1937.
"	Histiotus laephotis — Argentina — Mazza, 1940.
7,7	Histiotus montanus - Argentina - Mazza, 1940.
PHYLLOSTOMIDAE	Phyllostomus hastatus — Brasil — Carini, 1931.
77	P. hastatus panamensis — Panamá — Clark & Dunn, 1932.
. 17	Hemiderma perspicillatum — Cuba — CARTAYA, 1910.
,,,	Hemiderma perspicillatum — Brasil — Dias, 1936.
9.9	Hemiderma perspicillatum — Venezuela — Pifano, 1940.
**	H. perspicillatum aztecum — Panamá — Clark & Dunn, 1932.
1 1	Artibeus jamaicensis j. – Panamá – Clark & Dunn, 1932.
"	Uroderma bilobatum - Panamá - Clark & Dunn, 1932.
17	Glossophaga soricina leachi — Panamá — Clark & Dunn, 1932.
17	Lonchoglossa ecaudata — Brasil — Dias, 1940.
**	Lonchophylla mordax — Brasil — ROMAÑA, 1940, ined.

O grau de infecção sanguínea dos morcegos varia desde o parasitismo escasso dificilmente determinavel, até as infecções intensas, com grande número de tripanosomas na circulação, tais como as que verificaram CLARK & Dunn (1932) no Panamá (mais de 400 parasitos por campo, em gota espessa de sangue). Em Cuba, Cartaya (1910) só poude encontrar flagelados em escasso número, no sangue do coração. Nos morcegos do Brasil, assim como nos da Venezuela, as infecções observadas eram geralmente fracas. O morcego mais infectado que achamos neste último país apresentava 37 tripanosomas em gota espessa de cerca de 1 centímetro de diâmetro.

MORFOLOGIA DO PARASITO NO SANGUE E NOS TECIDOS

As formas sanguícolas apresentam caracteres morfológicos típicos dos flagelados do gênero Schizotrypanum. O comprimento total do tripanosoma de regra varia em torno de 20μ . O blefaroplasto, muito volumoso, está situado bem junto à extremidade posterior; o núcleo é arredondado ou ovóide, achando-

se localizado ligeiramente mais próximo da extremidade anterior do corpo do que da extremidade posterior. Membrana ondulante estreita e pouco pregueada, bordejada pelo flagelo aderente que termina sempre por uma porção livre.

As medidas abaixo foram obtidas de 100 tripanosomas do sangue de cobaia experimentalmente infectada (Dias, 1940). As lâminas foram fixadas pelo álcool absoluto e coradas pelo Giemsa, sendo os parasitos marcados à câmara clara e medidos por meio de curvímetro.

Medidas obtidas de 100 tripanosomas (emu)

	Máximo	Mínimo	Média
Extremidade posterior — Meio do Núcleo	9,1	4,8	7,1
Meio do Núcleo — Extremidade anterior.	6,7	3,0	5,0
Flagelo livre	9,7	5,4	7,8
Comprimento total	23,6	15,1	20,0

A posição do núcleo, expressa pela relação PN/NA, é igual a 1,4; esta relação é muito constante, tendo se mantido fixa após a manutenção da amostra no laboratório por mais de um ano, através inúmeras passagens em animais de experiência.

A morfologia do parasito em estudo corresponde bastante à do Trypanosoma phyllostomae Cartaya, de Hemiderma perspicillatum de Cuba. Cartaya (1910) encontrou um comprimento total de 20,8 e as seguintes medidas parciais: Extremidade posterior ao blefaroplasto 1,0 a 1,5; Blefaroplasto ao Núcleo 6,0; Núcleo à extremidade anterior do corpo 6,0; Flagelo livre 6,0; Comprimento do núcleo 2,5. Já vimos que tal aspecto morfológico é distinto do dos tripanosomas dos morcegos Hemiderma perspicillatum e Lonchoglossa ecaudata que encontramos no Brasil (Dias, 1940); estes parasitos, alem de menores, apresentam o núcleo colocado muito próximo ao extremo anterior do corpo (PN/NA = 2,6) assemelhando-se por estas características ao Schizotrypanum vespertilionis dos morcegos da Europa e do Norte da África.

FORMAS DE MULTIPLICAÇÃO

Nos orgãos de *H. perspicillatum* naturalmente infectados de Guarativana, encontramos por duas vezes elementos intracelulares com a morfologia de leishmania. Em um caso estavam localizados no coração, aparentemente dentro da fibra muscular (Fig. 5), e no outro na camada muscular da parede do estômago (Fig. 6). Diversos morcegos infectados tiveram exame histoló-

gico negativo, tendo sido necessária uma busca prolongada para o achado das leishmanias nos casos referidos.

E' esta a primeira vez que se refere o encontro de formas de multiplicação de Schizotrypanum neste queróptero; DIAS (1940) não as encontraram em morcegos do Brasil, Cartaya (1910) e Clark & Dunn (1932), não as assinalaram. A localização destas formas no coração de morcegos já tem sido verificada, em cortes: PIFANO (1939-a) observou-a em Molossus obscurus, e DIAS (1940) em Lonchoglossa ecaudata. Recentemente, um de nós encontrou parasitos no coração de H. perspicillatum do Rio de Janeiro, infectado com Schizotrypanum do tipo vespertilionis (DIAS, inédito).

Nos tecidos dos animais de laboratório a que a amostra venezuelana tem sido inoculada, parasitos leishmaniformes são observados com facilidade (Estampa 2). Em cães, camondongos e cobaia, foram vistos em coração, baço, figado, estômago, intestino, rim, pulmão e músculo estriado. Aparentam morfologia muito semelhante à das formas tissulares do *Schizotrypanum cruzi* de origem humana.

TRANSMISSIBILIDADE POR ARTRÓPODES

Dois H. perspicillatum naturalmente infectados de Guarativana foram submetidos a provas de xenodiagnósticos, com diversas espécies de reduvídeos nascidas e criadas no laboratório ao abrigo de contaminação. O Schizotrypanum mostrou-se capaz de evoluir nas cinco espécies utilizadas, terminando o desenvolvimento pela formação de tripanosomas metacíclicos do intestino posterior. As espécies foram Rhodnius proliveus, Triatoma maculata, Triatoma nigromaculata. Panstrongylus megistus, Panstrongylus geniculatus e Psammolestes arthuri. O resultado minucioso destas provas está resumido no quadro abaixo.

XENODIAGNÓSTICO

H. perspicillatum infectados, Guarativana, Venezuela

Mo	rceg	o Data	Barbeiro	Pos.	Neg.	Tempo de exame
N.	1	10-12-938	R. prolixus	3	0 1	40 dias 52 dias 36 dias
N.	2	27-12-938	P. geniculatus	2 3 1	0 0 2	60 dias 60 dias 32 dias

Xenodiagnósticos positivos foram ainda obtidos em outros C. perspicillata da Venezuela, com P. megistus normais da criação do Instituto Oswaldo Cruz.

Contrastando com estes resultados, os xenodiagnósticos praticados em H. perspicillatum e L. ecaudata infectados, no Brasil, foram negativos com P. megistus, T. infestans e R. prolixus (DIAS 1936, 1940).

Xenodiagnóstico em animais com infecção experimental.

Uma série de animais infectados pela amostra venezuelana serviu para provas de xenodiagnóstico com diversas espécies de barbeiro, cujo resultado global foi o seguinte:

Espécie	Pos.	Neg.	
P. megistus	15	5	75
R. infestans	14	10	58
R. prolixus	23	6	79
Total	52	21	71

No quadro que se segue figuram os resultados das provas realizadas em cada um dos animais infectados.

XENODIAGNÓSTICO

Animais infectados com Schizotrypanum de H. perspicillatum da Venezuela

Animal	Data	Barbeiro	Pos.	Neg.	%	Tempo de exame
Cobaia 670	20-11-39	T. infestans	1			47 dias 47 dias 47 dias
Cobaia 671	23-11-39	T . infestans	4	0	100	
P. hastatus 610						

P. hastatus 611 P. hastatus 611 P. hastatus 611	16- 9-39	T. infestans	2	0	100	48 dias 48 dias 48 dias
Cão 682	2-12-39	P. megistus	4	0	100	45 dias
Cão 682	2-12-39	T. infestans	1	2	33	45 dias
Cão 682	2-12-39	R. prolixus	3	1	75	45 dias
Cão 682	11-12-39	P. megistus	1	2	33	42 dias
Cão 682	11-12-39	T. infestans	2	1	66	42 dias
Cão 682	11-12-39	R. prolixus	0	2	0	42 dias
Cão 682	13-12-39	P. megistus	5	0	100	42 dias
Cão 682	13-12-39	T. infestans	2	3	4 0	42 dias
Cão 682	13-12-39	R. prolixus	3	2	60	42 dias

Alem destes insetos o parasito mostrou-se capaz de evoluir em Cimex hemipterus e em Ornithodoros moubata.

CULTURA

O parasito é facilmente isolavel do sangue de morcegos ou de animais, em meio NNN e de Noguchi. Há formação de formas arredondadas, critídias e tripanosomas metacíclicos.

TRANSMISSÃO A ANIMAIS

Em uma única tentativa realizada, a inoculação de sangue de *H. perspicillatum* infectada (n. 2, Guarativana) foi negativa, em cobaia. Entretanto, obtivemos facilmente a transmissão do parasito a diversos animais, a partir de culturas, de insetos infectados sobre morcegos ou sobre animais, e de um animal a outro.

Duas amostras do Schizotrypanum foram estudadas no Instituto Oswaldo Cruz, enviadas da Venezuela em barbeiros. Uma delas foi recebida em diversos P. megistus alimentados diretamente em H. perspicillatum; a outra, em R. prolixus que sugaram uma cobaia (infectada por inoculação de R. prolixus infectados sobre H. perspicillatum), em Guarativana. A "genealogia" da amostra recebida em P. megistus encontra-se resumida a seguir. Alem dessas inoculações, há a referir a de um Eutriatoma maculata infectado sobre H. perspicillatum (n. 1, 10-12-938) em cobaia, que forneceu primeiro exame positivo 22 dias mais tarde.

A cobaia, o camondonga branco e o cão mostraram-se facilmente receptiveis ao parasito, cujo comportamento foi idêntico ao de amostras de *S. cruzi* de procedência humana. A cobaia é mais sensivel do que o camondongo, sendo

o cão tambem bastante sensivel. Infecções mortais foram diversas vezes observadas. Nos orgãos dos animais, conforme referimos, foram encontradas as formas de multiplicação do parasito, e lesões a elas atribuiveis (fig. 7).

O camondongo comportou-se de modo variavel, a princípio, sofrendo ora infecções intensas, ora infecções escassas e mesmo inaparentes. Com o número de passagens tornou-se mais uniformemente receptivel.

Experiências realizadas que serão publicadas em outro trabalho mostraram haver imunidade cruzada em animais infectados pela amostra de C. perspicillata da Venezuela e por diversas outras amostras de Schizotrypanum.

GENEALOGIA DA AMOSTRA DE SCHIZOTRYPANUM ISOLADA DE H. PERSPI-CILLATUM DA VENEZUELA POR XENODIAGNÓSTICO COM P. MEGISTUS

Animal	Num.	Inoculação	Material	Inoculado	(data) Positivo	(data) Morte
Cobaia	562	19- 7-39	P. megistus	29- 5-39	31-7	7- 8-39
Camondongo	566	19- 7-39	P. megistus	29- 5-39	7- 8	3-10-39
Camondongo	5 67	19- 7-39	P. megistus	29- 5-39	5- 8	18-12-39
Camondongo	568	19- 7-39	P. megistus	29- 5-39	5- 8	2-10-39
Cobaia	569	19- 7-39	P. megistus	29~ 5-39	1-8	19- 8-39
P. hastatus	610	18- 8-39	Sangue 569			26- 2-40
P. hastatus	611	18- 8-39	Sangue 569			3- 3-40
M. rufus	612	18- 8-39	Sangue 569	. —	23-8	23- 8-39
P. hastatus	624	22- 9-39	Barbeiros 610	(26~ 8)		26- 2-40
Cobaia	646	22- 9-39	Barbeiros 610	(26-8)		7-11-39
Cobaia	675	10-11-39	Barbeiros 610	(26-8)	27-11	29-12-39
Camondongo	678	16-11-39	P. megistus	(29~ 5-39)	5-12	9- 4-40
Camondongo	679	16-11-39	P. megistus	(29~ 5-39)	5-12	28- 3-40
Camondongo	709	9- 1-40	Sangue 678		3- 2	20- 3-40
Camondongo	710	9- 1-40	Sangue 678		2- 2	24- 2-40
Camondongo	723	24- 2-40	Sangue 710		20- 3	5-12-40
Camondongo	724	24- 2-40	Sangue 710		15- 3	10- 1-41
Camondongo	725	24- 2-40	Sangue 710		15- 3	6-12-40
H. perspicillatum	755	26- 3-40	Sangue 678+679		1-4	13- 4-40
Camondongo	769	9- 4-40	Sangue 678		4- 5	17- 6-40
Camondongo	770	9- 4-40	Sangue 678		2- 5	19- 6-40
Camondongo	773	13- 4-40	Sangue 755			28- 9-40
Camondongo	774	13- 4-40	Sangue 755		8- 5	10- 6-40
Camondongo	775	13- 4-40	Sangue 755		_	11- 7-40
Camondongo	776	13- 4-40	Sangue 755			23- 7-40
Camondongo	777	13~ 4~40	Sangue 755			14- 7-40
Camondonga	814	8- 5-40	Sangue 769 + 770		24- 5	16- 6-40
Camondongo			Sangue 769 + 770.		28- 5	10- 6-40
Camondongo	830	4- 6-40	Sangue 814		9- 7	10-10-40
Camondongo	831	4- 6-40	Sangue 814		21- 6	8- 7-40

Camondongo				814		25- 7-40
Camondongo		4- 6-40	Sangue	814	21-6	9-10-40
Camondongo		10- 6-40	Sangue	774	2- 7	15- 9-40
Camondongo	839	10- 6-40	Sangue	774	25- 6	28- 8-40
Camondongo		17- 6-40	Sangue	769	11-7	30- 1-40
Camondongo	841	17- 6-40	Sangue	769	8- 7	30- 7-40
Cobaia	845	8- 7-40	Sangue	831	6-8	26- 8-40
Cobaia				831	6-8	14- 3-41
Camondongo	850			777		20- 8-40
Camondongo	852	14- 7-40	Sangue	777	30- 7	17-10-40
				841		17- 8-40
				846	29- 8	
Cão				846		28- 9-40
Cobaia	940			830	31- 9	
Camondongo	941			830		28-11-40
Camondongo	942			830		30-10-40
Camondongo	943			830		31- 1-41
Camondongo	973			940		2- 1-41
Camondongo	974	16-11-40	Sangue	940	7-12	
Rato	977	16-11-40	Sangue	940	27-11	
Camondongo				940		
Camondongo	984	29-11-40	Sangue	943	12-12	24-12-40
Camondongo	985	29-11-40	Sangue	943	7-12	23-12-40
Gambá	988	3-12-40	Sangue	977	14-12	1- 1-41
Camondongo	1015	24-12-40	Sangue	984	14- 1	1 1 11
Camondongo	1019	28-12-40	Sangue	981		27- 1-41
Camondongo	1024	31-12-40	Sangue	973	30- 1	21, 1-11
Camondongo	1025			973		
			Sangue	1.019	13. 2	
Camondongo	1059	27- 1-41	Sangue	1.019	77 1	
Molossus rufus	1066	27- 1-41	Sangue	1.019	12 2	16 2 41
	- -	—- A A L	Zangac		15~ 2	10- 2-41

(NOTA: Nas inoculações feitas com barbeiros figura entre parentesis a data da sucção infectante. As datas de morte não indicam o termo natural da infecção, pois muitos animais foram sacrificados).

Inoculação em Phyllostomus hastatus e outros morcegos

Três *P. hastatus* foram inoculados e reinoculados em variadas condições, como logo veremos em detalhe. Este morcego mostrou-se praticamente insensivel ao parasito. Quando inoculado maciçamente com sangue rico em tripanosomas, estes podem ser encontrados no sangue do morcego durante os primeiros dias, porem desaparecem rapidamente. Pela inoculação de barbeiros infectados, os *P. hastatus* apenas sofrem parasitismo inaparente e transitório, evidenciavel somente pelo xenodiagnóstico. Tal comportamento é idêntico ao que este morcego mostrou com relação a amostras virulentas de *S. cruzi* de tatú (Dias, 1936).

A resistência do *P*. hastatus ao parasito em estudo não poude ser vencida por inoculações e reinoculações maciças; por passagens de morcego, diretamente ou por intermédio de barbeiros; por reinoculações de barbeiros nos próprios morcegos sobre que se infectaram, sugando durante a fase septicêmica consequente à primeira inoculação; e nem por inoculação de barbeiros infectados sobre morcegos, em morcegos novos.

Seguem-se os protocolos das observações dos P. hastatus inoculados.

P. hastatus n. 610 — Ficha:

	Agosto	S	etembro	tembro Outubro 15 16 18 20 22 26 30 6 9 12 14 18				
Data Ex. a fresco		1 4 6 9 13 +			9 12 14 18 25			
	Novembro	Dezembro	Janeiro	Fevereiro				
	10 16 22	.4 8 15 23 	2 10 31	13 16 22 23				

Observações:

- 18-8-39: Inoculado no peritôneo com sangue da cobaia 562.
- 26-8-39: Xenodiagnóstico: 5 prolixus e 2 infestans positivos, 3 infestans negativos.
- 1- 9-39: Xenodiagnóstico: 1 prolixus negativo.
- 22- 9-39: Reinoculado com intestino posterior de 2 infestans que o sugaram em 26-8-39.
- 30- 9-39: Reinoculado com 1 prolixus que o sugou em 26-8-39.
- 10-11-39: Reinoculado com 2 prolixus que o sugaram em 26-8-39.
- 22-11-39: Xenodiagnóstico: 2 megistus negativos.
- 16-2-40: Inoculado com Trypanosoma equinum (sangue de cobaia).
- 26-2-40: Morte com numerosissimos T. equinum no sangue periférico.

P. hastatus n. 611 — Ficha:

	Agosto	S	etembro		Outubi	ro
Data Ex. a fresco	23 24 26 29	1 4 6 9 13	3 15 16 18	20 22 27 30	2 6 9 12	14 18 25
	Novembro	Dezembro	Janeiro	Fevere	riro	Março
	3 6 16 22	4 8 15 23	2 10 31	13 16 22 23 24	£ 27 28 29	2
	~			_ + + +	· + + +	+

Observações:

- 18-8-39: Inoculado com sangue da cobaia 562.
- 1- 9-39: Xenodiagnóstico: 3 prolixus negativos.
- 1- 9-39: Reinoculado com sangue da cobaia 578.
- 16-9-39: Xenodiagnóstico: 1 megistus, 2 infestans e 1 prolixus positivos.

 1 prolixus negativo.
- 22-9-39: Reinoculado com 2 infestans infectados sobre P. hastatus 610 em 26-8-39.
- 3-11-39: Reinoculado com diversos barbeiros que o sugaram em 16-9-39.
- 22-11-39: Xenodiagnóstico: 2 prolixus e 1 megistus negativos.
- 16- 2-40: Inoculado com Trypanosoma equinum (sangue de cobaia).
- 3-3-40: Morreu com numerosissimos T. equinum no sangue periférico.

Inoculações em Molossus obscurus e Molossus rufus

Um lote de 10 *M. obscurus* foi inoculado com sangue de cobaia infectada (569). Resistiram pouco, morrendo aos 4 dias (1), 5 dias (1), 6 (1), 9 (1) e 11 dias (2), tendo sido sacrificados 2 aos 11 dias. Todos os exames a fresco foram negativos.

Um *M. rufus* (612) foi tambem inoculado com sangue da cobaia 569. Morreu 5 dias dias depois de injetado, porem, tinha tripanosomas relativamente numerosos no sangue, ao exame a fresco. Outro exemplar, injetado com sangue de camondongo (1019) teve exame positivo 17 dias mais tarde, ao mesmo tempo que um camondongo inoculado no mesmo dia. Este morcego morreu no 20° dia, achando-se tripanosomas no sangue do coração, em gota espessa.

INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE HEMIDERMA PERSPICILLATUM

A infecção experimental do morcego foi tambem tentada não só com o Schizotrypanum dele isolado na Venezuela, como com outras amostras de parasito. Inoculações com a amostra venezuelana isolada de H. perspicillatum

O morcego 755, capturado em Benjamin Constant (Minas Gerais) e com exame a fresco e gota espessa negativos, foi inoculado em 26-3-40 com sangue de 2 camondongos (678-679). Teve primeiro exame a fresco positivo em 1-4-40, conservando-se sempre positivo até a morte, em 13-4-40. Passagem do sangue após a morte foi positiva em 1 camondongo (774). Nos cortes de fígado do morcego foram encontradas formas de leishmania.

Um outro H. perspicillatum (858) foi inoculado em 17-7-40, com sangue de camondongo (841), mostrando parasitos no sangue de 1 a 9-8-40, cuja morfologia era a peculiar à da amostra inoculada. Morreu a 17-8-40. Um R. prolixus que o sugou a 15-8-40 não se infectou.

Inoculações com outras amostras de Schizotrypanum.

- H. perspicillatum n. 853 Inoculado em 14-7-40 com sangue de camondongos infectados por uma amostra de S. cruzi de tipo humano. Até 20-8-40, teve 13 exames negativos, sendo reinoculado então com sangue de uma cobaia (845) infectada pela amostra de C. perspicillata da Venezuela. Teve mais 25 exames negativos e morreu a 22-11-40.
- H. perspicillatum n. 857 Inoculado com a mesma amostra do anterior em 17-7-40, teve 10 exames negativos para Schizotrypanum até 9-8-40. Nesta data foi sugado por 1 P. megistus normal, que não se infectou, e foi reinoculado com a amostra venezuelana originária de C. perspicillata; morreu em 10-10-40, tendo tudo mais 24 exames negativos.

Em morcegos da Venezuela foram feitas (F. P. C.) mais as seguintes inoculações, com amostras de *Schizotrypanum* do mesmo país:

- H. perspicillatum n. 11 Foi injetado em 5-2-39 com 2 gotas de sangue de cobaia infectado com uma amostra isolada de gambá, tendo 1 exame de sangue positivo em 14-3-39.
- H. perspicillatum n. 12 Inoculado em 5-2-39 com 5 gotas de sangue de cobaia infectada com amostra originária de tatú, teve 1 exame positivo em 16-3-39.
- H. perspicillatum n. 17 Inoculado em 6-2-39, no peritôneo, com conteudo intestinal de Rhodnius prolixus naturalmente infectado, mostrou raros parasitos no sangue em 2-3-39.

A observação dos três últimos morcegos não poude ser prolongada por não terem resistido ao cativeiro.

Nas inoculações que praticaram em H. perspicillatum aztecum do Panamá, Clark & Dunn (1932) obtiveram os seguintes resultados:

- a) Dois morcegos foram inoculados em 21-1-31 com sangue de cobaia infectada com *S. cruzi* humano. Um deles mostrou 1 tripanosoma no sangue em 25-2-31 e o outro em 13 e 25-2-31.
- b) Três morcegos foram inoculados em 21-1-31 com sangue de rato infectado com uma amostra originária de cão; dois deles ficaram sempre negativos e o terceiro apresentou 1 parasito em gota espessa no dia 10-2-31.

Os resultados destas experiências podem ser resumidos do modo como se segue.

Os morcegos 755 e 858 mostraram-se receptiveis à amostra isolada de H. perspicillatum da Venezuela.

Os morcegos 853 e 857 não se infectaram por inoculação de *S. cruzi* do tipo humano; quando reinoculados com a amostra venezuelana em estudo tambem aparentemente não se infectaram, o que poderia ser atribuido a uma imunidade conferida pela primeira inoculação.

As inoculações dos morcegos 11-12-17 foram positivas após longo período de incubação, mas o curso da infecção não pode ser acompanhado por morte dos animais.

As inoculações em *H. perspicillatum aztecum* praticadas por Clark & Dunn (1932) evidenciaram escassa ou nula receptividade deste morcego ao *S. cruzi* originário do homem e do cão, do Panamá.

Em resumo, tal como acontece com o morcego *Phyllostomus hastatus* (cf. Dias, 1936, p. 69), os morcegos *H. perspicillatum* e H. *perspicillatum aztecum* parecem mais receptiveis aos parasitos que os infectam na natureza, do que a amostras de *Schizotrypanum* provenientes do homem e de outros animais.

DISCUSSÃO

Os resultados das investigações sobre o hemoporasito de Hemiderma perspicillatum da Venezuela, constantes do presente trabalho e da nota preliminar (PIFANO & DIAS, 1940), mostraram que é ele um flagelado do gênero Schizotrypanum Chagas. A morfologia das formas sanguícolas e das formas intracelulares; a inoculabilidade aos animais de laboratório; a transmissibilidade por Reduvídeos e a facil cultivabilidade, bem o caracterizam como tal.

Vejamos quais as relações deste parasito com outros do mesmo gênero, encontraveis no homem e em diversos animais.

As relações de ordem morfológica serão detalhadamente consideradas em próximo trabalho (Dias & Freitas), no qual será feito o estudo biométrico de amostras da mais variada origem. Limitar-nos-emos a reafirmar que o parasito em estudo mostrou-se distinguivel biometricamente de todos os demais investigados (v. Dias, 1940) sobretudo pela posição do núcleo das formas de tripanosoma, e a reproduzir o quadro 1 de Dias (1940), onde figuram as características dimensionais de alguns dos tipo *Schizotrypanum* estudados.

Dentre os hemoflagelados descritos em morcegos, os que mais se assemelham (pela situação do núcleo e pelo comprimento total) ao agora estudado são o encontrado em H. perspicillatum de Cuba (Cartaya, 1910) e o de Pipistrellus pipistrellus da Inglaterra aColes, 1915). O tripanosoma do morcego de Cuba, por parecer não corresponder em suas medidas a nenhum dos até então descritos em quirópteros, foi denominado Trypanosoma phyllostomae (Cartaya, 1910). Baseado nas analogias existentes entre o *T. phyllostomae* e o *Schizotry-panum* achado no mesmo hospedeiro na Venezuela, Dias (1940) adotou para este último a designação de amostra tipo *phyllostomae*. A prova definitiva de que se trata, porem, da mesma espécie não poderá ser feita senão após o estudo rigoroso do parasito do morcego cubano. Desde logo, parece certo que o último seja *Schizotrypanum*, pela morfologia da forma de tripanosoma; e neste caso, a prevalecer a espécie, esta passaria a denominar-se *Schizotrypanum phyllostomae* (Cartaya, 1910).

Para maior facilidade de expressão, continuaremos a chamar amostra phyllostomae à que isolamos de H. perspicillatum da Venezuela.

Do ponto de vista biológico, a infectividade da amostra phyllostomae para os animais de laboratório assemelha-a ao S. cruzi humano, e a distingue das amostras do tipo hastatus e vespertilionis (cf. Dias, 1940), gozando estas de grande especificidade com relação aos respectivos hospedeiros definitivos. A discordância que parece existir entre phyllostomae e cruzi é a da aparente resistencia do morcego H. perspicillatum às inoculações de amostras do tipo humano. Outra diferença biológica entre as amostras hastatus e phyllostomae é a de que o Phyllostomus hastatus, hospedeiro natural da primeira, não é sensivel à segunda.

Todos os tipos estabelecidos de *Schizotrypanum* são facilmente cultivaveis nos meios apropriados. Entretanto, ainda não foi feito o estudo morfológico acurado da evolução cultural das amostras de diferentes tipos.

Quanto ao desenvolvimento no tubo digestivo de triatomídeos, só não foi conseguido com amostras de tipo *vespertilionis* (DIAS, 1940), por xenodiagnóstico em animais seguramente infectados. Seja lembrado que RODHAIN (1939) obteve a evolução ou pelo menos a sobrevivência do *S. vespertilionis* europeu em triatomas e outros sugadores, porem, a partir de cultura do flagelado.

Em resumo, o hemoflagelado de *H. perspicillatum* da Venezuela é um *Schizotrypanum* que, sendo biometricamente diferençavel dos mais estudados, tem propriedades biológicas que o assemelham ou o distinguem de parasitos de tipo morfológico diverso. De todos os hemoparasitos de quirópteros bem estudados, é o que biologicamente mais se identifica ao *Schizotrypanum cruzi*.

Dada a sua virulência, a ocorrência de seu hospedeiro no domicílio humano e a sua facil transmissibilidade por reduvídeos, é provavel que o tipo phyllostomae de Schizotrypanum venha a ser encontrado infectando o homem na natureza.

QUADRO I

MEDIDAS OBTIDAS DE TRIPANOSOMAS DO SANGUE PERIFERICO, DESENHADO A CAMARA CLARA E METIDOS

COM CURVIMETRO (ALCOOL ABSOLUTO, GIEMSA)

AMOSTRA		P. N.			N. A.			FLAGELO)		TOTAL		PN/NA	SOMAS
	Mn.	Mx.	Md.	Mn.	Mx.	Md.	Mn.	Mx.	Md.	Mn.	Mx.	Md.	Md.	TRIPANO
Vespertilionis	5,4	8,5	6,8	1,8	4,2	2,6	3,6	6,7	5,2	11,4	17,0	14,6	2,6	26
Cruzi humano	4,9	9,1	7,6	2,1	5,9	4,0	5,2	8,5	6,7	13,6	20,6	17,4	1,6	100
Phyllostomae	4,8	9,1	7,1	3,0	6,7	5,0	5,4	9,7	7,8	15,1	23,6	20,0	1,4	100
Hastatus	4,5	8,7	6,4	4,2	8,0	6,2	5,4	10,5	7,7	16,2	25,1	20,4	1,0	100

P. N. — Distància do extremo posterior ao meio do núcleo.

PN/NA — Relação que exprime a posição do núcleo.

N. A. — Distància do meio do núcleo ao extremo anterior do corpo.

SUMÁRIO E CONCLUSÕES

- 1) Em Guarativana, Estado de Yaracuy, Venezuela, foi determinada a infecção natural de morcegos da espécie *Hemiderma perspicillatum* (L) por um hemoflagelado do gênero *Schizotrypanum* Chagas.
- 2) As formas sanguícolas do parasito são morfologicamente muito somelhantes às do *Trypanosoma phyllostomae* Cartaya, 1910, descrito em morcegos da mesma espécie, em Cuba. Sem por ora identificarmos a este parasito o que encontramos na Venezuela, continuaremos a referir-nos a este último como amostra *phyllostomae* (cf. Dias, vtdj).
- 3) Os tripanosomas da amostra *phyllostomae* teem em média 20 μ de comprimento total, possuem volumoso blefaroplasto subterminal, núcleo elíptico quese mediano, porem mais próvimo à extremidade anterior do corpo. As seguintes médias foram obtidas da medida de 100 tripanosomas: Extremidade posterior ao meio do núcleo 7,1 μ ; Meio do núcleo à extremidade anterior 5,0 μ ; Flagelo livre 7,8 μ ; Comprimento total 20,0 μ ; Posição do núcleo (índice PN/NA) 1,4. A amostra *phyllostomae* mostrou-se biometricamente diferençavel de todas as demais de *Schizotypanum* estudadas (DIAS & FREITAS).
- 4) Formas de multiplicação com a morfologia de leishmania foram encontradas em coração e estômago de morcegos infectados. Tripanosomas em via de divisão nunca foram observados no sangue.
- 5) Cobaia, cão e camondongo branco são sensiveis à amostra, sofrendo algumas vezes infecções intensas e mortais. Leishmanias intracelulares e lesões foram encontradas em diversos orgãos, principalmente no coração.
- 6) O morcego *Phyllostomae hastatus* não é sensivel à amostra, apresentando apenas um parasitismo sanguíneo escasso e transitório quando inoculado e reinoculado repetidas vezes. O *Molossus obscurus* tambem é aparentemente insensivel, enquanto que o *Molossus rufus* parece receptivel ao parasito.
- 7) Após numerosas passagens por animais de laboratório, a amostra *Phyllostomae* foi infesctante para dois exemplares de *Hemiderma perspicillatum* do Brasil. Os morcegos *H. perpicillatum* e *H. perspicillatum aztecum* são aparentemente resistentes à inoculação do *Schizotrypanum cruzi* (tipo humano).
- 8) A amostra phyllostomae evoluiu facilmente em todos os artrópodes sugadores experimentados: Rhodnius prolixus, Eutriatoma nigromaculata, E. maculata, E. sordida, Panstrongylus megistus, P. geniculatus, Triatoma infestans, Psammolestes arthuri, Cimex hemipterus e Ornithodoros moubata. A evolução processa-se analogamente à do S. chuzi, terminando com a formação de tripanosomas metacíclicos no intestino posterior.

- 9) Cultivos artificiais são facilmente conseguidos em meios apropriados.
- 10) A amostra phyllostomae distingue-se biológica e morfologicamente de outros hemoflagelados de morcegos (amostras hastatus e vespertilionis). Biologicamente aproxima-se muito do Schizotrydanum cruzi humano, do qual é, entretanto, diferençavel por processos biométricos (Dias, 1940, Dias & Freitas).

BIBLIOGRAFIA

Carini, A.

1831. Septima Reunión Soc. Argentina Pat. Reg. Norte, Tucumán, 918.

CARTAYA, J. T.

1910. Sanidad y Beneficencia, Habana, 3: 507.

CHATTON, E. & COURRIER, R.

1921a. C. R. Soc. Biol. 84: 943.

CHATTON, E. & COURRIER, R.

1921b. C. R. Acad. Sciences, 172: 1.254.

CLARK, H. C. & DUNN, L. H.

1932. Am. Jl. Trop. Med., 12: 49.

Coles, A. C.

1915. Prasitology, 7: 17.

Dias, E.

1933. Tese de Doutoramento, Rio de Janeiro.

DIAS, E.

1934. Memórias Inst. Oswaldo Cruz, 28: 1-111.

DIAS, E.

1936. Novena Reunión Soc. Argentina Pat. Reg., 1: 10-88.

DIAS, E.

1937. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 31: 260.

Dias, E.

1940. Memórias Inst. Oswaldo Cruz, 35: 399-409.

DIAS, E. & ROMAÑA, C.

1939. Memórias Inst. Oswaldo Cruz, 34: 619-625.

Franchini, G.

1921. Bull. Soc. Path. Ex., 14: 542-546.

ITURBE, J. & GONZALEZ, E.

1916. Revista Vargas (Caracas), n. 6: 123-127.

Mazza, S.

1935. Misión Est. Pat. Reg. Argent. Publ. n. 22.

Mazza, S.

1940. M. E. P. R. A. Publ. n. 45: 119-134.

PIFANO C., F.

1939a. Rev. Policlínica (Caracas), n. 46: 1-4.

PIFANO C., F.

1939b. Gaceta Med., Caracas, 47: 435-436.

PIFANO C., F. & DIAS, E.

1940. Brasil Med., 54: 695-696.

ROBRETSON, A.

1929. 18th An. Rep. U. S. Fruit Comp.: 293.

Romaña, C.

1936. Novena Reunión Soc. Argent. Pat. Reg., 1: 232-234.

RODHAIN, J.

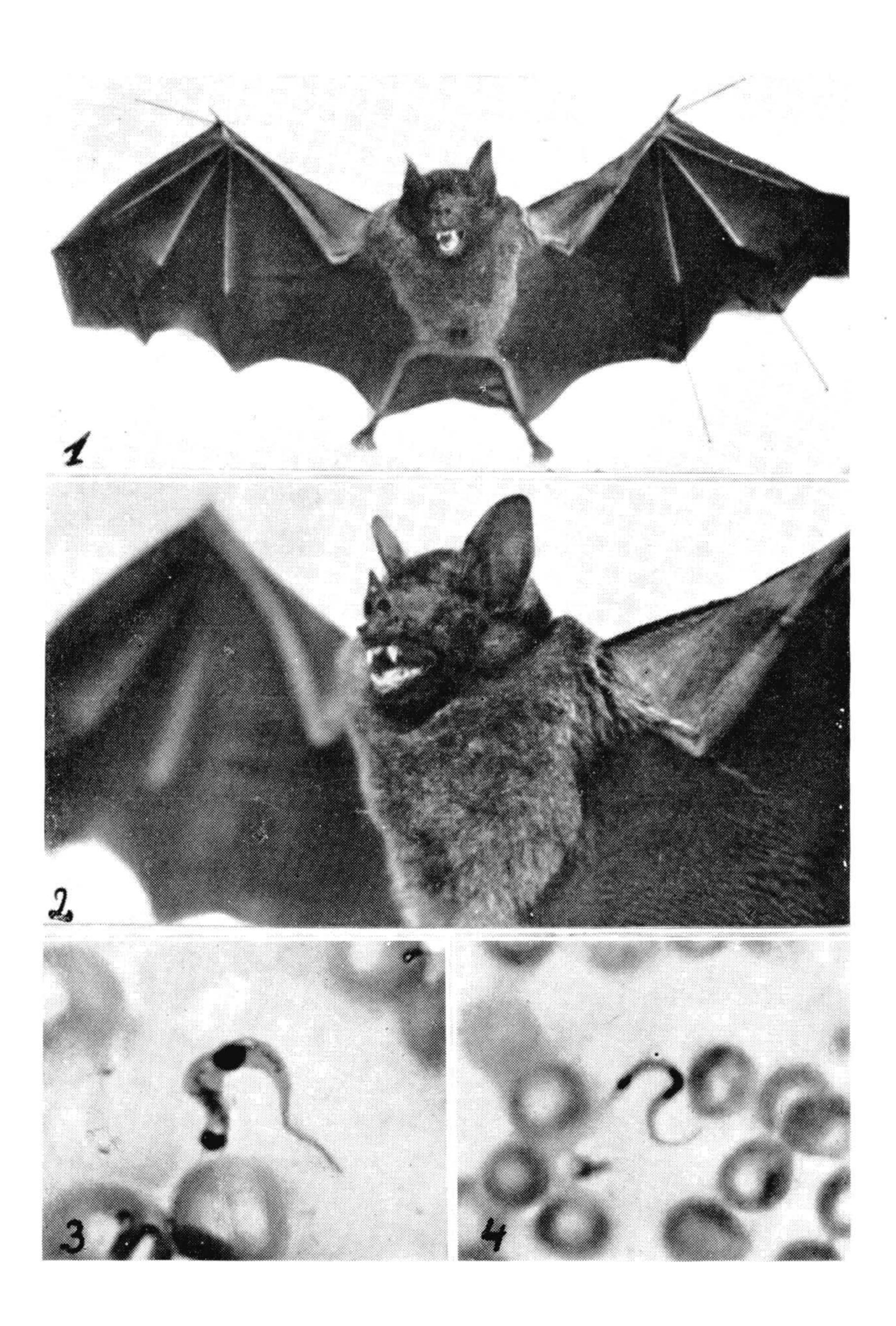
1939. C. R. Soc. Biol., 131: 814-818.

ESTAMPA 1

Figs. 1 e 2 — Hemiderma perspicillatum infectado de Guarativana, Yaracuy, Venezuela, Fot. Dr. F. Pifano.

Fig. 3 — Schizotrypanum (amostra phyllostomae) no sangue de cobaia. Forma adulta. Alc. abs. Giemsa. 1500 vezes. Fot. M. Cezar, S. E. G. E., I. O. C.

Fig. 4 — Schizotrypanum no sangue de cobaia, forma jovem, 900 vezes. Fot. M. Cesar.



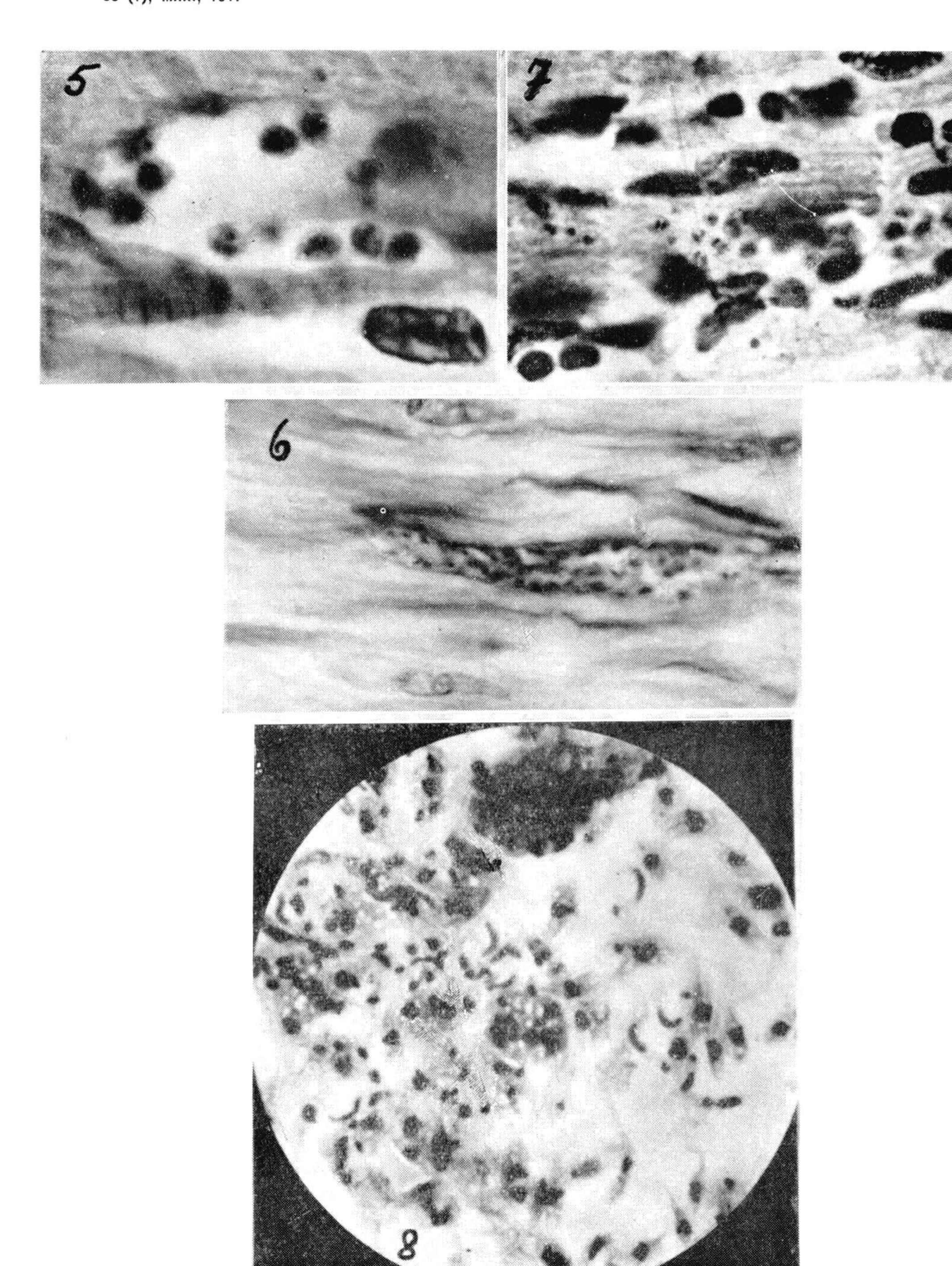
Dias e Pifano C.: Schizotrypanum do morcego Hemiderma perspicillatum da Venezuela.

ESTAMPA 2

- Fig. 5 Schizotrypanum em corte de coração de H. perspicillatum (infecção natural).

 Formol H. E. Fot. M. Cezar. 1500 vezes.
- Fig. 6 Schizotrypanum em corte de estômago de H. perspicillatum (infecção natural).

 Formol, H.E. Fot. M. Cezar.
- Fig. 7 Schizotrypanum em corte de coração de cobaia (n. 562). Formol, H.E. 1200 vezes. Fot. M. Cezar.
- Fig. 8 Schizotrypanum em cultura obtida diretamente de H. perspicillatum da Venezuela. Critídias, tripanosomas metacíclicos e formas de divisão multipla. Alc. abs. Giemsa. 700 vezes.



Dias e Pifano C.: Schizotrypanum do morcego Hemiderma perspicillatum da Venezuela.