



UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
MARCELO BASTOS DE REZENDE

Detecção de *Leishmania* spp. em Phyllostomidae capturados em
fragmentos florestais urbanos de Campo Grande, MS, Brasil

Campo Grande, MS

2017

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Detecção de *Leishmania* spp. em Phyllostomidae capturados em fragmentos florestais urbanos de Campo Grande, MS, Brasil

Autor: Marcelo Bastos de Rezende
Orientadora: Carina Elisei de Oliveira
Coorientadora: Alinne Castro

"Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA, no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Católica Dom Bosco - Área de concentração: Biotecnologia."

Campo Grande, Mato Grosso Do Sul, Abril - 2017



UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
Inspira o futuro

**Detecção de *Leishmania* ssp. em *Phyllostomidae* Capturados em
Fragmentos Florestais Urbanos de Campo Grande - MS**

Autor: Marcelo Bastos de Rezende

Orientadora: Profa. Dra. Carina Elisei de Oliveira

Coorientadora: Profa. Dra. Alinne Pereira de Castro

TITULAÇÃO: Mestre em Biotecnologia
Área de concentração: Biotecnologia.

APROVADO em 20 de abril de 2017.

Profa. Dra. Carina Elisei de Oliveira - UCDB
(orientadora)

Profa. Dra. Alinne Pereira de Castro - UCDB
(coorientadora)

Profa. Dra. Grasiela Edith de Oliveira Porfirio - UCDB

Prof. Dr. Carlos Alberto do Nascimento Ramos - UFMS

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca da Universidade Católica Dom Bosco – UCDB, Campo Grande, MS, Brasil)

R467d Rezende, Marcelo Bastos de
Detecção de Leishmania spp. em Phyllostomidae capturados em
fragmentos florestais urbanos de Campo Grande, MS, Brasil / Marcelo
Bastos de Rezende ; orientadora Carina Elisei de Oliveira ; coorientadora
Alinne P. Castro -- 2017
65 f.

Dissertação (mestrado em biotecnologia) – Universidade Católica
Dom Bosco, Campo Grande , 2017.
Inclui bibliografias.

1.Leishmania 2. Morcego 3. Biotecnologia 4.Chiroptera I. Oliveira,
Carina Elisei de II. Castro, Alinne P. III. Título.

CDD: 616.9364

AGRADECIMENTOS

Inicio meus agradecimentos por DEUS, já que Ele colocou pessoas tão especiais a meu lado, sem as quais certamente não teria dado conta!

A meus pais, Getúlio S. Rezende e Rosinéia B. de Rezende, meus sinceros agradecimento. Sempre apoiando as decisões profissionais que tenho tomado.

A meus irmãos, Fernando B. Rezende e Érika B. de Rezende.

Às Prof^{as} orientadora Carina E. de Oliveira e a minha coorientadora Alinne Castro, que acreditaram em meu potencial, ajudaram a lapidar a ideia e as metodologias.

Ao Prof. Heitor Herrera que nos colocou em contato com pesquisadores da Fiocruz/RJ.

A todos os alunos da Faculdade de Medicina Veterinária que me ajudaram muito com as coletas dos animais e com as praticas no laboratório, em especial aos alunos Erica Verneque, Maria Clara Bomfim, Juliane Nantes e ao Jean Zimmer os quais participaram espontaneamente deste trabalho. Por causa deles é que esta dissertação se concretizou, obrigado turma.

Aos alunos de ciências biológicas em especial o Marcos Morales, que ajudou em campo e no laboratório.

Ao Jaire Marinho que ajudou com algumas correções e a lapidar algumas ideias na parte experimental e escrita

Ao Filipe Martins que me ajudou nas coletas em campo.

A todos os pesquisadores da Fiocruz/RJ que repassaram os conhecimentos de coleta de matérias biológicos e fizeram as análises in vitro.

A meus amigos do mestrado, pelos momentos divididos juntos, especialmente à Jhessyca Leal, Guilherme Augusto, que tornaram a rotina de laboratório mais leve.

Aos meus amigos fora da faculdade em especial Jean Victor, Andreza Leão e Pamela Bittencurt, por sempre me apoiarem.

A todos os alunos, professores e funcionários do Departamento do Biosúde, em especial as técnicas Maria Helena e Daiane que estavam dispostas a me ajudar quando precisei.

Às funcionárias do Colegiado de Pós-graduação, especialmente à Silvia à pela disponibilidade.

Agradeço, também, à CAPES e FUNDECT pelo apoio financeiro.

Finalmente, gostaria de agradecer à Universidade Católica Dom Bosco por tornarem possível a pesquisa com a infraestrutura oferecida. Em fim minha DISSERTAÇÃO DE MESTRADO proporcionou-me mais que a busca de conhecimento científico, mas uma LIÇÃO DE VIDA, Ninguém trabalha sozinho, OBRIGADO A TODOS!

BIOGRAFIA

Marcelo Bastos de Rezende, nascido em 14 de setembro de 1993 na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. Bacharel em Ciências Biológicas em 2014 pela Universidade Católica Dom Bosco, o qual participou de PIBIC entre 2012 e 2014 com morcegos e biologia molecular, que gerou um artigo científico publicado neste ano de 2017 com o título: Detection of *Leishmania* spp. in Bats from an Area of Brazil Endemic for Visceral Leishmaniasis, na revista científica Transboundary and Emerging Diseases.

SUMÁRIO

Página

LISTA DE FIGURAS	1
LISTA DE TABELAS	2
RESUMO	3
ABSTRACT	4
1. INTRODUÇÃO	5
OBJETIVOS	7
2.1. Objetivo Geral	7
2.2. Objetivos Específicos	7
3. Revisão de Literatura	8
3.1 Aspectos gerais das espécies de <i>Leishmania</i> spp.	8
3.1.1. Epidemiologia	8
3.1.2. Agente etiológico	12
3.1.3. Vetor	14
3.1.4. Ciclo de vida das espécies de <i>Leishmania</i>	15
3.1.5. Hospedeiros	17
3.1.6. Características genômicas	18

3.2. <i>Leishmania</i> spp. Chiroptera.....	20
3.2.1. Histórico de identificação de <i>Leishmania</i> spp. em morcegos	20
3.2.2. Fragmentação do cerrado e a quiropterofauna	27
3.2.3. Parâmetros para considerar um reservatório	30
ARTIGO	45
Resumo	45
1. Introdução.....	46
2. Materiais e métodos	47
2.1. Área de estudo	47
2.2. Coleta dos animais	48
2.3. Necropsia	49
2.4. Isolamento <i>in vitro</i> de <i>Leishmania</i>	49
2.5. Esfregaço sanguíneo e imprint de órgãos	49
2.6. Extração de DNA genômico	50
2.7. PCR de kDNA de <i>Leishmania</i> spp.....	50
2.8. PCR da região ITS de <i>Leishmania</i> spp.	50
3. Resultados.....	51
4. Discussão	53
5. Conclusão.....	55
6. Referencias.....	55
APÊNDICE 1: Normas Acta Tropica.....	60
APÊNDICE 2: Artigo publicado.....	80

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1: Mapa mundial demonstrando o número de novos casos de LV reportado em 2013 (WHO, 2014).	9
Figura 2: Representação da distribuição espacial dos casos de LV no Brasil, entre os anos de 1983 a 2006 (fonte: SVS/MS).	10
Figura 3: Registros de casos e óbitos por LV no estado de Mato Grosso do Sul, Fonte: SINAN, 2017.	10
Figura 4: Distribuição mundial das áreas endêmicas de leishmaniose cutânea, em 2013 (WHO, 2014).	11
Figura 5: Classificação das espécies de <i>Leishmania</i> (WHO, 2012. Adaptado).	12
Figura 6: Principal vetor da <i>Leishmania</i> spp. <i>Lutzomyia longipalpis</i> (Fonte: www.vectorbase.org)	15
Figura 7: Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp. (Fonte: Centers for Disease Control and Prevention/ CDC).	16
Figura 8: Micrografia eletrônica de cinetoplasto de <i>Leishmania</i> spp. composto por uma massa de maxicírculos e minicírculos. Fonte: Barker (1989).	19
Figura 9: Biomas Brasileiros, (IBGE, 2010).	27

LISTA DE TABELAS

Páginas

Tabela 1: Subgêneros e espécies de <i>Leishmania</i> , manifestações clínicas e distribuição geográfica.....	13
Tabela 2: Compilado de pesquisas onde foi constatada a presença de <i>Leishmania</i> spp. em morcegos.	23

RESUMO

A ordem Chiroptera vem ganhando destaque. Pesquisas atuais tem apontado os morcegos como possíveis reservatórios, para que essa relação seja esclarecida é preciso elucidar o verdadeiro papel dos morcegos no ciclo epidemiológico das espécies, entre elas *Leishmania*. Nesse sentido, é necessário demonstrar a viabilidade do parasita na interação parasita-hospedeiro, uma vez que morcegos servem como fonte de alimentação para *Lutzomyia longipalpis* o principal vetor de *Leishmania* spp. A capacidade de dispersão dos morcegos e sua longevidade poderiam facilitar a disseminação e persistência de diversos parasitas, assim como *Leishmania* spp. A fim de tentar esclarecer o papel morcegos como potenciais hospedeiros de *Leishmania* spp. objetivamos identificar e isolar *Leishmania* spp. de amostras de sangue, pele, baço e fígado de quatro espécies de morcegos da família Phyllostomidae (*Artibeus lituratus*, *Artibeus planirostris*, *Carollia perspicillata* e *Glossophaga soricina*) em fragmentos florestais da cidade de Campo Grande/MS. Foram coletados 86 animais, dos quais 13,9% (12/86) foram positivos para kDNA e região ITS de *Leishmania* spp. Todas as 86 amostras de sangue, pele, baço e fígado inoculado *In vitro* foram negativas para *Leishmania* spp., assim como as análises de imprint de baço e fígado e esfregaço sanguíneo. Nossos resultados mostram que os morcegos de áreas urbanas podem ser potenciais reservatórios, porem outras técnicas precisam ser empregadas para demonstrar a viabilidade e o ciclo de vida do parasita neste possível hospedeiro.

Chiroptera, morcegos, PCR, *Leishmania* spp.

ABSTRACT

The Chiroptera order has been gaining prominence. Current research has pointed out bats as possible reservoirs, so that this relationship is clarified it is necessary to elucidate the true role of bats in the epidemiological cycle of the species, among them *Leishmania*. In this sense, it is necessary to demonstrate the viability of the parasite in the parasite-host interaction, since bats serve as the food source for *Lutzomyia longipalpis* the main vector of *Leishmania* spp. The dispersal capacity of bats and their longevity could facilitate the dissemination and persistence of several parasites, such as *Leishmania* spp. In order to try to clarify the role of bats as potential hosts of *Leishmania* spp. We aimed to identify and isolate *Leishmania* spp. Of blood, skin, spleen and liver samples of four species of bats of the family Phyllostomidae (*Artibeus lituratus*, *Artibeus planirostris*, *Carollia perspicillata* and *Glossophaga soricina*) in forest fragments of the city of Campo Grande / MS. A total of 86 animals were collected, of which 13.9% (12/86) were positive for kDNA and ITS region of *Leishmania* spp. All 86 in vitro inoculated blood, skin, spleen and liver samples were negative for *Leishmania* spp., As well as imprint analyzes of spleen and liver and blood smear. Our results show that bats from urban areas may be potential reservoirs, but other techniques need to be employed to demonstrate the viability and life cycle of the parasite in this possible host.

Chiroptera, bats, PCR, *Leishmania* spp.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil a ordem Chiroptera é uma das ordens mais investigadas dentre os outros mamíferos silvestres (BRITO et al., 2009). Estudos recentes têm demonstrado a presença de diversos patógenos nos representantes desse mamífero, principalmente os tripanossomatídeos sendo os gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*, apontados como os mais estudados na atualidade (ROQUE & JANSES, 2014).

Os primeiros estudos relatando *Leishmania* spp. em morcegos ocorreram na década de 70 e 80, mostrando por meio de técnicas sorológicas a presença de anticorpos anti-*Leishmania* parasito (MUTINGA, 1975; MORSY, 1987). A partir dos anos 2000 os estudos nessa área foram retomados por meios de técnicas de biologia molecular e sorologia. Avaliações moleculares para detecção do parasito em diversos países, inclusive no Brasil, com detecção de *Leishmania amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* (SAVANI et al., 2010; SHAPIRO et al., 2013; DE OLIVEIRA et al., 2015).

A grande maioria dos estudos buscou a presença de DNA do parasita por meio de ferramentas moleculares, porem essa informação não foi suficiente para incluir esse mamífero na epidemiologia das leishmanioses (ROQUE & JANSEN, 2014). Assim, mais ensaios laboratoriais são necessários para demonstrar o papel dos morcegos como reservatório dessa zoonose (BERZUNZA-CRUZ et al., 2015).

Os morcegos neotropicais são capazes de ocupar ambientes urbanos fazendo o uso de fragmentos florestais e ambientes artificiais, como edificações (BREDT et al., 1998; LIMA et al., 2008; OPREA et al., 2009). Além das condições ideais, os ambientes urbanos podem fornecer recursos para morcegos com diferentes hábitos alimentares através da abundância de plantas e de insetos presentes nestas áreas (REIS et al., 2007).

Embora os morcegos apresentem um papel ecológico importante nos centros urbanos, como dispersores de sementes, polinizadores em remanescentes florestais, e auxilia no controle de insetos, a aproximação desses animais às áreas urbanas pode representar grandes problemas para saúde pública (SAZIMA et al., 1994; PULCHÉRIO-LEITE., 2008). A capacidade de dispersão somada a sua longevidade pode facilitar a dispersão e persistência de diversos parasitos (LAMPO et al., 2000), uma vez que vários organismos patogênicos podem associar a esinteragir com esses animais.

A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada (MAUDIN et al., 2009). O Estado do Mato Grosso do Sul (MS) é considerada uma área endêmica para as espécies de *Leishmania*. Esta doença é uma zoonose classificada basicamente de por três formas, a cutânea, a visceral e muco-cutânea, sendo a Leishmaniose visceral (LV) a mais grave e ocasionada, principalmente, pelo parasito da espécie *Leishmania infantum* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

No Brasil foi registrado em 2014 mais 3.400 casos de Leishmaniose Visceral (LV). Essa zoonose foi responsável por 95,2% de todos os casos obtidos em nove países da Américas (WHO, 2016). Mato Grosso do Sul é um dos estados brasileiros com mais casos de LV, registrou mais de 400 registros entre 2014 e 2016 e 28 óbitos, sendo seis deles só no último ano (SINAN, 2017).

Estudos que envolvam a busca por novos hospedeiros reservatórios tornaram-se necessário a partir de uma perspectiva mais ampla sobre as zoonoses. Vale ressaltar que as espécies de *Leishmania* são multi-hospedeiras mantidas por diversas espécies de mamíferos. A magnitude do problema de saúde representada pela leishmaniose combinado com a complexidade da sua epidemiologia apontam para a urgência em esclarecer várias questões relacionadas a transmissão, incluindo o papel de hospedeiros mamíferos não humanos para o desenvolvimento de um controle estratégico e efetivo.

OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Identificar e isolar *Leishmania* spp. em morcegos de fragmentos florestais de Campo Grande/MS.

2.2. Objetivos Específicos

- Isolar os parasitas dos gêneros *Leishmania* de sangue, baço, fígado e pele de morcegos;
- Caracterizar através de parâmetros morfológicos e moleculares, os isolados obtidos a partir de amostras colhidas dos morcegos;

3. Revisão de Literatura

3.1 Aspectos gerais das espécies de *Leishmania* spp.

3.1.1. Epidemiologia

A leishmaniose é uma doença negligenciada segundo a Organização Mundial de Saúde, considerada uma zoonose que possui uma variedade de formas clínicas, na sua maioria de caráter crônico, podendo acometer o homem quando incluso no ciclo de transmissão do parasita (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007; ROTUREAU, 2006; MEDEIROS & ROSELINO, 1999). Esta doença é uma zoonose endêmica em 98 países distribuídos em cinco continentes, porém é compulsória em apenas 30 deles (ALVAR et al., 2012; WHO, 2014). Segundo a Organização Mundial de Saúde supõe-se que 350 milhões de pessoas estão suscetíveis a contrair a doença, com cerca de dois milhões de novos casos por ano (ALVAR et al., 2012; WHO, 2014).

A doença é classificada de duas formas clínicas, a leishmaniose tegumentar (LT) e a leishmaniose visceral (LV) sendo esta forma mais grave, com alterações sistêmicas nos órgãos relacionados ao sistema imunológico do hospedeiro como baço, fígado, medula óssea, linfonodos e em alguns casos ocasionar alterações cutâneas (MICHALSKY et al., 2002). Dados estatísticos demonstram aproximadamente 0,2 a 0,4 milhões de LV e 0,7 a 1,2 milhões de casos de LT ocorrem a cada ano no mundo (CHAPPUIS et al., 2007; ALVAR et al., 2012).

A LV tem uma distribuição geográfica mais restrita que a LT, porém possui maiores números de mortes, estima-se que 90% dos casos de LV ocorrem em apenas seis países, sendo um deles o Brasil (Figura 1). Entre os países das Américas

o Brasil ganha destaque com o maior número de casos, cerca de 3.100 por ano. Trata-se de uma doença invariavelmente fatal se não tratada e mesmo com tratamento adequado mantém taxas de letalidade de até 17% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007; WHO, 2014).

Status of endemicity of visceral leishmaniasis, worldwide, 2013

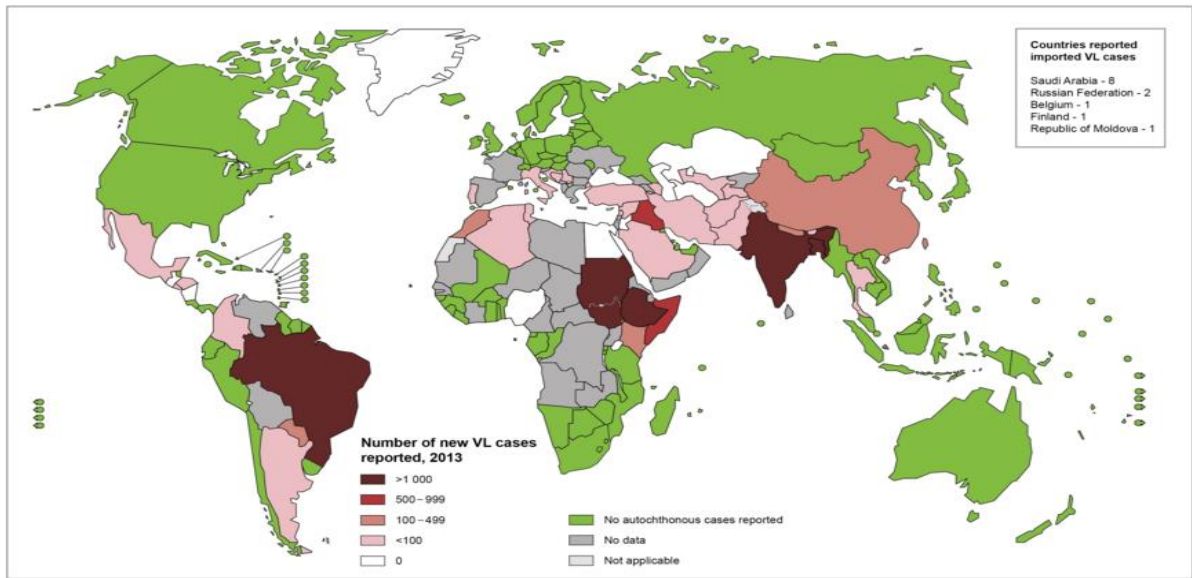


Figura 1: Mapa mundial demonstrando o número de novos casos de LV reportado em 2013 (WHO, 2014).

Na década de 1990, mais de 90% dos casos de LV ocorriam na região Nordeste do Brasil, contudo a doença vem se expandindo para as regiões Centro-Oeste, Sudeste e Norte (Figura 2), diminuindo essa porcentagem nos Estados do Nordeste que representam atualmente 56% dos casos (MAIA-ELKHOURY et al., 2008).

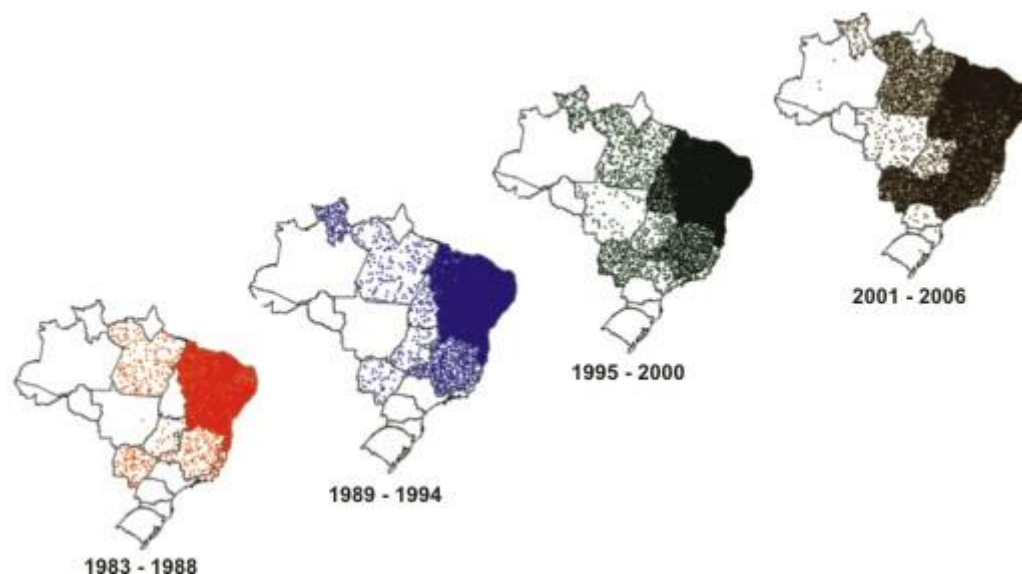
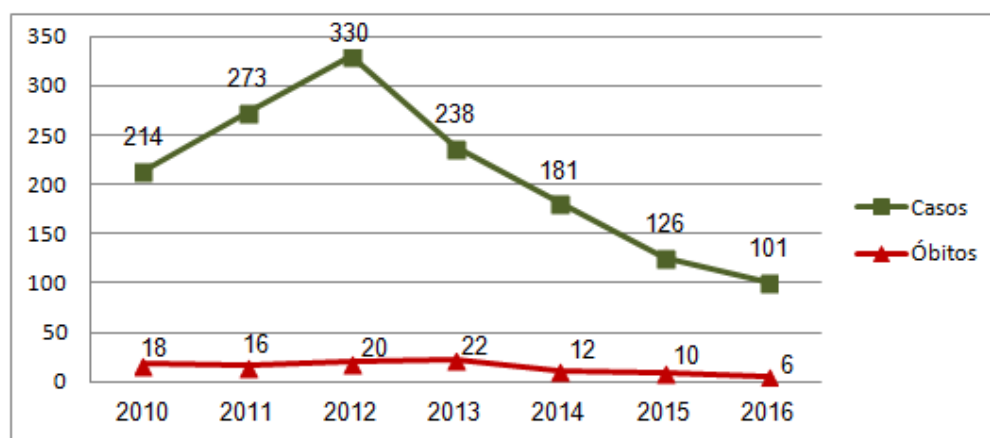


Figura 2: Representação da distribuição espacial dos casos de LV no Brasil, entre os anos de 1983 a 2006 (fonte: SVS/MS).

No estado de Mato Grosso do Sul entre 2010 a 2016 foram registrados 1.463 casos de LV com 104 óbitos sendo seis deles no ultimo anos, ano este que obteve menor numero de óbitos desde 2011. Só em 2016 foram registrados 101 casos de LV foram confirmados (Figura 3), distribuídos em 21 municípios do estado, Campo Grande a capital do estado obteve o maior numero de casos (41 casos), seguido por Três Lagoas (12), Corumbá (9) e Coxim (7) (SINANA, 2017).



Fonte: Gerência Estadual de Zoonoses/ CCV/ SGVS/ SES - Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN)*

*Dados sujeitos a revisão (atualizados em 16/01/2017)

Figura 3: Registros de casos e óbitos por LV no estado de Mato Grosso do Sul, Fonte: SINAN, 2017.

Em relação a LT que corresponde a forma mais disseminada da doença (Figura 4), até o momento são registrados oficialmente mais de 200.000 casos por ano no mundo e deste total, 70-75% dos casos ocorrem em dez países: Afeganistão, Algéria,

Colômbia, Brasil, Iran, Síria, Etiópia, Sudão, Costa Rica e Peru. No Brasil foi registrado, no período entre 2003 e 2012, mais de 250.000 casos, sendo a maioria na região Norte com 103.397 casos, 78.188 na Nordeste, 39.173 na Centro-Oeste, 24.306 na Sudeste e 5.639 na Sul (SINAN, 2014).

Status of endemicity of cutaneous leishmaniasis, worldwide, 2013

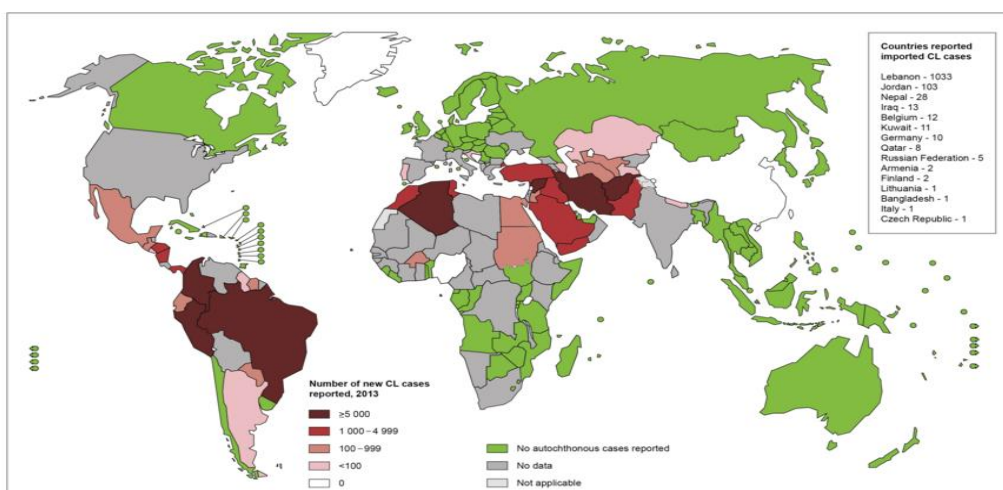


Figura 4: Distribuição mundial das áreas endêmicas de leishmaniose cutânea, em 2013 (WHO, 2014).

Nas últimas duas décadas os casos de LT tem disseminado por quase todos estados brasileiros, fato esse relacionado à colonização do país, a expansão da doença assim como os surtos que foram comuns na região Nordeste, e que agora ocorrem nas regiões Sudeste e Centro-Oeste (MARZOCHI, 1992; GONTIJO & CARVALHO, 2003). Dentre as cinco macrorregiões brasileiras, a região Centro-Oeste ocupou o terceiro lugar com mais casos de LT, 4.635 casos no ano de 2003, perdendo apenas para região Norte e Nordeste, com 14.200 e 8.005 casos no mesmo ano respectivamente (BASANO & CAMARGO, 2004).

No estado de Mato Grosso do Sul foram registrados 2.240 casos de LT sendo que esse número vem diminuindo a partir de 2004. De janeiro a dezembro de 2011 foram notificados 112 casos de LT no estado, distribuídos em 42 municípios. O maior número de casos desse período foi registrado na capital, em Campo Grande com o total de 14, seguido de Tacuru com sete casos e Amambaí com seis casos (BATISTA, 2012).

3.1.2. Agente etiológico

As leishmanioses são ocasionadas pelo protozoário pertencente ao gênero *Leishmania* Ross 1903, ordem Kinetoplastidae família Trypanosomatidae. O gênero *Leishmania* é composto por 30 espécies que infectam diferentes hospedeiros e dentre elas 20 são patogênicas ao homem (CHANCE, 1985; LAINSON & SHAW, 1987). Esse gênero possui dois subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, que são classificados de acordo com sítios de desenvolvimento das formas parasitárias no tubo digestivo do vetor (LAINSON & SHAW, 1987) (Figura 5).

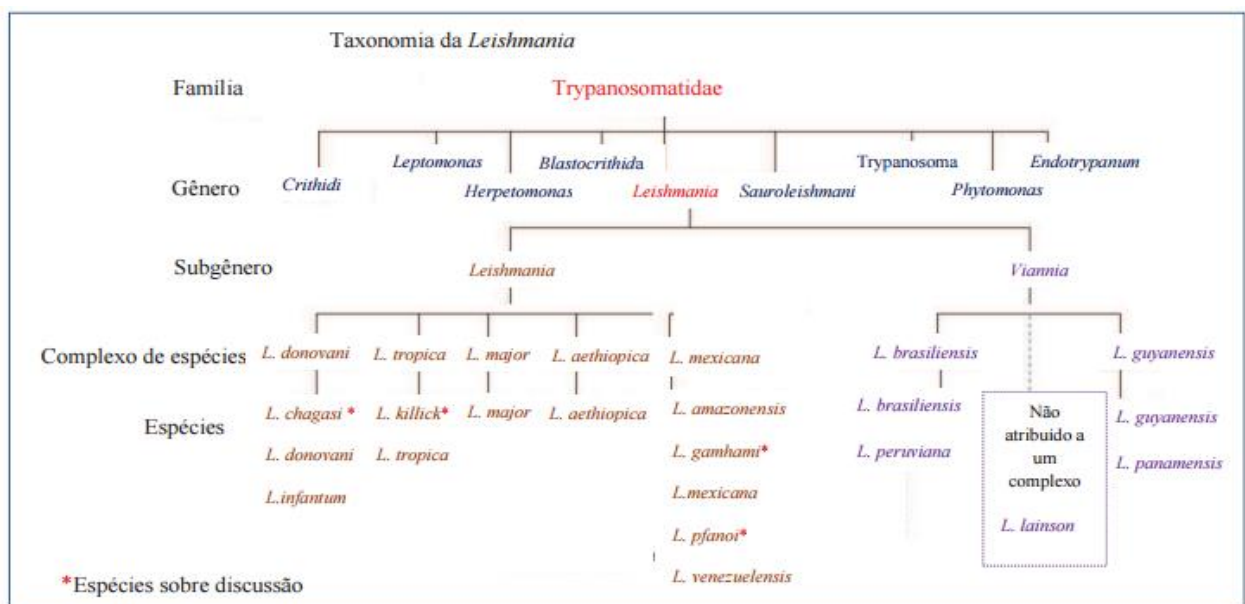


Figura 5: Classificação das espécies de *Leishmania* (WHO, 2012. Adaptado).

No novo mundo, atualmente são conhecidas 11 espécies dermatrópicas de *Leishmania* causadoras de doença em humano e oito espécies descritas somente em animais. Entretanto, no Brasil são conhecidas oito espécies de *Leishmania* responsáveis por infectar humanos (Tabela 1), sendo a forma tegumentar (LT) causada principalmente por *L. (V.) brasiliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* enquanto *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) infantum* é a responsável pela doença visceral (LV) (Ministério da saúde, 2007). Cada espécie apresenta particularidades pertinentes às manifestações clínicas, a vetores, reservatórios e padrões epidemiológicos, à distribuição geográfica e até mesmo à resposta terapêutica (VALE & FURTADO, 2005).

Tabela 1: Subgêneros e espécies de *Leishmania*, manifestações clínicas e distribuição geográfica.

Espécies	Acometimento clínico no homem	Distribuição geográfica
<i>L. (V.) braziliensis</i> (VIANNA, 1911)	Lesões cutâneas e mucosas	Da América Central ao norte da Argentina
<i>L. (V.) peruviana</i> (VELEZ, 1913)	Predominantemente lesões cutâneas	Vales elevados interandinos e encosta oeste dos Andes
<i>L. (V.) guyanensis</i> (FLOCH, 1954)	Predominantemente lesões cutâneas	Calha norte da Bacia Amazônica, Guianas e países do noroeste sul-americano
<i>L. (V.) panamensis</i> (LAINSON & SHAW, 1972)	Predominantemente lesões cutâneas	América Central e costa pacífica da América do Sul
<i>L. (V.) lainsoni</i> (SILVEIRA <i>et al</i> , 1987)	Rara ocorrência, provocando lesões cutâneas	Norte do Estado do Pará
<i>L.(V.) naiffi</i> (LAINSON <i>et al.</i> , 1990)	Rara ocorrência, provocando lesões cutâneas	Região Amazônica
<i>L. (L.) mexicana</i> (Biagi, 1953)	Lesões cutâneas e, eventualmente, cutâneo- difusas	México e América Central
<i>L. (L.) amazonensis</i> (LAINSON & SHAW, 1972)	Lesões cutâneas e, eventualmente, cutâneo- difusas	América Central e regiões Norte, Nordeste, Centro- Oeste e Sudeste do Brasil
<i>L. (L.) venezuelensis</i> (BONFANTE-GARRIDO, 1980)	Lesões cutâneas	Venezuela

<i>L. (L.) pifanoi</i> (MEDINA & ROMERO, 1959)	Lesões cutâneas e, eventualmente, cutâneo- difusas	Venezuela
--	--	-----------

O agente etiológico da leishmaniose possui duas formas morfológicas distintas amastigotas e promastigota. As formas amastigotas são encontradas nas células do sistema fagocitário mononuclear (SFM) de hospedeiros vertebrados e as formas promastigota nos vetores (hospedeiro invertebrado). A forma flagelada do parasito e infectante, entrando no hospedeiro vertebrado através da picada do vetor através do refluxo sanguíneo (SACKS & PERKINS, 1984; POCAI *et al.*, 1998).

Diante do fato da leishmaniose ter uma ampla diversidade de espécies, distribuição geográfica, etiológica e epidemiológica se torna assim um sério problema de saúde pública. A leishmaniose compromete o sistema fagocitário mononuclear da pele, baço, fígado, medula óssea, linfonodos entre outros órgão relacionado à resposta imunológica do hospedeiro (LAINSON & SHAW, 1987).

3.1.3. Vetor

Acredita-se que nas Américas ocorram mais de 56 espécies de flebotomíneos descritos, que atuam na transmissão de 15 espécies de *Leishmania* (MAROLI *et al.*, 2012). Somente no Brasil, cerca de 40 espécies, de oito gêneros, são consideradas suspeitas ou já foram relatadas como vetores de *Leishmania* spp. (RANGEL & LAINSON, 2009), sendo que 19 delas estão diretamente ligadas com a infecção em humanos. (RANGEL & LAINSON, 2003; SHIMABUKURO, 2007).

As principais espécies vetores do parasita causador de leishmanioses nas Américas são *Lutzomyia longipalpis* (Figura 6), *Lu. migonei*, *Lu. intermedia*, *Lu. whitmani* e a espécie *Lu. cruzi* que podem transmitir *L. amazonensis* e *L. infantum* em algumas cidades do estado de Mato Grosso do Sul (LAINSON & SHAW, 1987; LAINSON & SHAW, 2005; MISSAWA & LIMA, 2006; MISSAWA *et al.*, 2011, DE OLIVEIRA, *et al* 2017a, DE OLIVEIRA, *et al* 2017b;).



Figura 6: Principal vetor da *Leishmania* spp. *Lutzomyia longipalpis* (Fonte: www.vectorbase.org)

São insetos holometabólicos, possuem a fase de ovo, quatro estádios larvários, pupa e adulto, cujo ciclo ocorre parcialmente no solo (BRAZIL & BRAZIL, 2003). Após a cópula, as fêmeas colocam os ovos, em solo úmido e enriquecido com minério, e ocorre a eclosão das larvas a partir do 7° até o 10° dia. As larvas apresentam quatro estágios larvais, que realizam-se em um período de 20 a 30 dias, passando então para o estágio de pupa, que dura cerca de duas semanas, e por fim o inseto adulto, com longevidade de até 20 dias (FERRO et al., 1998; BRAZIL & BRAZIL, 2003).

Em geral machos e fêmeas se alimentam de açúcar (seiva de plantas, secreções de afídeos e néctar) (RANGEL & LAINSON, 2003). As fêmeas, além dessa alimentação, também são hematófagas, exceto algumas espécies que são autógenas, ou seja, pode ocorrer a maturação dos ovos podem ocorrer sem a necessidade da hematofagia, porém na grande maioria das espécies se faz necessário o sangue para a maturação de seus ovários, assim fazendo parte do ciclo de transmissão de patógenos (FORATTINI et al., 1976; SHERLOCK, 2003)

3.1.4. Ciclo de vida das espécies de *Leishmania*

A fase promastigota encontrando-se no tubo digestivo do inseto vetor, com as dimensões entre 10-20µm de comprimento e 1,5-3,0µm de largura, possui um flagelo que se origina da bolsa flagelar próxima ao cinetoplasto e que se estende a extremidade anterior da célula permanecendo-se livre. Durante o processo de desenvolvimento da forma promastigotas (tubo digestivo do vetor), existem duas

formas distintas, a procíclica, alongadas e com flagelo mais curto que o corpo celular e a forma metacíclica. As células passam por um processo de metaciclogeneses, para originar a forma metacíclica, arredondadas e curtas com o flagelo mais longo que o corpo celular, ganhando maior mobilidade. A partir desse momento as formas migram para porção anterior do estômago do vetor ocasionando um “bloqueio”, forçando assim na hora do repasto sanguíneo o inseto a regurgitar e infectar o hospedeiro vertebrado (HOWARD et al., 1987; KILLICK- KENDRICK, 1990).

Em seguida, a forma metacíclica é fagocitada por células do sistema mononuclear fagocitário presente na pele, posteriormente a forma flagelada do protozoário se diferencia na forma amastigota, intracelular obrigatória, forma que infecta os hospedeiros vertebrados, se multiplica por divisão binária, rompendo a célula e infectando novas células, continuando o ciclo de multiplicação dentro do hospedeiro (Figura 7) (HANDMAN & BULLEN, 2002; KATO *et al.*, 2010).

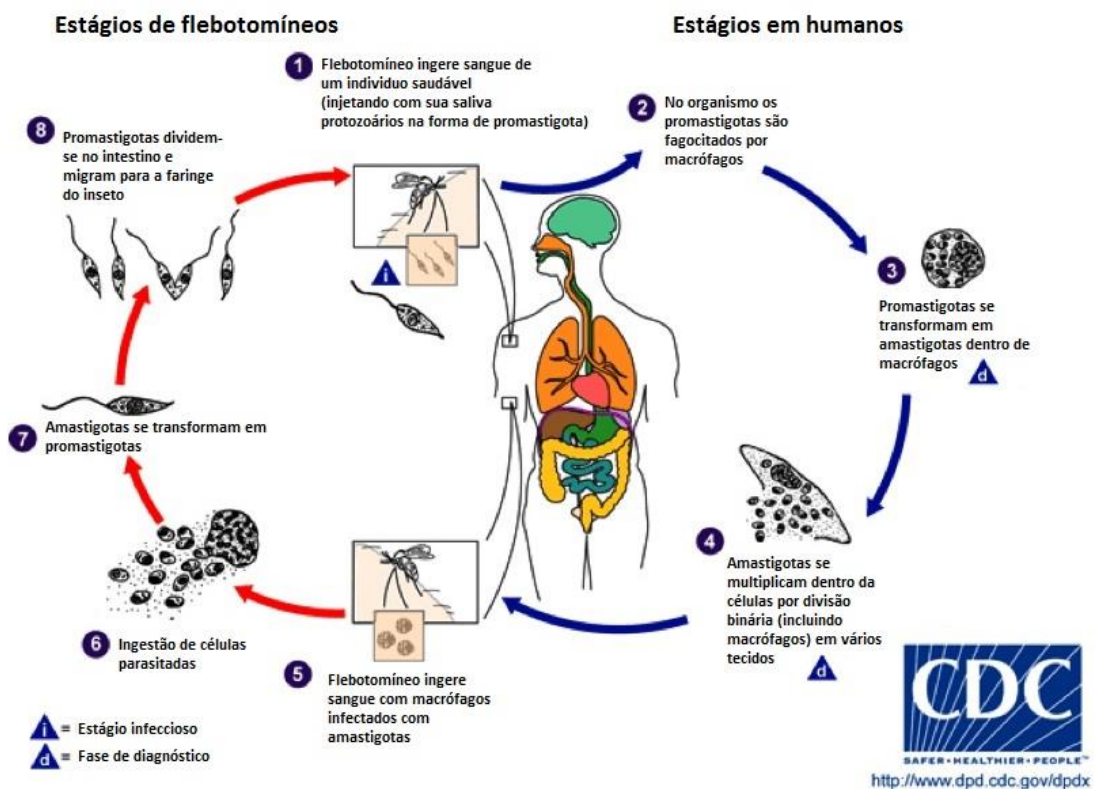


Figura 7: Ciclo de vida de *Leishmania* spp. (Fonte: Centers for Disease Control and Prevention/ CDC).

3.1.5. Hospedeiros

A grande variação genotípica das espécies de *Leishmania* possibilita a infecção de diversas espécies de hospedeiros, as quais são classificadas de acordo com as características epidemiológicas.

Os hospedeiros primários ou reservatórios, são aqueles que mantêm e transmitem o parasito, hospedeiros secundários são aqueles capazes de transmitir, porém não pode manter o parasito, e o hospedeiro acidental ou “*the end*” que usualmente não transmite o parasito (QUINNELL & COURTENAY, 2009).

O papel do ser humano como reservatório de *Leishmania* ganha importância quando ocorrem grandes surtos epidêmicos e nas estações chuvosas e quentes, quando a densidade populacional do vetor aumenta (ASHFORD, 1996). Embora seja relatado o caráter antropofílico de *Lu. longipalpis* (MISSAWA *et al.*, 2008), a proximidade de animais domésticos aos humanos pode ser uma proteção, pois os animais domésticos servem de fonte alternativa de alimentação para o flebotomíneo (BERN *et al.*, 2000; ALEXANDER *et al.*, 2002; SINGH *et al.*, 2010)

Os animais domésticos, principalmente os cães, foram tidos como participante do ciclo epidemiológico da zoonose (DEANE & DEANE, 1954; DEANE, 1958). Essa hipótese foi consolidada por diversos estudos que confirmaram *Canis familiares* (cão doméstico) como hospedeiros reservatório, inclusive atuando como elo de ligação entre o ciclo silvestre e domiciliar do parasito (AHFORD *et al.*, 1998; DEREURE *et al.*, 2003).

Porém, outros animais domésticos também podem apresentar um papel importante perante a epidemiologia da leishmaniose. Os animais domésticos como felinos, equinos, bovinos, suínos e caprinos são considerados coadjuvantes no ciclo epidemiológico das leishmanioses, pois atuam atraindo os vetores para o perímetro peridomiciliar. Estudos realizados em diversas regiões do mundo revelam que estes tiveram contato com o patógeno, e podem atuar em um papel secundário apenas atraindo os vetores para o peridomicílio (XIMENES *et al.*, 1999; MORAES-SILVA *et al.*, 2006).

O ciclo de transmissão da leishmaniose em animais silvestres ainda é pouco conhecido, visto as recentes pesquisas realizadas que tem demonstrado novos possíveis hospedeiros, necessitando um maior conhecimento sobre a participação

desses mamíferos no ciclo epidemiológico (QUINNELL & COURTENAY, 2009; WHO, 2014).

Diversos inquéritos epidemiológicos realizados no continente Americano têm relatados a presença de *Leishmania* spp. em mamíferos das ordens como Marsupialia, Cingulata, Pilosa, Rodentia, Primates, Carnivora e Chiroptera, as quais algumas ordens são consideradas como reservatório para essas zoonose (ROQUE & JANSEN, 2014).

Diversos critérios são utilizados para que se possa considerar um reservatório, assim tornando a definição do animal no ciclo biológico da doença complexa e particularmente difícil, uma vez que possa estar atuando como um dos vários tipos de hospedeiros expostos acima.

3.1.6. Características genômicas

Estudos recentes demonstram o número de cromossomos que as diversas espécies de *Leishmania* possuem. As espécies do novo mundo (*L. braziliensis* e *L. mexicana*) possuem entre 34 a 35 cromossomos, já as espécies do velho mundo (*L. major*, *L. infantum*), 36 cromossomos (SMITH et al., 2007). As espécies *L. major* e *L. infantum* possuem 33 megabase (Mb) e mais de 8.000 genes identificados (IVENS et al., 2005; PEACOCK et al., 2007)

Além do DNA nuclear os tripanossomatídeos possuem uma rede de DNA, descrita com cinetoplasto (kDNA) correspondendo entre 15% a 35% do DNA total celular. O cinetoplasto é uma organela circular com arranjos de cerca de 50 maxicírculos, possuindo de 20 a 35 mil pares de bases (pb), genes que codificam proteínas mitocondriais para o RNA ribossomal (rRNA), e uma rede de 10 a 20 mil minicírculos, constituídos por cerca de 500 a 2500pb (Figura 8) (SIMPSON, 1987; STURM E SIMPSON, 1990; BREWSTER et al., 1998; BREWSTER & BARKER, 2002).

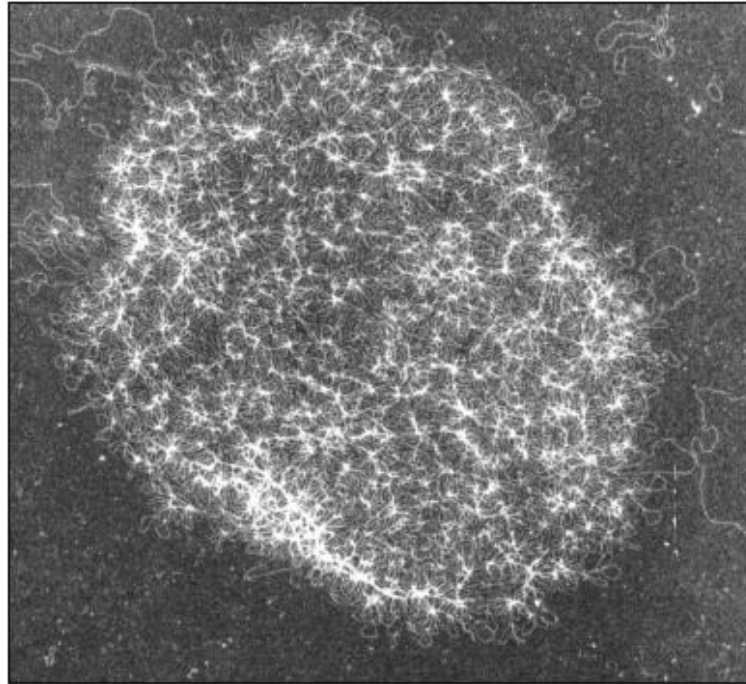


Figura 8: Micrografia eletrônica de cinetoplasto de *Leishmania* spp. composto por uma massa de maxicírculos e minicírculos. Fonte: BARKER (1989).

O cinetoplasto de *Leishmania* spp. possui entre 800 a 1200 pb, entre 600 a 680 bp correspondem a uma região variável e o restante (cerca de 100 a 200 pb) correspondem a uma região de sequências de nucleotídeos com padrão conservado (NOYES et al., 1998; MORALES et al., 2001). Essa região conservada de kDNA tem sido alvo de diversos trabalhos para diagnósticos de *Leishmania* spp. podendo ter uma detecção de alta sensibilidade por meio de ferramentas moleculares (YANG & ROTHMAN, 2004; PAIVA-CAVALCANTI et al., 2009).

O DNA ribossomal (rDNA) de *Leishmania* também possui um número de cópias, porém é inferior aos números de cópias do kDNA e essas regiões se localizam dentro do nucléolo. O genoma nuclear possui de 100 a 500 cópias do gene rDNA, além de várias unidades de transcrições. Uma dessas regiões é um espaçador não modificante interno, ITS-1 (*internal transcribed spacer*), também muito usado como alvo, pois permite a diferenciação entre espécies de *Leishmania* (VAN EYS et al., 1992; MEREDITH et al., 1993; LEMRANI et al., 2008).

Outro alvo que vem sendo utilizado recentemente para identificação de *Leishmania* spp. é o gene hsp70 de cópia única. A região hsp é codificadora para uma proteína de choque térmico, que tem importante papel na estabilização e degradação de outras proteínas, secreção, localização intracelular, entre outras funções (YOUNG, et al., 2004). Estudos demonstram uma região promissora podendo

identificar menos de um parasita na reação mesmo contendo o DNA do hospedeiro, conseguindo discriminar algumas espécies de *Leishmania* (ZAMPIERI, et al. 2016).

O G6PD (Glicose-6-Fosfato Desidrogenase) é um gene de cópia única, promissor para identificação de *Leishmania* spp. e recentemente está sendo utilizado em PCR em tempo real para quantificação de parasita. Primers derivados desse gene possuem uma alta especificidade e sensibilidade (CASTILHO, et al., 2008)

3.2. *Leishmania* spp. em Chiroptera

3.2.1. Histórico de identificação de *Leishmania* spp. em morcegos

Em meado da década de 70 houve o primeiro relato de *Leishmania* spp. em morcegos. Desde então trabalhos têm sido feitos em diversas partes do mundo, local de grande ocorrência de leishmaniose, a qual tem um importante papel na saúde pública. Porém, as relações parasita/hospedeiro ainda não foram esclarecidas até o momento e o papel desse mamífero na epidemiologia da doença ainda é incerto, ganhando apenas o título de possível hospedeiro.

Muitos estudos demonstram a presença do parasita em sangue e órgão de predileção de *Leishmania* spp. (MUTINGA, 1975; MORSY, et al., 1987; DE LIMA, et al., 2008; SAVANI, et al., 2010; SHAPIRO, et al., 2013; BERZUNZA-CRUZ, et al., 2015; DE OLIVEIRA, et al., 2015; KASSAHUN, et al., 2015).

O primeiro relato descrito na literatura científica do parasita *Leishmania* sp. em morcegos foi realizado no Quênia por Mutinga (1975), que demonstrou a presença de *L. donovani* por meio de microscopia de luz em 2,88% dos animais analisados. Mais de dez anos depois no Egito, Morsy et al. (1987), encontraram anticorpo anti-*Leishmania* em soro de sete morcegos.

Mais de duas décadas depois, De Lima et al. (2008) relataram a presença de *L. chagasi* em 9,09% (1/11) dos espécimes coletados na Venezuela, utilizando as técnicas de PCR convencional com primers para a regiões conservada de kDNA, hibridização por dot-blot com sonda para *L. chagasi*, análise com enzima de restrição e isolamento *in vitro* e *in vivo*.

Dois anos mais tarde em um estudo realizado com morcegos provenientes do Centro de Controle de Zoonose (CCZ) do Estado de São Paulo, Brasil, Savani et al.

(2010) encontraram DNA de *L. amazonensis* e *L. chagasi* em 3,2% dos animais, utilizando a técnica de PCR e *nested*-PCR.

Três anos depois no estado de Mato Grosso do Sul, Shapiro et al. (2013) identificaram a presença de *L. braziliensis* em 40% (2/5) dos morcegos oriundos das áreas urbana e rural. A identificação foi realizada por meio de PCR como alvo as regiões ITS-1 e de kDNA.

Recentemente, em estudo realizado em 22 cidades do México, Berzunza-Cruz et al. (2015) relataram 9,77% (41/420) de morcegos positivos para *L. mexicana* utilizando diversas técnicas para confirmação do diagnóstico. Para a realização da detecção do parasita foi utilizado a técnica de PCR e como alvos foram utilizados as regiões o de kDNA e 18S rRNA, cultura *in vitro* e *in vivo*.

Em 21 cidades do estado de São Paulo (Brasil), De Oliveira et al. (2015) identificaram *Leishmania* spp. em 23,9% (117/488) dos morcegos, sendo que 78,3% foram identificados como *L. infantum* e 17,4% para *L. amazonensis*. Ainda foi relatada coinfeção das duas espécies de *Leishmania* em único indivíduo (*Desmodus rotundus*). Neste estudo foram utilizadas as técnicas de PCR convencional e PCR quantitativo (qPCR) os alvos as regiões de kDNA e ITS-1.

No estudo realizado na Etiópia por Kassahum et al. (2015) também foram utilizadas as técnicas de PCR convencional e qPCR com alvos para as regiões de kDNA e ITS-1, detectando 4,9% (8/163) dos morcegos positivos para *Leishmania* spp. Duas dessas amostras foram amplificadas e sequenciadas utilizando um fragmento do gene ITS-1, obtendo a confirmação de duas espécies: *L. tropica* e *L. major*.

No estudo de Rezende et al (2017) foram utilizados as técnicas de PCR convencional e qPCR com alvos para as regiões de Kdna, obteve a presença de DNA de *Leishmania* spp. em 37,5% (30/80) dos animais. Desses 18 foram detectados com a presença de DNA de *L. infantum* por meio de qPCR.

Em suma, temos um total de nove trabalhos realizados e diversas técnicas utilizadas para investigação da relação dos morcegos com o protozoário *Leishmania* spp. Foram relatadas 56 espécies de morcegos com a presença de DNA de oito espécies identificadas *L. infantum*, *L. denovani*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. mexicana*, *L. tropica* e *L. major*, sendo que na grande maioria, foi possível a identificação ao nível de gênero, em cinco países diferentes e diversas cidades (Tabela 2).

Portanto estas investigações sugerem que os morcegos têm um papel importante na epidemiologia das leishmanioses. Acredita-se que eles possam fazer parte do ciclo epidemiológico desse parasita e serem responsáveis pela disseminação do agente causador da doença. Porém com estudos realizados até o momento não permitem confirmar o papel dos morcegos na epidemiologia das leishmanioses. Por essa razão, mais ensaios são necessários, a fim de compreender a relação entre *Leishmania* spp. e os morcegos.

Tabela 2: Compilado de pesquisas onde foi constatada a presença de *Leishmania* spp. em morcegos.

Autores	Espécies de morcegos	Espécies de <i>Leishmania</i>	Local	Metodologia	
MUTINGA (1975)	N.E.	<i>L. denovani</i>	Kenya	N.E.	E.
MORSY (1987)	N.E.	<i>Leishmania</i> spp.	Egito	sorologia	
DE LIMA et al (2008)	<i>Artibeus jamaicensis</i>	<i>L. infantum</i>	Venezuela	PCR/ In vitro/ In vivo/dot blot	
SAVANI et al. (2010)	<i>Artibeus planirostris</i> , <i>Cardioderma cor</i> , <i>Carollia perspicillata</i> , <i>Carollia sowelli</i> , <i>Choeroniscus godmani</i> , <i>Cynomops abrasus</i>	<i>L. infantum</i> / <i>L. amazonensis</i>	SP, Brasil	IFAT/ PCR	

SHAPIRO et al. (2013)	<i>Molossus molossus, Glossophaga soricina</i>	<i>Leishmania</i> spp, <i>L.(V.) braziliensis</i>	MS, Brasil	PCR, RFLP
BERZUNZA-CRUZ et al. (2015)	<i>Pteronotus personatus, Artibeus jamaicensis, Artibeus lituratus, Dermanura phaeotis, Carollia sowelli, Choeroniscus godmani, Desmodus rotundus, Glossophaga commissarisi, Glossophaga soricina, Leptonycteris curasoae, Phyllostomus discolor, Sturnira lilium, Sturnira ludovici, Tadarida brasiliensis*</i>	<i>L. (Leishmania) mexicana</i>	México	PCR, <i>In Vitro*</i> , <i>In Vivo*</i>

OLIVEIRA et al (2015)	<i>Artibeus lituratus, Artibeus planirostris, Carollia perspicillata, Cynomops abrasus, Cynomops planirostris, Desmodus rotundus, Eptesicus furinalis, Eumops glaucinus, Glossophaga soricina, Lasiurus blossevillii, Lasiurus ega, Molossus molossus, Molossus rufus, Myotis nigricans, Noctilio albiventris, Phyllostomus hastatus, Platyrrhinus lineatus</i>	<i>Leishmania</i> spp., <i>L. amazonensis</i> e <i>L. infantum</i>	SP, Brasil	Nested PCR, RFLP, qPCR.
KASSAHUN et al (2015)	<i>Cardioderma cor, Glauconycteris variegata, Laephotis wintoni, Micropteropus pusillus, Miniopterus arenarius, Miniopterus africanus, Mops condylurus, Myotis scotti, Myotis tricolor, Neoromicia somalica, Neoromicia guineenses, Neoromicia nana, Nycteris hispida, Nycticeinops schlieffenii, Otomops martiensseni, Pipistrellus hesperidus, Pipistrellus rusticus, Rhinolophus fumigatus, Scotoecus hirundo, Scotophilus colias, Stenonycteris lanosus, Tadarida sp., Triaenops afer.</i>	<i>Leishmania</i> spp., <i>L. tropica</i> , <i>L. major</i>	Etiópia	PCR
DA COSTA et al (2015)	<i>Pteronotus parnellii</i>	<i>L. infantum</i>	MA, Brasil	PCR e sequenciament

0

DE REZENDE et al (2017)	<i>Artibeus planirostris</i> , <i>Artibeus lituratus</i> , <i>Platyrrhinus lineatus</i> , <i>Carollia perspicillata</i> , <i>Glossophaga soricina</i> , <i>Platyrrhinus helleri</i> , <i>Phyllostomus discolor</i>	<i>Leishmania spp. L. infantum</i>	MS, Brasil	PCR e qPCR
----------------------------	--	------------------------------------	------------	------------

N.E.: Não especificado; IFAT: teste de imunofluorescência anticorpo; PCR: reação em cadeia da polimerase; qPCR: reação em cadeia da polimerase quantitativo; RFLP: fragmento de restrição por polimorfismo.

2.2. Fragmentação do cerrado e a quiropteroфаuna

O Brasil é composto por seis biomas, sendo eles a Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal. Cada um desses ambientes é representado por diversas peculiaridades, possuindo diferentes faunas e vegetação (MMA, 2002). O Cerrado é um bioma que possui fitofisionomias do tipo campestres, savânicas e florestais (EITEN, 1972). Esse bioma ocupa quase 25% do território brasileiro, com aproximadamente dois milhões de km², perdendo em tamanho apenas para o bioma Amazônico (Figura 9) (IBGE, 2004).

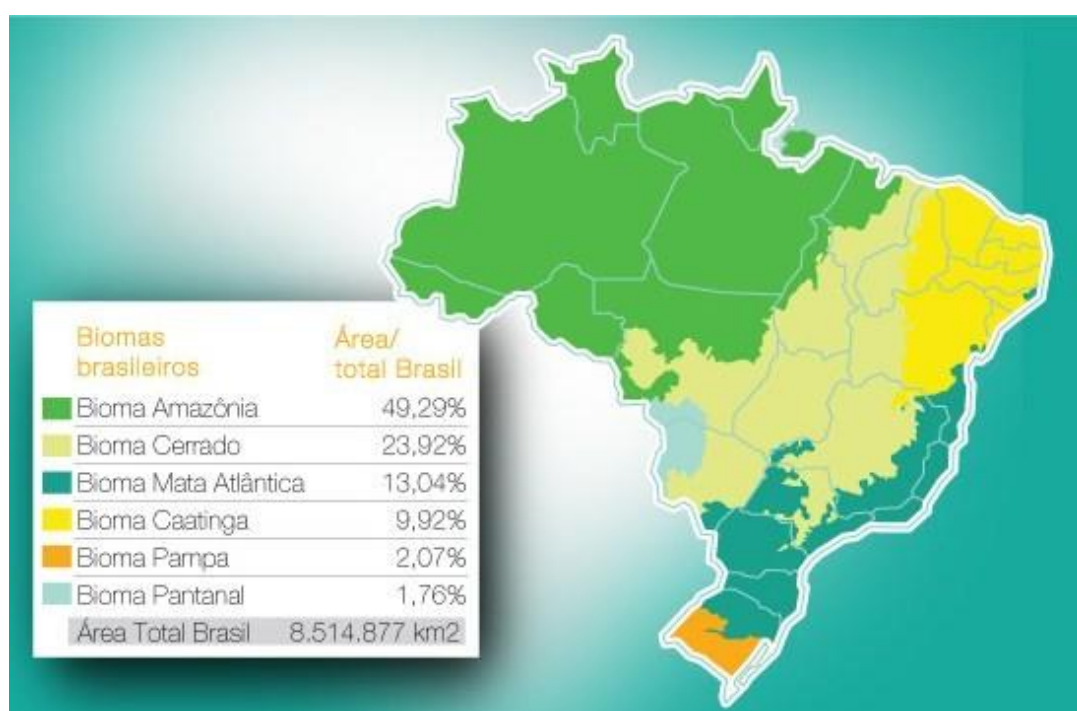


Figura 9: Biomas Brasileiros (IBGE, 2010).

O Cerrado apresenta sazonalidade de período seco (abril a setembro) e chuvoso (outubro a março) com precipitação média anual de 1500 mm, as temperaturas são geralmente amenas, variando de 22°C a 27°C (KLINK & MACHADO, 2005). O relevo tem uma ampla variação, que varia de 300 a 1600 metros acima do nível do mar (RIBEIRO & WALTER, 1998). Possui solo relativamente pobre para agricultura, porém com altas concentrações de alumínio e são de características ácidas (HARIDASAN, 1982; KLINK & MACHADO, 2005)

O Cerrado ocorre nos estados de Minas Gerais, Bahia, Maranhão, Piauí, Rondônia, Goiás, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Paraná, São Paulo e Distrito Federal, além de pequenos fragmentos nos estados de Amapá, Roraima e

Amazonas. No bioma encontram-se as nascentes de três grandes bacias hidrográficas da América do Sul, a bacia do São Francisco, Amazônica/Tocantins, e Prata, gerando assim uma alta disponibilidade de recursos hídricos para essa região (LIMA & SILVA, 2011).

Porém as mudanças na conformação do Cerrado aumentam de forma acelerada. Essas mudanças podem ser de origens naturais, por eventos catastróficos, como inundações, deslizamentos de terra, quedas de árvores ou até mesmo queimada natural (PEARSON & DAWSON, 2003; GOTTSBERGER & SILBERBAUER-GOTTSBERGER, 2006).

Também ocorrem por fatores antrópicos, como o crescimento do perímetro urbano, agropecuária, mineração entre outras práticas que necessitam da mudança da paisagem natural. As mudanças são comuns principalmente quando relacionadas à agropecuária (KLINK & MACHADO, 2005) e junto a ela ocorre a redução da biodiversidade nessa área (FRISHKOFF et al., 2014).

Essas conversões dos habitats ocasionam diversas perdas no bioma modificado os padrões de temperatura, precipitação (BUSTAMANTE et al., 2012). No Cerrado, a fragmentação chega à perda de 1.400.000 hectares anualmente, sendo considerada a última fronteira agrícola do planeta (BORLAUG, 2002; MACHADO et al., 2004; MMA, 2002). Um estudo realizado por Machado et al. 2005 mostrou por meio de imagens do satélite MODIS que 55% do bioma foi alterado por ação antropológica.

As alterações nesse bioma assim como em qualquer outro habitat, sendo elas por eventos antrópicos ou naturais, afetam positivamente ou negativamente na fauna local, principalmente dos mamíferos presentes nessas regiões (MARTÍNEZ MOTA et al., 2008).

A classe Mammalia é representada por 701 espécies inseridas em 243 gêneros, 50 famílias e 12 ordens no Brasil (PAGLIA et al., 2012). Somente no Cerrado estima-se que ocorram 200 espécies de mamíferos, e em sua maioria, a fauna se encontra em matas de galeria e fragmentos florestais (REDFORD & FONSECA, 1986; AGUIAR, 2000, MARINHO-FILHO et al., 2002).

Dentre as 12 ordens da classe Mammalia, a ordem Chiroptera representa aproximadamente 25% da mastofauna, em que são documentadas nove famílias, sendo elas, Emballonuridae, Furipteridae, Molossidae, Mormoopidae, Natalidae, Noctilionidae, Phyllostomidae, Thyropteridae e Vespertilionidae, com 68 gêneros e 178 espécies (NOGUEIRA et al., 2014). As nove famílias encontradas no Cerrado

constituem 42 gêneros e 103 espécies de morcegos, as quais correspondem a 62% das espécies de morcegos do Brasil (MARINHO-FILHO, 1996; AGUIAR & ZORTÉA, 2008; PAGLIA et al., 2012; REIS et al., 2013).

Os morcegos têm mostrado grande irradiação adaptativa desde seu surgimento, visto a variedade de guildas alimentares observadas para o grupo, como: onívora, carnívora, frutívora, piscívora, insetívora e hematófagos (REIS et al., 2007). Os quirópteros possuem importantes papéis nos biomas como a polinização, a dispersão de sementes, além de se alimentar de artrópodes participando da regulação natural desses invertebrados (KALKO, 1998; REIS et al., 2007).

Vários estudos têm avaliado os resultados da urbanização perante as populações de morcegos, os quais comprovaram alterações quanto aos fatores relacionados aos níveis de atividade, diversidade, composição da comunidade e problemas reprodutivos (HOURIGAN et al., 2006; JOHNSON et al., 2008; OPREA et al., 2009; FERREIRA et al., 2010; LINTOTT et al., 2014).

A destruição das florestas onde essas espécies ocorrem, tem forçado esses animais a procurar novas áreas, podendo ser fragmentos florestais, parques ecológicos ou até mesmo edificações. Essas regiões urbanas oferecem condições únicas de recursos levando o aumento da incidência de colônias de morcegos instaladas no perímetro urbano, demonstrando a aptidão dos morcegos na obtenção de novos ambientes (SAZIMA et al., 1994; BREDT et al., 1998; ESBÉRARD, 2003; LIMA & REIS, 2004; REIS et al., 2007; LIMA et al., 2008; OPREA et al., 2009). Este novo habitat, o ambiente urbano, faz com que ocorra associação dos quirópteros com diversos tipos de patógenos, como bactérias, fungos, vírus e protozoários.

Um dos patógenos mais descritos e importantes que infectam os morcegos são os vírus, sendo relatado mais de 200 tipos virais isolados dos morcegos, representando 27 famílias de vírus (CALISHER, 2015).

Vale a pena ressaltar que um dos vírus mais importantes associado aos morcegos é o da raiva, sendo a principal gênero *Lyssavirus* (MORATELLI & CALISHER, 2015). Inúmeros estudos também demonstram a presença de diversas bactérias como *Bartonella* spp., *Mycoplasma* spp. (MASCARELLI et al., 2014), fungos *Histoplasma capsulatum*, *Pneumocystis* spp., *Coccidioides posadasii* entre outros (CORDEIRO et al., 2012; BROOK & DOBSON, 2015).

Atualmente, diversos trabalhos têm relatado a presença de parasitos em morcegos, como *Babesia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma* spp. e

Leishmania spp. (COTTONTAIL et al., 2014; MCALLISTER et al., 2014; ROQUE & JANSEN, 2014).

3.2.3. Parâmetros para considerar um reservatório

Para afirmar que os morcegos ou qualquer outro animal silvestre fazem ou não parte do ciclo epidemiológico da leishmaniose é preciso responder alguns critérios, que caracterizam as espécies reservatórias (WHO, 2014; BERZUNZA-CRUZ et al., 2015), sendo estes: (a) a viabilidade e sobrevivência do protozoário no possível hospedeiro e que a infecção permaneça em tempo hábil para que haja o repasso do vetor transmissor; (b) Disponibilidade do parasita na pele e, ou em sangue periférico com uma quantidade suficiente para que haja infecção dos vetores; (c) as espécies encontradas no possível hospedeiro devem ser as mesmas espécies as quais são patogênicas ao homem; (d) parasitemia persistente na população com prevalência superior a 20% da amostra estudada; (e) disponibilidade do vetor e do possível hospedeiro no mesmo espaço físico geográfico e temporal (ASHFORD, 1997; HAYDON et al., 1997; HAYDON et al., 2002; JANSEN & ROQUE, 2010; WHO, 2014).

Estudos realizados anteriormente respondem a alguns desses critérios. Nos estudos de Shapiro et al. (2013) e Berzunza-Cruz et al., (2015) foram relatadas a presença de lesões cutâneas típicas das espécies encontradas *L. braziliensis* e *L. mexicana* nos morcegos. Consequentemente, essas lesões cutâneas podem disponibilizar maior quantidade do parasita em células do sistema mononuclear fagocitário na pele e no sangue periférico desses animais. Os mesmos autores tiveram ainda em sua amostragem uma prevalência de morcegos infectados superior a 20%, ambos os estudos foram realizados em áreas endêmicas para leishmaniose.

Lampo et al. (2000) por meio de experimento laboratorial demonstraram que *Lu. Longipalpis* realizaram repasto sanguíneo em quatro espécies de morcegos, *Pteronotus parnellii* (Mormoopidae), *Glossophaga longirostris* (Phyllostomidae), *Carollia perspicillata* (Phyllostomidae) e *Myotis oxyotus* (Vespertilionidae). Além disso, trabalhos recentes demonstram flebotomíneos infectados com *Leishmania* spp. em regiões urbanas, periurbanas e áreas endêmicas de leishmaniose (PITA-PEREIRA, et al., 2008; SILVA, et al., 2008; SAVANI, et al., 2009; ACARDI, et al.,

2010; CUNHA, et al., 2014). Não podemos descartar a probabilidade dessas áreas com ocorrência de *Lu. longipalpis* infectadas ou não, a coexistência da quiropteroфаuna, pois já foi muito bem descrita à presença desses mamíferos em áreas urbanas e periurbanas (PULCHÉRIO-LEITE, et al., 1999; DEUS, et al., 2003; FERREIRA, et al., 2010).

Evidências crescentes intitulam os morcegos como possíveis reservatórios de *Leishmania*, e já é sabido perante a comunidade científica que esses mamíferos são considerados reservatórios verdadeiros dos outros Tripanossomatidae (JANSEN & ROQUE, 2010), como as espécies *Trypanosoma cruzi*, *T. rangeli*, *T. cruzi marinkellei*, *T. dionisii*, *T. evansi* (REY, et al., 2001; LISBOA, et al., 2008; DA SILVA, et al., 2010; RAMÍREZ, et al., 2013; LIMA, et al., 2015).

Nesse contexto, vale ressaltar que a infecção por de *T. cruzi* também pode ocorrer por meio da ingestão do vetor infectado (BARRETO-DE-ALBUQUERQUE, et al., 2015). Visto que temos morcegos que se alimentam de insetos (insetívoras), devemos cogitar a possibilidade dos morcegos insetívoros e onívoros a infecção transversal e não somente de *T. cruzi*, mas também de *Leishmania* sp. já que esses mamíferos possui em sua dieta insetos aéreos e outros artrópodes (WILSON et al., 1973; FENTON, 1992; HILL & SMITH, 1992).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACARDI, S. A., LIOTTA, D. J., SANTINI, M. S., ROMAGOSA, C. M., SALOMÓN, O. D. Detection of *Leishmania infantum* in naturally infected *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and *Canis familiaris* in Misiones, Argentina: the first report of a PCR-RFLP and sequencing-based confirmation assay. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 105: 796-799, 2010.
- AGUIAR, L. M. S. Comunidades de morcegos do Cerrado no Brasil Central. **Departamento de Ecologia**. Universidade de Brasília, Brasília, P.162. 2000.
- AGUIAR, L. M. S. E ZORTÉA, M. A diversidade de morcegos conhecida para o Cerrado. In Simpósio Nacional Cerrado & Simpósio Internacional Savanas Tropicais, Brasília, DF. **Desafios e estratégias para o equilíbrio entre sociedade, agronegócio e recursos naturais: anais, Embrapa Cerrados**, Planaltina, DF. 2008.
- ALEXANDER, B., CARVALHO, R. L., MCCALLUM, H. PEREIRA, M. H. Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, 8(12):1480-1485, 2002.
- ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J. ET AL. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **Plos One.**, v.7, N.5, 2012.
- ASHFORD, R. W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. **Clin.Dermatol.**,v.14, p.523–532, 1996.
- ASHFORD, R. W. What it takes to be a reservoir host. **Belgian Journal of Zoology.**, v.127, p.85–90, 1997.
- BARRETO-DE-ALBUQUERQUE, J.; SILVA-DOS-SANTOS, D.; PÉREZ, A. R.; BERBERT, L.R.; SANTANA-VAN-VLIET, E.; FARIAS-DE-OLIVEIRA, D. A.; MOREIRA, O. C.; ROGGERO, E.; CARVALHO-PINTO, C. E.; JURBERG, J.; COTTA-DE-ALMEIDA, V.; BOTTASSO, O.; SAVINO, W.; MEIS, J. Trypanosoma

cruzi Infection through the Oral Route Promotes a Severe Infection in Mice: New Disease Form from an Old Infection?. **Plos Negl. Trop. Dis.**, v.9, n.6, 2015.

BASANO, S. A. E CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Rev. bras. epidemiol.**, v.7 São Paulo, 2004.

BATISTA, P.M. **Coordenadoria Estadual de vigilância epidemiológica, Secretaria do Estado de saúde de Mato Grosso do Sul**. 2012

BERN, C.; HERNANDEZ, B.; LOPEZ, M. B.; ARROWOOD, M. J.; DE MERIDA, A. M.; KLEIN, R.E. The contrasting epidemiology of *Cytospora* and *Cryptosporidium* among outpatients in Guatemala. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.63, p.231-235, 2000.

BERZUNZA-CRUZ, M.; RODRÍGUEZ-MORENO, Á.; GUTIÉRREZ-GRANADOS, G.; GONZÁLEZ-SALAZAR, C.; STEPHENS, C. R.; HIDALGO-MIHART, M.; MARINA, C. F.; REBOLLAR-TÉLLEZ, E. A.; BAILÓN-MARTÍNEZ, D., BALCELLS, C. D.; IBARRA-CERDEÑA, C. N.; SÁNCHEZ-CORDERO, V.; BECKER, I. *Leishmania (L.) mexicana* infected bats in Mexico: novel potential reservoirs. **Plos Negl. Trop. Dis.**, v.28, 2015.

BORLAUG, N.E. Feeding a world of 10 billion people: the miracle ahead. In **Global warming and other eco-myths** (R. Bailey, ed.). Competitive Enterprise Institute, Roseville, p.221-228, 2002.

BRAZIL, R. P.; BRAZIL B. G.; Biologia de flebotomíneos do Brasil, In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. (Org.). **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, cap. 4, p.257-274 2003.

BREDT, A.; ARAUJO, F. A. A.; CAETANO, JR. J.; RODRIGUES, M. G. R.; YOSGIZAWA, M.; SILVA, M. M. S.; HARMANI, N. M. S.; MASSUNAGA, P. N. T.; BÜRER, S. P.; PORTO, V. A. R.; UIEDA, W. Morcegos em áreas urbanas e rurais: Manual de manejo e controle. **Fundação Nacional da Saúde**, Brasília, Brasil, 117. 1998.

BREWSTER, R.; LEE, J.; RUIZ I ALTABA A. Gli/Zic factors pattern the neural plate by defining domains of cell differentiation. **Nature**, v.393, p.579–583, 1998.

Brewster, S; Barker, D. Analysis of minicircle classes in *Leishmania (Viannia)* species. **Trans. R. Soc.Trop. Med. Hyg.**,v.96, p.S55-S63. 2002.

BRITO D.; OLIVEIRA, L. C.; OPREA, M.; MELLO, M. A. R. An overview of Brazilian mammalogy: trends, biases and future directions. **Zoologia**, v.26, n.1, p.67-73, 2009.

BROOK, C. E. E DOBSON, A. P. Bats as 'special' reservoirs for emerging zoonotic pathogens. **Trends Microbiol.**, v.23, n.3, p.172-80, 2015.

BUSTAMANTE, M. M. C. NARDOTO, G. B.; PINTO, A.S.; RESENDE, J. C. F.; TAKAHASHI, F. S. C; VIEIRA, L. C. G. Potential impacts of climate change on

biogeochemical functioning of Cerrado ecosystems. **Braz. J. Biol.**, v.72, n.3, p. 655-671, 2012.

CALISHER, C. H. Viruses in bats: a historic review. In Wang, **Bats and viruses: from pathogen discovery to host genomics**, John Wiley & Sons, New York. 2015.

CASTILHO, T. M.; CAMARGO, L. M.; MCMAHON-PRATT, D.; SHAW, J. J.; FLOETER-WINTER, L. M. A real-time polymerase chain reaction assay for the identification and quantification of American *Leishmania* species on the basis of glucose-6-phosphate dehydrogenase. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 78:122–132 2008.

CHANCE, M. L. The biochemical and immunotaxonomy of *Leishmania*. In: Chang/Gray (eds) **Elsevier Science Publishing Company**, 93-110. 1985.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R. W.; et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?. **Nat. Ver. Microbiol.** v.5, n.11, p.873- 82. 2007.

CORDEIRO, R. A.; CASTRO E SILVA, K. R.; BRILHANTE, R. S. N; MOURA, F. B. P; DUARTE, N. F. H.; MARQUES, F. J. F.; CORDEIRO, R. A.; MOREIRA FILHO, R. E.; ARAÚJO, R. W. B.; BANDEIRA, T. J. P. G.; ROCHA, M. F. G.; SIDRIM, J. J. C. *Coccidio idesposadasii* infection in bats, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.18, n.4, p.668-670. 2012.

COTTONTAIL, V. M.; KALKO, E. K. V.; COTTONTAIL, I.; WELLINGHAUSEN, N.; TSCHAPKA, M.; PERKINS, S. L.; PINTO, C. M. High Local Diversity of *Trypanosoma* in a Common Bat Species, and Implications for the Biogeography and Taxonomy of the *T. cruzi* Clade. **Plos One**, v.9, n.9. 2014.

CUNHA, R. C.; ANDREOTTI R.; COMINETTI, M. C.; SILVA, E. A. Detecção de *Leishmania infantum* em *Lutzomyia longipalpis* capturados em Campo Grande, MS. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 269-273, 2014.

DA COSTA, A. P., COSTA, F. B., SOARES, H. S., RAMIREZ, D. G., MESQUITA, E. T., GENNARI, S. M., MARCILI, A. *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania infantum chagasi* infection in wild mammals from maranhão state, Brazil. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, 15(11):656-66, 2015.

Da SILVA, A. S. I., Tochetto, C., Zanette, R. A., Pierezan, F., Rissi, D. R., Santurio, J. M., Monteiro, S. G. Aceturato de diminazeno e dipropionato de imidocarb no controle de infecção por *Trypanosoma evansi* em *Rattus norvegicus* infectados experimentalmente. **Ciência Rural**, v.38, n.5, p.1357-1362, 2008.

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 north eastern Venezuela. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.103, n.4, p.412–414, 2008.

DE OLIVEIRA, E. F., OSHIRO, E. T., FERNANDES, W. S., FERREIRA, A. M., DE OLIVEIRA, A. G., GALATI, E. A. Vector Competence of *Lutzomyia cruzi* naturally demonstrated for *Leishmania infantum* and suspected for *Leishmania amazonensis*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 11;96(1):178-181. 2017b.

DE OLIVEIRA, E. F., OSHIRO, E. T., FERNANDES, W. S., MURAT, P. G., MEDEIROS, M. J., SOUZA, A. I., OLIVEIRA, A. G., GALATI, E. A. Experimental infection and transmission of *Leishmania* by *Lutzomyia cruzi* (Diptera: Psychodidae): Aspects of the ecology of parasite-vector interactions. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 24;11(2), 2017a.

DE OLIVEIRA, F. M.; COSTA, L. H.; DE BARROS, T. L.; ITO, P. K.; COLOMBO, F. A.; DE CARVALHO, C.; PEDRO, W. A.; QUEIROZ, L. H.; NUNES, C. M. First detection of *Leishmania* spp. DNA in Brazilian bats captured strictly in urban areas. **Acta Trop.**, v.150, p. 176-81, 2015.

DE REZENDE, M. B., HERRERA, H. M., CARVALHO, C. M., ANJOS, E. A. C., RAMOS, C. A., DE ARAÚJO, F. R., TORRES, J. M., DE OLIVEIRA, C. E. Detection of *Leishmania* spp. in bats from an area of Brazil endemic for visceral leishmaniasis. **Transbound Emerg. Dis.**, 2017.

DEANE, L. M., Epidemiologia e profilaxia do calazar americano. **Rev. Bras. de Malariologia e Doenças Tropicais**, v.10, p.431-450. 1958.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Encontro de leishmanias nas vísceras e na pele de uma raposa em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral. **O Hospital**, v.45, p.419-421, 1954.

DEREURE, J.; EL-SAFI, S. H.; BUCHETON, B.; BONI, M.; KHEIR, M. M.; DAVOUST, B.; PRATLONG, F.; FEUGIER, E.; LAMBERT, M.; DESSEIN, A.; DEDET, J. P. Visceral leishmaniasis in eastern Sudan: parasite identification in humans and dogs; host-parasite relationships. **Microbes and Infection**, v.5, p.1103-1108. 2003.

DEUS, G. T.; BECER, M.; NAVARRO, I. T. Diagnóstico de raiva em morcegos não hematófagos na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Centro Oeste do Brasil: descrição de caso. **Semina: Ciências Agrárias**, v.24, p.171-176. 2003.

EITEN, G.. The cerrado vegetation of Brazil. **Botanical Review**, v.38, n. 2, p.201-341. 1972

ESBÉRARD, C. E. L. Diversidade de morcegos em uma área de Mata Atlântica regenerada no sudeste do Brasil (Mammalia: Chiroptera). **Revista Brasileira de Zoociências**, v. 5, n.2, p.189-204. 2003.

FENTON, M. B.; ACHARYA, L.; AUDET, D.; HICKEY, M. B. C.; MERRIMAN, C.; OBRIST, M. K.; SYME, D. M.; ADKINS, B. Phyllostomid bats (Chiroptera:

- Phyllostomidae) as indicators of habitat disruption in the Neotropics. **Biotropica**, v.24, n.3, p.440-446. 1992.
- FERREIRA, C. M. M.; FISCHER, E.; PULCHÉRIO-LEITE, A. Bat fauna in urban remnants of Cerrado in Campo Grande, Mato Grosso do Sul. **Biota Neotrop.**, v.10, n.3. 2010.
- FERRO, C.; CARDENAS, E.; CORREDOR, D.; MORALES, A.; MUNSTERMANN, L. E. Life cycle and fecundity analysis of *Lutzomyia shannoni* (Dyar) (Diptera: Psychodidae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 93, n. 2, p. 195- 199, 1998.
- FORATTINI, O. P.; RABELLOI, E. X.; SERRAII, O. P.; COTRIMI, M. D.; GALATII, E. A. B.; BARATAI, J. M. S. Observações sobre a transmissão de leishmaniose tegumentar no Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Saúde públ.**, n.10, p. 31-43. 1976.
- GONTIJO, B.; CARVALHO M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.36, p.71-80, 2003.
- GOTTSBERGER, G. E SILBERBAUER-GOTTSBERGER, I. Life in the Cerrado: a South American Tropical Seasonal Vegetation, **Pollination and seed dispersal. Vol. II.** 2006.
- HANDMAN, E.; BULLEN, D. V. R. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. **Trends Parasitol.**v.18, p.332–334. 2002.
- HARIDASAN, M. Aluminium accumulation by some cerrado native species of central Brazil. **Plant and Soil**, v.65, p.265-273. 1982.
- HAYDON, D.T.; CLEAVELAND, S.; TAYLOR, L. H.; LAURENSEN, M. K. IDENTIFYING reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. **Emerg. Infect. Dis.**, v.8, p.1468-1473. 2002.
- HAYDON, G. H.; JARVIS, L. M.; SIMPSON, K. J.; HAYES, P. C.; Simmonds, P. The clinical significance of the detection of hepatitis GBV-C RNA in the serum of patients with fulminant, presumed viral, hepatitis. **Journal of Viral Hepatitis**, v.4, p.45–49. 1997.
- HILL, J.; SMITH, J. **Bats: A Natural History. United States of America:** University of Texas Press. 1992.
- HOIRIGAN, C.L.; JOHNSON, C.; ROBSON, S.K.A. The structure of a microbat community in relation to gradients of environmental variation in a tropical urban area. **Urban Ecosyst.**,v.9, p.67-82, 2006
- HOWARD, M. K.; SAYERS, G.; MILES, M. A. *Leishmania donovani* metacyclic promastigotes: transformation in vitro, lectin agglutination, complement resistance, and infectivity. **Experimental Parasitology**, v.64, p.147–156, 1987;

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Mapa de Biomas do Brasil-2004**. Disponível em: <[ftp://ftp.ibge.gov.br/ Cartas_e_Mapas/Mapas_Murais/](ftp://ftp.ibge.gov.br/Cartas_e_Mapas/Mapas_Murais/)>. Acesso em: abril de 2016.

IVENS, A. C.; PEACOCK, C. S.; WORTHEY, E. A.; MURPHY, L.; AGGARWAL, G.; BERRIMAN, M.; SISK, E.; RAJANDREAM, M. A.; ADLEM, E.; AERT, R.; ANUPAMA, A.; APOSTOLOU, Z.; ATTIPOE, P.; BASON, N.; BAUSER, C.; BECK, A.; BEVERLEY, S. M.; BIANCHETTIN, G.; BORZYM, K.; BOTHE, G.; BRUSCHI, C. V.; COLLINS, M.; CADAG, E.; CIARLONI, L.; CLAYTON, C.; COULSON, R. M. R.; CRONIN, A.; CRUZ, A. K.; DAVIES, R. M.; GAUDENZI, J. D.; DOBSON, D. E.; DUESTERHOEFT, A.; FAZELINA, G.; FOSKER, N.; FRASCH AC, FRASER A, FUCHS M, GABEL C, GOBLE A, GOFFEAU A, HARRIS D, HERTZ-FOWLER C, HILBERT H, HORN D, HUANG Y, KLAGES S, KNIGHTS A, KUBE M, LARKE N, LITVIN L, LORD A, LOUIE L, MARRA M, MASUY D, MATTHEWS K, MICHAELI S, MOTTRAM JC, MÜLLER-AUER S, MUNDEN H, NELSON S, NORBERTCZAK H, OLIVER K, O'NEIL S, PENTONY M, POHL TM, PRICE C, PURNELLE B, QUAIL MA, RABBINOWITSCH E, REINHARDT R, RIEGER M, RINTA J, ROBBERN J, ROBERTSON L, RUIZ JC, RUTTER S, SAUNDERS D, SCHÄFER M, SCHEIN J, SCHWARTZ DC, SEEGER K, SEYLER A, SHARP S, SHIN H, SIVAM D, SQUARES R, SQUARES S, TOSATO V, VOGT C, VOLCKAERT G, WAMBUTT R, WARREN T, WEDLER H, WOODWARD J, ZHOU S, ZIMMERMANN W, SMITH DF, BLACKWELL JM, STUART JD, BARRELL B, Myler The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. **Science**, v.309, p.436-442, 2005.

Jansen, A. M., Roque A. L. R. Domestic and wild mammalian reservoirs. J. Telleria, M. Tibyarenc (Eds.), American Trypanosomiasis – Chagas Disease (1st ed.), **Elsevier**, London, pp. 249–276, 2010.

JOHNSON, J. S.; KISER, J. D.; WATROUS, K.; PETERSON, T. S. Day-roosts of male and females eastern small-footed myotis *Myotis leibii* in the mid-Atlantic Ridge and valley region of West Virginia. **Proceedings of the 38th North American Bat Research Symposium**. Scranton, Pennsylvania. 2008.

KALKO, E. K. V. Organization and diversity of tropical bat communities through space and time. **Zoology**, v.101, p.281-297, 1998.

KASSAHUN, A.; SADLOVA, J.; BENDA, P.; KOSTALOVA, T.; WARBURG, A.; HAILU, A.; BANETH, G.; VOLF, P.; VOTYPKA, J. Natural infection of bats with *Leishmania* in Ethiopia. **Acta. Trop.**, v.150, p.166-70, 2015.

KATO, H.; KATO, H.; ITO, Y.; AKAHANE, T.; IZUMIDA, S.; YOKOYAMA, T.; KAJI, C.; ARAKAWA, Y. Typing of *Clostridium difficile* isolates endemic in Japan by sequencing of *slpA* and its application to direct typing. **J. Med. Microbiol.**, v.59, p.556–562, 2010.

KILLICK-KENDRICK, R. The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. **Ann Parasitol Hum Comp.** v.65, n.1, p. 37- 42, 1990.

KLINK, C. A.; e MACHADO, R. B. Conservation of the brazilian cerrado. **Conservation Biology**, v.19, p.707-713, 2005.

LAINSON, R., SHAW, J. J. New World Leishmaniasis - the neotropical *Leishmania* species. In: COX, F. E. G., KREIER, J. P., WAKELIN, D. (org.). **Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections**. London: Arnold, p. 313-49. 2005.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R, editors. **The leishmaniasis in biology and medicine**. London: Academic Press; p. 12-120. 1987.

LAMPO, M.; FELICIANGELI, M. D.; MARQUEZ, L. M.; BASTIDAS, C.; LAU, P. A possible role of bats as a blood source for the *Leishmania* vector *Lutzomyia longipalpis* *Leishmania* (Viannia). **J. Clin. Microbiol.** v.40, p.601-606, 2000.

LEMRANI, M.; HAMDY, S.; LAAMRANI, A.; HASSA, M. Detection of *Leishmania* in skin biopsies. **J. Infect. Developing Countries**, v.3, p.115-122, 2008.

LIMA H.; RODRÍGUEZ N.; BARRIOS, M.; ÁVILA, A.; CAÑIZALES, I.; GUTIÉRREZ, S. Isolation and molecular identification of *Leishmania chagasi* from a bat (*Carollia perspicillata*) in northeastern Venezuela. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**.v.103, p.412-41, 2008.

LIMA, I. P.; e REIS, N.R. The availability of Piperaceae and the search for this resource by *Carollia perspicillata* (Linnaeus) (Chiroptera, Phyllostomidae, Carollinae) in Parque Municipal Arthur Thomas, Londrina, Paraná, Brazil. **Rev. Bras. Zool.** v.21, p.371- 377, 2004.

LIMA, J. E. F. W., SILVA, E. M. **Análise da situação dos recursos hídricos do Cerrado com base na importância econômica e socioambiental de suas águas**. 2008.

Disponível em
<http://www.cpac.embrapa.br/publicacoes/search_pbl/1?q=Recurso%20h%C3%ADdrico

LIMA, J. E. F. W.; SILVA, E. M. DA. Recursos hídricos do bioma Cerrado. In: Sano, S.M.; Almeida, S.P. De; Ribeiro, J.F. (Ed.). **Cerrado: ecologia e flora**. 2.ed. Planaltina: Embrapa Cerrados; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, v.1, p.89-106. 2008.

LIMA, M. M.; CARVALHO-COSTA, F. A.; TOMA, H. K.; BORGES-PEREIRA, J.; OLIVEIRA, T. G.; SARQUIS, O. Chagas disease and housing improvement in northeastern Brazil: a cross-sectional survey. **Parasitol Res.**, v.114, p. 1687-1692, 2015.

LINTOTT, P. R.; BUNNEFELD, N.; FUENTES-MONTEMAYOR, E.; MINDERMAN, J.; MAYHEW, R. J.; OLLEY, L.; PARK K. J. City life makes females fussy: sex

differences in habitat use of temperate bats in urban areas. **R. Soc. Open Sci.**v.1, p.140-200, 2014.

LISBOA, C. V.; DIETZ, J.; BAKER, A. J.; RUSSEL, N. N.; JANSEN, A. M.; *Trypanosoma cruzi* infection in *Leontopithecus rosalia* at the Reserva Biológica de Poço das Antas, Rio de Janeiro, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.95, p.445-452, 2000.

MACHADO, A. B. M.; MARTINS, C. S.; DRUMMOND, E G.M. (ed.). Lista da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Incluindo as Espécies Quase Ameaçadas e Deficientes em Dados. Belo Horizonte: **Fundação Biodiversidade.**, 160p. 2005.

MACHADO, R. B.; RAMOS NETO, M. B.; PEREIRA, P. G. P.; CALDAS, E. F.; GONÇALVES, D. A.; SANTOS, N. S.; TABOR, K.; STEININGER, M. Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro. Brasília, **Conservation Internacional**, 23p. 2004.

MAIA-ELKHOURY, A. N. S.; AlvesI, W. A.; Sousa-GomesI, M. L.; Senal, J. M.; Luna, E. A. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cad. Saúde Pública**, v.24, n.12, p. 2941-47, 2008.

MARINHO-FILHO, J. The Brazilian Cerrado bat fauna and its Conservation. **Chiroptera Neotropical**, v.2, n.1, p.37- 39, 1996.

MARINHO-FILHO, J.; RODRIGUES, F. H. G.; JUAREZ. K. M. The Cerrado mammals: diversity, ecology, and natural history. In: P.S. Oliveira & R.J. Marquis (eds.). **The Cerrados of Brazil: Ecology and natural history of a neotropical savanna**. pp. 266-284. Columbia University Press, New York. 2002.

MAROLI, M.; FELICIANGELI, M.D.; BICHAUD, L.; CHARREL, R.N.; GRADONI, L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. **Medical and Veterinary Entomology**, v.27, n.2, p.123-47, 2013.

MARTINEZ-MOTA L, CRUZ-MARTINEZ JJ, MARQUEZ-BALTAZAR S, Fernández-Guasti A. Estrogens participate in antidepressant-like effect of desipramine and fluoxetine in male rats. **Pharmacol. Biochem. Beba.**, v. 88, p.332–40, 2008.

MARZOCHI, M. C. A. Leishmanioses no Brasil. As leishmanioses tegumentares. **Jornal Brasileiro de Medicina**, 63: 82-104. 1992.

MASCARELLI, P. E., KEEL, M. K., YABSLEY, M., LAST, L. A., BREITSCHWERDT, E. B., MAGGI, R. G. Hemotropic mycoplasmas in little brown bats (*Myotis lucifugus*) **Parasites Vectors**, 7, pp. 23–27, 2014.

MAUDIN, I.; EISLER, M.C.; WELBURN, S. C. Neglected and endemic zoonoses. **Philosophical Transaction of the Royal Society**, v.364, p.2777-2787, 2009.

MEDEIROS A.C.R.; ROSELINO A.M.F. Leishmaniose tegumentar americana: do histórico aos dias de hoje. **An. bras. Dermatol.**, v.74, n.4, p.329-326, 1999.

MEREDITH, S. E. O.; ZIJLSTRA, E. E.; SCHOONE, G. J.; KROON, C. C. M.; VAN EYS, G. J. J. M.; SCHAEFFER, K. U.; EL-HASSAN, A. M.; LAWYER, P. G. Development and application of the polymerase chain reaction for the detection and identification of *Leishmania* parasites in clinical material. **Archives de l'Institut Pasteur de Tunis**, v.70, p.419-431, 1993.

MICHALSKY É. M.; FORTES-DIAS C. L.; PIMENTA P. F. P.; SECUNDINO N. F. C.; DIAS E. S. Avaliação da PCR na investigação de *Leishmania* spp em flebotomíneos experimentalmente infectados (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Rev. Inst. Med. Trop.**, v.44, p. 255-259, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de vigilância da leishmaniose. tegumentar americana**. Brasília – DF. 2007.

MISSAWA, N. A.; LIMA, G. B. M. Distribuição espacial de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) no Estado de Mato Grosso. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.39, n.4, p.337-340, 2006.

MISSAWA, N. A.; VELOSO, M. A.; MACIEL, G. B.; MICHALSKY, E. M.; DIAS E. S.; Evidence of transmission of visceral leishmaniasis by *Lutzomyia cruzi* in the municipality of Jaciara, state of Mato Grosso, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 44, p.76-78, 2011.

MMA - Ministério do Meio Ambiente. Biodiversidade Brasileira: Avaliação e Identificação de Áreas e Ações Prioritárias para a Conservação, Utilização Sustentável e Repartição dos Benefícios da Biodiversidade nos Biomas Brasileiros. Brasília: MMA, **(Série Biodiversidade, 5)**. 404p, 2002.

MORAES-SILVA, E.; ANTUNES, F. R.; RODRIGUES, M. S.; DA SILVA JULIÃO, F.; DIAS-LIMA A. G.; LEMOS-DE-SOUSA, V.; DE ALCANTARA, A. C.; REIS, E. A.; NAKATANI, M.; BADARO, R.; REIS, M. G.; PONTES-DE-CARVALHO, L.; FRANKE, C. R. Domestic wine in a visceral Leishmaniasis endêmica reappears antibodies against multiple *Leishmania infantum* antigens but apparently resists *L. Infantum* infection. **Acta Trop.**, v.98, p.176-182, 2006.

MORALES, M. A.; CHICHARRO, C.; ARES, M.; CAÑAVATE, C.; BARKER, D. C.; ALVAR, J. Molecular tracking of infections by *Leishmania infantum*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v.95, p.104-107, 2001.

MORATELLI, R. e CALISHER, C.H. Bats and zoonotic viruses: can we confidently link bats with emerging deadly viruses?. **Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio De Janeiro**, v.110, p.1, 2015.

MORSY, T. A.; SALAMA, M. M. I.; ABDEL HAMID, M. Y. Detection of *Leishmania* antibodies in bats. **J. Egypt. Soc. Parasitol**, v. 17, p.797-798. 1987.

MUTINGA, M. J. The animal reservoir of cutaneous leishmaniasis on Mount Elgon, Kenya. **East. Afr. Med. J.**, v. 52, p.142-151, 1975.

NOGUEIRA, M.R.; DE LIMA, I. P.; MORATELLI, R.; TAVARES, V. C.; GREGORIN, R.; PERACCHI, A. L. Checklist of Brazilian bats, with comments on original records. **Check List**, v.10, p.808–821, 2014.

NOYES, H. A. Implications of a Neotropical origin of the genus *Leishmania*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.93, p.657-661, 1998.

OPREA, M.; MENDES, P.; VIEIRA, T. B.; DITCHFIELD, A. D. Do wooded streets provide connectivity for bats in an urban landscape?. **Biodivers. Conserv.**, v.18, p. 2361-2371, 2009.

PAGLIA, A. P.; FONSECA, G. A. B.; RYLANDS, A. B., HERRMANN, G.; AGUIAR, L. M. S.; CHIARELLO, A. G.; LEITE, Y. L. R.; COSTA, L. P.; SICILIANO, S.; KIERULFF, M. C. M.; MENDES, S. L.; TAVARES, V. C.; MITTERMEIER, R. A.; PATTON, J. L. Lista anotada dos mamíferos do Brasil. 2. ed. Occas. **Pap. Conserv. Biol.**, v.6, p.1-76, 2012.

PEACOCK, C.S.; SEEGER K.; HARRIS D.; MURPHY L.; RUIZ J.C.; QUAIL M. A.; PETERS N.; ADLEM E.; TIVEY A.; ASLETT M.; KERHORNOU A.; IVENS A.; FRASER A.; RAJANDREAM, M. A.; CARVER, T.; NORBERTCZAK, H.; CHILLINGWORTH, T.; HANCE, Z.; JAGELS, K.; MOULE, S.; ORMOND, D.; RUTTER, S.; SQUARES, R.; WHITEHEAD, S.; RABBINOWITSCH, E.; ARROWSMITH, C.; WHITE, B.; THURSTON, S.; BRINGAUD, F.; BALDAUF, S. L.; FAULCONBRIDGE, A.; JEFFARES, D.; DEPLEDGE, D. P.; OYOLA, S. O.; HILLEY, J. D.; BRITO, L. O.; TOSI, L. R.; BARRELL, B.; CRUZ, A. K.; MOTTRAM, J. C.; SMITH, D. F.; BERRIMAN, M. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. **Nat Genet.**, v.39, p.839–847. 2007

PEARSON, R. G.; DAWSON, T. P. Predicting the impacts of climate change on the distribution of species: are bioclimate envelope models useful? **Global Ecology & Biogeography**, v.12, n.5, p.361-371, 2003.

PITA-PEREIRA, D.; CARDOSO, M. A. B.; ALVES, C. R.; BRAZIL, R. P.; BRITTO, C. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. **Acta Trop.**, V.107, p.66-69, 2008.

POCAI, E. A.; FROZZA, L.; HEADLEY, S. A.; GRAÇA, D. L. Leishmaniose visceral (calazar). Cinco casos em cães de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. **Cienc. Rural**, v.28, p.501-505, 1998.

PULCHÉRIO-LEITE, A. Uso do espaço por *Artibeus lituratus* e *Sturnira lilium* (Chiroptera: Phyllostomidae) em fragmentos florestais urbanos de Curitiba, Paraná. **Tese, Universidade Federal do Paraná**, Paraná. 2008.

QUINNELL, R.J.; COURTENAY, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasitology**, v.136, p.915–1934, 2009.

RAMÍREZ, J. D.; MONTILLA, M.; CUCUNUBÁ, Z. M.; FLÓREZ, A. C.; ZAMBRANO, P.; GUHL, F. Molecular epidemiology of human oral Chagas disease outbreaks in Colombia. **Plos Negl. Trop. Dis.**, v.7, 2013.

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Proven and putative vectores of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v.104, n.7, p.937-954, 2009.

RANGEL, E.F.; LAINSON, R. **Ecologia das leishmanioses**, p.291-309. In E.F. Rangel & R. Lainson (org.), *Flebotomíneos do Brasil*, Rio de Janeiro, Editora FIOCRUZ, 368p. 2003.

REDFORD, K. H. e FONSECA, G. A. B. The Role of the Gallery Forests in the Zoogeography of the Cerrado's Nonvullant Mammalian Fauna. **Biotropica**, v.18, p.126-135, 1986.

REIS, N. R. DOS.; SHIBATTA, O. A.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. DE. **Sobre os morcegos brasileiros. Em: Morcegos do Brasil**. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, 17-25. 2007.

REIS, N. R., PERACCHI, A. L.; PEDRO W. A.; LIMA, I. P. **Morcegos do Brasil**. Londrina: Editora da Universidade Estadual de Londrina. 253 pp.2007.

REIS, N. R.; FREGONEZI, M. N.; PERACCHI, A. L.; SHIBATTA, O.A. **Morcegos do Brasil: guia de campo**. Rio de Janeiro: Technical Books Editora. 252 pp. 2013.

REY, L. **Parasitologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 856 p. 2001.

RIBEIRO, J. F. e WALTER, B. M. T. Fitofisionomias do bioma cerrado. **Cerrado: ambiente e flora** (S.M. Sano & S.P. Almeida, eds). EMBRAPA-CPAC, Planaltina, p.89-166. 1998.

rico >, acesso em janeiro de 2012.

ROQUE, A. L. R., e JANSEN, A. M. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. **Int. J. Parasitology: Parasites and Wildlife**. v.3, p.251-262, 2014.

ROTUREAU, B. Ecology of the *Leishmania* species in the Guianan ecoregion complex. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.74, p.81-9, 2006.

SACKS D. L.; PERKINS, P. V. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. **Science**, v.223, p.1417-1419, 1984.

SAVANI, E. M. M.; ALMEIDA, M. F.; CAMARGO, M. C. G. O.; D'AURIA, S. R. N.; SILVA, M. M. S.; OLIVEIRA, M. L.; SACRAMENTO, D. Detection of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* and *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* in Brazilian bats. **Vet. Parasitol.**, v.168,p.5-10, 2010.

SAZIMA, I.; FISCHER, W.A.; SAZIMA, M.; FISCHER, E. The fruit bat *Artibeus lituratus* as a forest and city dweller. **Ciênc. Cult.**, v.46, n.3, p.164-168, 1994.

SHAPIRO, J.T.; LIMA JUNIOR, M. S. C.; DORVAL, M. E. C.; FRANÇA, A. O.; MATOS, M. F. C.; BORDIGNON, M. O. First record of *Leishmania braziliensis* presence detected in bat, Mato Grosso do Sul, southwest Brazil. **Acta Tropica**.v.128, p.171-4, 2013.

SHERLOCK, I. A. Importância Médico-Veterinária. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. (Org.). **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, cap. 1, p.15- 22. 2003.

SHIMABUKURO, P. H. F. *Chave de identificação ilustrada dos Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) do estado de São Paulo*, PhD Thesis, Secretaria de Estado da Saúde, **Coordenadoria de Controle de Doenças**, São Paulo, p.121, 2007.

SILVA, E. A.; ANDREOTTI, R.; DIAS, E. S.; BARROS, J C; BRAZUNA, J. C. Detection of *Leishmania* DNA in phlebotomines captured in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Exp Parasitol.**, v.119, n.3, p.343-348, 2008.

SIMPSON, L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication and evolution. **Annu. Rev. Microbiol.**, v.41, p.363-382, 1987.

SINAN, **Sistema De Informação De Agravos De Notificação**. Informe epidemiológico nº 1/ 2017 leishmaniose visceral, Mato Grosso do Sul, semana epidemiológica 1 a 52 de 2016. 2017.

SINAN, **Sistema De Informação De Agravos De Notificação**. Leishmaniose Tegumentar Americana. 2014.

SINGH, A., JAIN, D., UPADHYAY, M. K., KHANDELWAL, N., VERMA, H. N. Green synthesis of silver nanoparticles using *Argimone mexicana* leaf extract and evaluation of their antimicrobial activities. **Digest J. Nanometer. Biostruct.** 5(2):483-489, 2010.

SMITH, D. F.; PEACOCK, C. S.; CRUZ, A. K. Comparative genomics: from genotype to disease phenotype in the leishmaniasis. **International journal for parasitology**, v.37, n.11, p.1173-86, 2007.

STURM, N. R. E.; SIMPSON, L. Kinetoplast DNA minicircles encode guide RNAs for editing of cytochrome oxidase subunit III mRNA. **Cell.**, v.61, p.879-884, 1990.

VALE, E. C. V.; FURTADO, T., Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.80, n.4, p.421-8, 2005.

VAN EYS, G. J. J. M.; GUIZANI, I.; LIGTHART, G.S.; DELLAGI, K.A nuclear DNA probe for the identification of strains within the *Leishmania donovani* complex. **Exp. Parasitol.**, v.7, p.459-463, 1991.

WHO., **World Health Organization**. Leishmaniose, Epidemiological Report of the Americas. 2014.

WILSON, A. J.; DAR, F. K.; PARIS, J. Serological studies on trypanosomiasis in East Africa. III. Comparison of antigenic types of *Trypanosoma congolense* organisms isolated from wild flies. **Ann. trop. Med. Parasit.**, v.67, p.313-317, 1973.

XIMENES, M. F. F. M.; SOUZA, M. F.; CASTELLÓN, E. G. Density of sand flies (Diptera: Psychodidae) in domestic and wild animal shelters in an area of visceral leishmaniasis in the State of Rio Grande do Norte, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.94, p.427-432, 1999.

YANG, S.; ROTHMAN, R. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations and future applications in acute-care settings. **The Lancet, London**, v. 4, p.337-348, 2004.

YOUNG, J. C., AGASHE, V. R., SIEGERS, K., HARTL, F. U. Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.** 5(10):781–791, 2004.

ZAMPIERI, R. A., LARANJEIRA-SILVA, M. F., MUXEL, S. M., DE LIMA, A. C. S., SHAW, J. J., FLOETER-WINTER, L. M. High resolution melting analysis targeting hsp70 as a fast and efficient method for the discrimination of *Leishmania* species. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, 10(2), 2016.

O trabalho a seguir foi elaborado segundo as normas da revista científica *Acta Tropica*.

ARTIGO

Detecção de *Leishmania* spp. por reação em cadeia da polimerase em morcegos urbanos de Campo Grande, MS, Brasil

Resumo

A leishmaniose é uma importante zoonose causada por protozoários do gênero *Leishmania*, e sua transmissão ocorre através de vetores como o *Lutzomyia longipalpis*. A cidade de Campo Grande/MS é uma área endêmica para essa zoonose, com mais de 400 casos em humanos entre 2014 e 2016 e 28 óbitos. Os animais domésticos são os principais reservatórios dessa parasita, porém alguns mamíferos silvestres também podem desenvolver esse papel. Dessa maneira os morcegos estão sendo apontados como potenciais reservatórios, devido a sua abundância em ambientes urbanos e fragmentos florestais, além da sua capacidade de dispersão, longevidade e ainda o fato do principal vetor (*Lu. Longipalpis*) fazer repasto sanguíneo em morcegos. Estudos tem demonstrado uma significativa parcela de morcegos infectados com diversas espécies de *Leishmania* por meio de técnicas moleculares. Assim objetivamos identificar e isolar *Leishmania* spp. em amostras de sangue, pele, baço e fígado de *Artibeus lituratus*, *Artibeus planirostris*, *Carollia perspicillata* e *Glossophaga soricina* coletados em três fragmentos florestais urbanos de Campo Grande/MS. Foram capturados a amostras de 86 animais, os quais foram submetidos a PCR com primers para região de kDNA e ITS, dentre os quais 13,9% (12/86) foram positivos para *Leishmania* spp. Amostras dos 86 animais foram submetidas ao isolamento *in vitro*, as quais todas as amostraram se mostram negativas, análises de esfregaço sanguíneo e de *imprint* de baço e fígado também foram negativas. Nossos resultados reforçam que os morcegos de áreas urbanas podem ser potenciais reservatórios, porem outras técnicas precisam ser feitas para demonstrar a viabilidade e o ciclo de vida do parasita neste possível hospedeiro.

1. Introdução

A leishmaniose é causada pelo protozoário da família Trypanosomatidae do gênero *Leishmania* spp. (Lainson e Shaw, 2005). *Lutzomyia longipalpis* é o principal vetor de *Leishmania infantum*, porém *Lu. cruzi* que é vetor de *L. amazonensis* foi considerada também vetor de *L. infantum* recentemente em algumas cidades do estado de Mato Grosso do Sul (MS) (Lainson e Shaw, 2005; De Oliveira et al., 2017a, 2017b). Mato Grosso do Sul é considerado endêmico para Leishmaniose Visceral (LV) registrou mais de 400 casos em humanos entre 2014 e 2016 e 28 óbitos, sendo seis deles só em 2016 (SINAN, 2017).

Além dos humanos outros mamíferos também podem ser infectados com *Leishmania*, porém poucas espécies são consideradas hospedeiros reservatórios e participar do ciclo de transmissão (Dantas-Torres, 2007; Luppi et al., 2008). Os morcegos estão sendo apontados como potenciais reservatórios de *Leishmania* entre as demais ordens de mamíferos, pois é verificada alta prevalência de DNA de *Leishmania* em várias espécies de morcegos em locais considerados endêmicos (Mutinga, 1975; Morsy, 1987; De Lima et al., 2008; Savani et al., 2010; Shapiro et al., 2013; Berzunza-Cruz et al., 2015; De Oliveira et al., 2015; Kassahun et al., 2015; Da Costa et al., 2015. De Rezende et al., 2017).

Alguns fatores contribuem para que os morcegos sejam considerados como potenciais reservatórios de *Leishmania* spp. Primeiramente, a ordem Chiroptera apresenta grande expressão dentre os mamíferos, sendo a segunda maior ordem da classe Mammalia e chegando a representar 50% de toda a mastofauna da região Neotropical (Patterson et al., 2003). Deve ser considerada ainda a elevada abundância de morcegos em áreas urbanas e fragmentos florestais urbanos (Ferreira et al., 2010; Wu et al., 2013; Russo e Ancillotto, 2014). Além de sua capacidade de voo que permite ultrapassar limites físicos, aumentando sua área de forrageio e dispersão (Arita e Fenton, 1997; Bernard e Fenton, 2003; Acila-Cabadilla et al., 2012).

A ordem é dividida em duas subordens a Megachiroptera composta de espécies que ocorrem apenas no velho mundo, com espécimes que podem chega a 1,70m de envergadura e os Microchiroptera, que possui uma ampla distribuição, composta por 16 famílias, mais de 130 gêneros e 760 espécies (Koopman, 1993;

Kunz e Pierson, 1994; Taddei, 1996). Em território brasileiro são registradas nove famílias, 68 gêneros e 178 espécies de morcegos (Nogueira et al., 2014). O objetivo do trabalho foi detectar e isolar *Leishmania* spp. a partir de amostras biológicas de morcegos coletados em diferentes fragmentos florestais remanescentes de áreas urbanas da cidade de Campo grande, MS.

2. Materiais e métodos

2.1. Área de estudo

O estudo foi realizado na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. As amostras foram coletadas em três fragmentos florestais urbanos, sendo eles: Área 1, Instituto São Vicente ($20^{\circ} 23'08''$ S e $54^{\circ} 36'27''$ O); Área 2, Centro de Educação Ambiental Odilza Fernandes Bittar - CEA Imbirussu ($20^{\circ} 26'57,86''$ S e $54^{\circ} 41'48,91''$ O) e Área 3, Chácara Coqueiral ($20^{\circ} 29'34,16''$ S e $54^{\circ} 34'49,05''$ O) (Figura1).

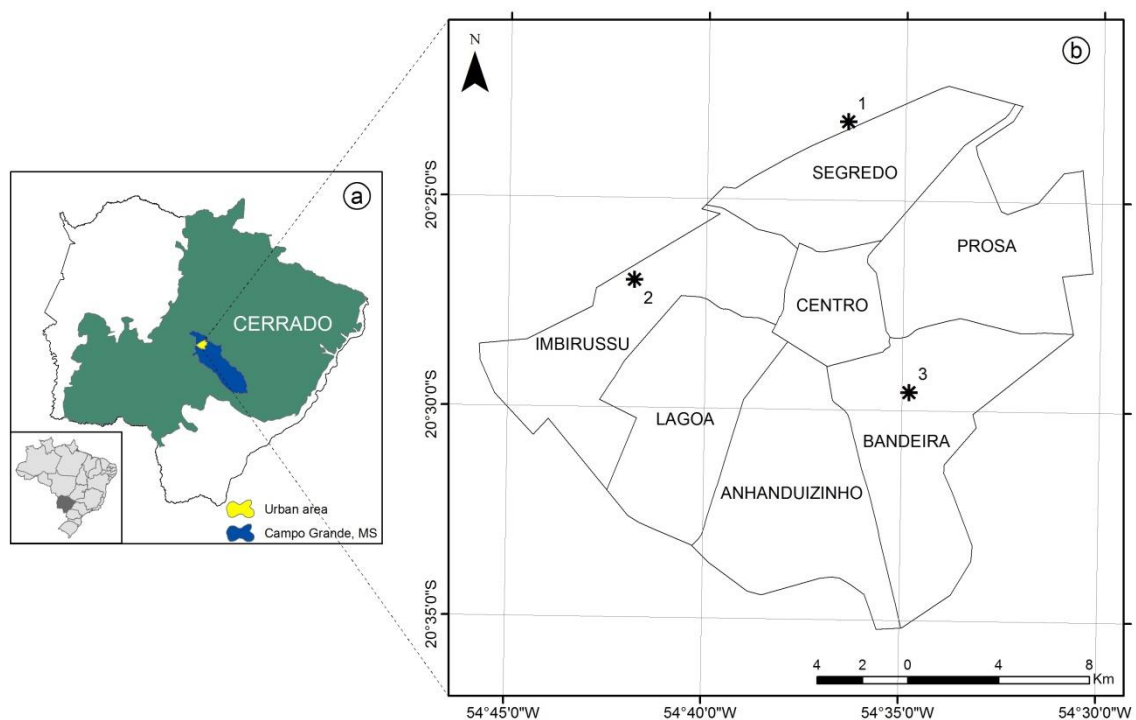


Figura 1: Mapa que ilustra os locais de coleta no Brasil (a) e no estado de Mato Grosso do Sul destacando o Cerrado. O perímetro da cidade de Campo Grande / MS mostrando em (b) e as áreas de coletas na região urbana (*).

As três áreas se localizam no bioma Cerrado e estão inclusas no perímetro urbano de Campo Grande, com clima característico pelas estações seca e úmida, além de composição vegetal que varia entre campos limpos com vegetação predominantemente gramínea até o cerradão com árvores de aspecto florestal (Guimarães et al., 2006). A região de Campo Grande apresenta temperatura média de 23,3°C, e uma média de 1579,7 mm de precipitação anual (Mendonça, 2007).

A área 1, possui cerca 190 hectares, com aproximadamente 20 hectares como Área de Proteção Permanente (Urbietta et al., 2014), possui ainda dentro dessas área moradias, e ainda ocorre criação de ovinos, caprinos, equinos e bovinos, e criação de peixes regionais (Martins et al., 2014). Área 2 é uma área de preservação permanente (APP), na região Imbirussu, a qual preserva no seu interior o córrego Imbirussu (SEMADUR, 2017). A área 3, é uma chácara particular localizada na região Bandeira, possui APP e já foi destinada para criação de gado. Ambas as áreas foi notado a presença de recursos como Urticaceae e Piperaceae.

2.2. Coleta dos animais

Para este estudo foram selecionadas quatro espécies (*Artibeus lituratus*, *Artibeus planirostris*, *Carollia perspicillata* e *Glossophaga soricina*). Com base na sua abundância registrada no município de Campo Grande (CG), abundância de cada espécie previamente conhecida para os três fragmentos e conhecimento da ocorrência *Leishmania* spp. (Ferreira et al., 2010; Roque e Jansen, 2014; Berzunza-Cruz et al., 2015; De Rezende et al., 2017). Os espécimes coletados foram identificados de acordo com a chave de identificação de Vizotto e Taddei (1973) e as atualizações apresentadas por Reis et al. (2007).

Os animais foram capturados com redes de neblina de 12,0m x 2,5m e 5,0m x 2,5m, que ficaram abertas durante seis horas por noite e verificadas em intervalos de 20 minutos. O esforço amostral total foi de 7.560h.m², calculada de acordo com Straube e Bianconi (2002). Os indivíduos das espécies selecionadas foram armazenados individualmente em sacos de pano para diminuir o estresse onde permaneceram até serem processados em laboratório.

2.3. Necropsia

No laboratório os animais foram anestesiados com 10µL de solução anestésica [90µl de cetamina (10%) e 10µl de acepram (0,2%)] para cada 10g de peso animal, e mantido em posição supina. Em seguida, foi realizada a higienização com sabão líquido antibacteriano, álcool iodado e álcool a 70%, sendo repetidas três vezes com cada solução e a tricotomia da região abdominal e a punção cardíaca foi realizada. O sangue foi acondicionado em tubos contendo EDTA com aproximadamente 1mL e a outra parcela foi inoculada em meio de cultura para o procedimento de cultivo *in vitro* em meio de cultura específico para isolamento de espécies *Leishmania*, em tubos contendo 2mL da fase solida (Novy, MacNeal e Nicolle) e 0,5mL meio de cultura Schneider (Vitrocell®).

As amostras de tecidos foram realizadas removendo dois fragmentos de pele, baço e fígado. Cada órgão teve um fragmento armazenado em solução salina (8,5 g de NaCl, 1 ml de penicilina/streptomicina, q.s.p. de 1L água destilada) e outro foi armazenado em ultrafreezer a -84 °C para posterior extração de DNA. A coleta de material foi autorizada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (IBAMA) e pelo Instituto Chico Mendes (ICMBio) sob o número de licença 48687-1 e pelo CEUA/UCDB sob o protocolo nº 010/201548687-1.

2.4. Isolamento *in vitro* de *Leishmania*

As amostras submetidas ao isolamento *in vitro*, foram armazenadas por 24h a -20 °C em solução salina, após esse período o fragmento foi transferido para o meio de cultura específico para isolamento de espécies *Leishmania*, em tubos contendo 2mL da fase solida (Novy, MacNeal e Nicolle) e 0,5mL meio de cultura Schneider (Vitrocell®). As amostras devidamente identificadas foram enviadas ao Laboratório de Biologia de Trypanosomatideo do Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ / RJ.

2.5. Esfregaço sanguíneo e imprint de órgãos

O esfregaço de sangue foi realizado de acordo com Neitz e Thomas (1938) e as impressões teciduais de baço e fígado, realizadas de acordo com Molinaro et al. (2010). As lâminas foram fixadas com metanol (álcool metílico PA - Merck ®)

coradas com Giemsa e observadas por microscópio luz (Leitz Wetzlar - Dialux 20 EB) com objetiva ocular (10X) e imersão (100X), para a possível observação de formas de *Leishmania*.

2.6. Extração de DNA genômico

O DNA genômico foi extraído a partir de 400 µL de sangue seguindo o protocolo de Sambrook e Russel (2001) utilizando fenol-clorofórmio. Para as amostras de pele, baço e fígado, foi utilizado o protocolo descrito por Biase et al. (2002), o DNA foi quantificado por espectrofotômetro Bio Drop DUO (Biodrop®),

2.7. PCR de kDNA de *Leishmania* spp.

Para a amplificação do DNA alvo da região de cinetoplasto de *Leishmania* spp., foram utilizados o par de primer descrito por Schubach et al. (1998) A/L1: GGGGAGGGGCGTTCTGCGAA e B/L2: GGCCCACTATATTACACCAACCCC, que delimita um fragmento de 120pb. A reação foi realizada em termociclador Termociclador GeneAmp PCR System (Thermo Fisher Scientific®), com um volume final de 50µL, contendo 1,5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 0,5 mM de cada Desoxirribonucleotídeo, 5 pmol/µL de cada primer, 1,25 U Taq DNA polimerase (Invitrogen® Carlsbad, CA, USA) e 5 µL de DNA a 150ng.

A termociclagem foi realizada com um ciclo inicial de 94°C/5min; 30 ciclos de 94°C/1 min.; 65°C/1min; 72°C/1min e um ciclo final de 72°C/5min. Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese a 130V por uma hora em gel de agarose a 2,0%, o qual foi corado com brometo de etídio e visualizado em transluminador sob a luz ultravioleta. Como controle positivo da reação de PCR foi utilizado DNA de *Leishmania* spp., e para o controle negativo foi usado apenas água ultra-pura.

2.8. PCR da região ITS de *Leishmania* spp.

Para a amplificação da região alvo do DNA região ITS, região do DNA ribossomal de *Leishmania* spp. foi utilizado o par de primer descrito por Schonian et

al. (2003) LITRS: CTGGATCATTTTCCGATC e L5.8S: TGATACCACTTATCGCACTT que amplifica um fragmento de 350pb. A reação foi realizada com um volume final de 25µL, contendo 1 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 0,2 mM de cada Desoxirribonucleotídeo, 5 pmol/µL de cada primer, 1U Taq DNA polimerase (Invitrogen®Carlsbad,CA, USA) e 5 µL de DNA a 100 ng/µL.

A termociclagem foi realizado noTermociclador Gene Amp PCR System (Thermo Fisher Scientific®), com um ciclo inicial de 94°C/5min; 35 ciclos de 94°C/30 seg.; 53°C/1min; 72°C/1min e um ciclo final de 72°C/5min. Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese a 130V por uma hora em gel de agarose a 2%, o qual foi corado com brometo de etídio e visualizado em transluminador sob a luz ultravioleta. Como controle positivo da reação de PCR foi utilizado DNA de *Leishmania* spp., e para o controle negativo foi usado apenas água ultra-pura.

3. Resultados

Foi coletado um total de 86 morcegos pertencentes a quatro espécies da família Phyllostomidae. Destes 27 animais foram coletados no Instituto São Vicente (área 1), 29 animais no Centro de Educação Ambiental Odilza Fernandes Bittar - CEA Imbirussu (área 2) e 30 animais na Chácara Coqueiral (área 3) (tabela 1).

Tabela 1: Número de espécimes coletadas nas três áreas, total por espécie e área e quantidade de animais adultos e jovens, e macho e fêmea.

Espécies	Área de coleta			Total	E.R.		Sexo	
	1	2	3		J	A	M	F
<i>A. lituratus</i>	12	7	4	23	4	19	15	8
<i>A. planirostris</i>	12	12	10	34	11	23	24	10
<i>C. perspicillata</i>	2	8	11	21	5	16	17	4
<i>G. soricina</i>	1	2	5	8		8	7	1
Total	27	29	30	86	20	66	63	23

Estagio reprodutivo (E.R.), jovem (J), adulto (A), macho (M), fêmea (F)

Nos esfregaços sanguíneos e *imprint* não foram observados nem uma forma de *Leishmania*. No isolamento *in vitro* das amostras de sangue, pele, baço e fígado, não foi possível isolar o parasita *Leishmania*. Foi extraído DNA das amostras biológicas, que obteve em média a concentração de 128,12ng/µL em amostras de

sangue, 12.138ng/μL em pele, 870,33ng/μL em amostras de fígado e 631,63ng/μL baço.

O DNA extraído foi submetido a PCR utilizando o par de *primer* da região kDNA o qual observou-se a presença de DNA de *Leishmania* spp. em 13,9% (12/86) animais. Os animais positivos para kDNA foram submetidos posteriormente a PCR com *primers* de região ITS (350pb) (Figura 2).

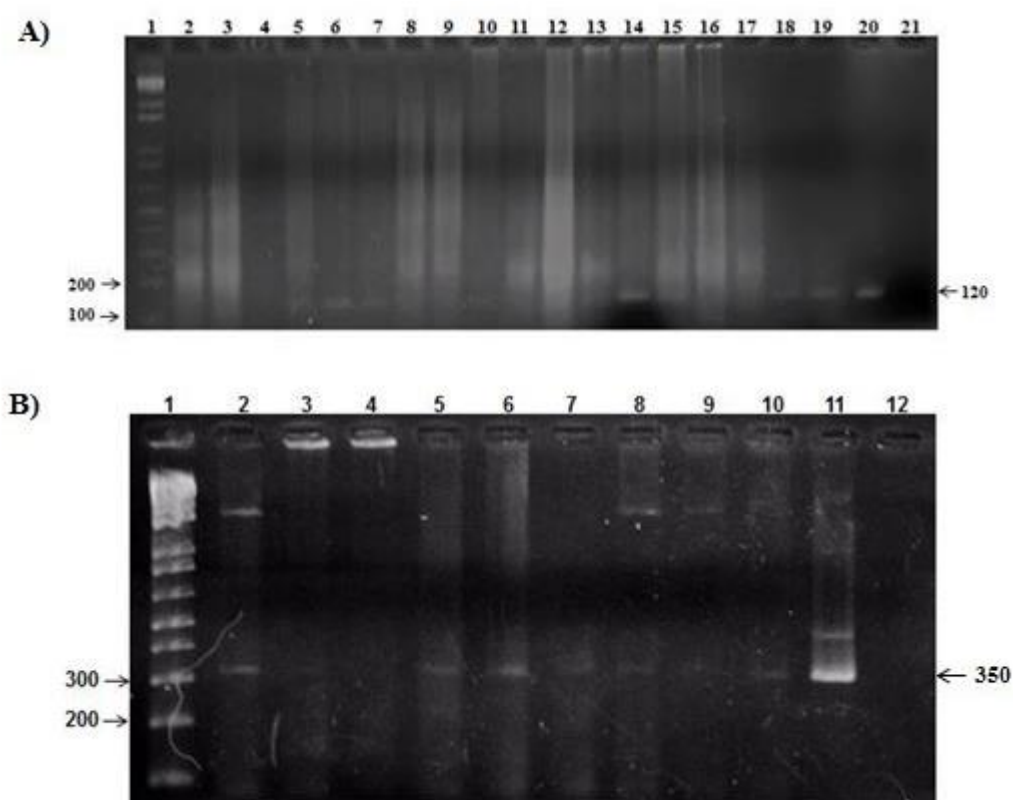


Figura 2: Géis de agarose 2% corados com brometo de etídio, Em (A) gel referente a PCR com primers kDNA (120pb), em (B) gel de PCR utilizando *primers* ITS (350pb). A linha 1 (A e B) corresponde ao marcador 1kb plus DNA landder (invitrogen). As amostras aqui avaliadas correspondem a DNA extraído de fígado, 2 ao 19 (A) e 2 ao 10 (B), as linhas 20 (A) e 11 (B) corresponde a DNA de *L. infantum* e as linhas 21 (A) e 12 (B) controle negativo (agua ultrapura).

Dos 12 animais positivos sete foram da espécie *A. planirostris*, três *C. perspicillata* e dois *G. soricina*. Um animal da espécie *A. planirostris* foi positivo nas amostras de DNA de pele, baço e fígado. Esse animal foi coletado no Centro de Educação Ambiental Odilza Fernandes Bittar - CEA Imbirussu (área 2). Outros três

A. planirostris também dessa área foram positivos para as amostras de baço e fígado e um *C. perspicillata* e um *G. soricina* foram positivos em amostras de pele e fígado. Na chácara Coqueiral (área 3) apenas um *A. planirostris* foi positivo em amostras de baço e fígado e outros três animais foram positivos em apenas fígado ou pele. Dos animais coletados no Instituto São Vicente (área 1) apenas *C. perspicillata* foi positivo na amostra de pele (tabela 2).

Tabela 2: Morcegos positivos para *Leishmania* spp, na PCR (reação em cadeia da polimerase) com primers de região ITS e kDNA e respectivos órgão onde foram detectados.

Espécies de morcegos	Hábito alimentar	Área	Pele	Baço	Fígado	P/F	B/F	P/B/F	nP/nT	%
<i>A. lituratus</i>	Frugívoros	-	0	0	0	0	0	0	0/12	0.0
<i>A. planirostris</i>	Frugívoros	2 e 3	2	0	1	0	3	1	7/34	58.3
<i>C. perspicillata</i>	Frugívoros	1 e 2	1	0	1	0	1	0	3/21	35.0
<i>G. soricina</i>	Nectarívoros	2	0	0	0	1	1	0	2/8	16.6
Total			3	0	2	1	5	1	12/86	100%

Pele e fígado (P/F); baço e fígado (B/F); pele, baço e fígado (P/B/F); números de animais positivos e números de animais coletados (nP/nT)

4. Discussão

Com este estudo obteve-se a primeira detecção simultânea em três órgãos (pele, baço e fígado) de *Leishmania* spp. em *A. planirostris*. Também foi detectado o parasita em amostras de baço e fígado em outros seis animais e dois animais com a presença simultânea do parasita na pele e fígado.

As técnicas parasitológicas como esfregaço sanguíneo, *imprint* e isolamento *in vitro*, foram negativas nesse estudo. Provavelmente as amostras possuíam uma baixa parasitemia ou algum parâmetro não tornou eficaz a multiplicação do parasita *in vitro*. De acordo com Maia e Campino (2008) essas técnicas são consideradas testes de excelência, porém depende muito do grau de parasitemia do animal, uma vez que o isolamento em cultura tem uma sensibilidade baixa de 20 a 40% (Rodriguez et al., 1994).

Assim como nosso trabalho, diversos estudos têm relatado por meio de técnicas parasitológicas e principalmente técnicas moleculares a presença de *Leishmania* em varias espécies de morcegos (Savani et al., 2010; Shapiro et al., 2013; Berzunza-Cruz et al., 2015; De Oliveira et al., 2015; Kassahun et al., 2015; Da Costa et al., 2015). Em algumas delas foram usadas regiões ITS para identificação do parasita, assim como em nosso estudo (Shapiro et al., 2013; Kassahun et al., 2015; De Oliveira et al., 2015).

No trabalho De Rezende et al (2017) observou-se a presença de *Leishmania* spp. e *L. infantum* em 37.5% (30/80) morcegos coletados nas mesmas áreas urbanas do presente estudo, porém foi observada uma redução na prevalência de animais infectados com *Leishmania* spp. para 13.9% (12/86). Coincidentemente essa redução também foi observada em casos registrados em humanos conforme os dados de SINAN (2017) que de 2012 a 2014, época de coleta do estudo de De Rezende et al (2017), teve 749 casos, e de 2015 a 2016, data do presente estudo, caiu para 227 casos, tendo uma redução de 30.3% de casos.

Estudos tem demonstrado à presença de *Lu. Longipalpis* em áreas urbanas de Campo Grande/MS (Oliveira et al., 2003; Almeida et al., 2013; Cunha et al., 2014), como no trabalho de Dorval et al (2016) que relatou a presença de *Lu. Longipalpis* se alimentando de camundongos expostos em uma região próxima a Chácara Coqueiral (área 1), local este de coleta do nosso estudo o qual obteve quatro animais positivos para *Leishmania* spp.

Cunha et al (2014) identificou *Lu. Longipalpis* infectados, nas mesmas três regiões a qual coletamos. Além disso, os morcegos também podem ser fontes de alimento para o *Lu. Longipalpis*, como foi demonstrado por Lampo et al (2000), essas evidencias podem estar associados aos morcegos infectados.

Dentre os mamíferos silvestres o *Didelphis albiventris* é considerado um reservatório de *Leishmania* assintomático (Lainsos et al., 1981), esse animal é facilmente encontrado em ambientes periurbanos e ate mesmo em abrigos domésticos, assim como os morcegos. Humberg et al (2012) detectou 20.3% dos gambas coletados em ambiente urbano de Campo Grande /MS infectados com *Leishmania* spp. sugerindo que os gambas tem relação aos casos humanos de LV.

Outra relação poderia ser na presença desses animais infectados em fragmentos florestais urbanos podendo levar a possível infecção dos morcegos nessas áreas.

5. Conclusão

Não foi possível isolar *Leishmania* spp. *In vitro* em amostras biológicas de morcegos, também não foi observado nem uma forma de *Leishmania* nos *imprint* e nos esfregaços sanguíneos, porém foi identificado em amostras de pele, baço e fígado DNA de *Leishmania* spp. em morcegos coletados na região urbana de Campo Grande.

Todos esses fatos quando associados, pode reforçar a hipótese que os morcegos são reservatório de *Leishmania*, entretanto até o momento podemos afirmar que esse mamífero silvestre é um possível reservatório. Para confirmação dessa hipótese, novos estudos são necessários a fim de demonstrar como esse parasita age nesse mamífero e qual a participação do mesmo na epidemiologia das leishmanioses.

6. Referencias

- Almeida, P.S., Sciamarelli, A.B., Paulo M.F., Ademar D., Nascimento, J., Raizer, J., Andrade Filho, J.D., Gurgel-Goncalves, R., 2013 Predicting the geographic distribution of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) and visceral leishmaniasis in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 108, 992-996.
- Arita, H.T., e Fenton, M.B., 1997. Flight and echolocation in the Ecology and Evolution of bats. *TREE*. 12(2), 53-58.
- Avila-Cabadilla, L.D., G.A. Sanchez-Azofeifa, K.E., Stoner, M.Y., Alvarez-Anorve, M., Quesada, C.A., Portillo-Quintero. M., 2012. Local and landscape factors determining occurrence of Phyllostomid bats in tropical secondary forests. *Plos One*. 7, 4.
- Bernard, E. & Fenton, B., 2003. Bat mobility in a fragmented landscape in Central Amazonia. *Biotropica*. 35, 262–277.
- Berzunza-Cruz, M., Rodríguez-Moreno, Á., Gutiérrez-Granados, G., González-Salazar, C., Stephens, C.R.; Hidalgo-Mihart, M., Marina, C.F., Rebollar-Téllez, E.A., Bailón-Martínez, D., Balcells, C.D., Ibarra-Cerdeña, C.N., Sánchez-Cordero, V., Becker, I., 2015. *Leishmania* (L.) *mexicana* infected bats in Mexico: novel potential reservoirs. *Plos Negl. Trop. Dis*. 28.
- Cunha, R.C., Andreotti, R., Cominetti, M.C., Silva, E.A., 2014. Detection of *Leishmania infantum* in *Lutzomyia longipalpis* captured in Campo Grande, MS. *Rev. Bras. Parasitol.Vet*. 23, 269–273.

- Da Costa, A.P., Costa, F.B., Soares, H.S., Ramirez, D.G., Mesquita, E.T., Gennari, S.M., Marcili, A., 2015. *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania infantum chagasi* infection in wild mammals from maranhão state, Brazil. Vector Borne Zoonotic Dis. 15, 656-66.
- Dantas-Torres, F, 2007. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Vet. Parasitol. 149, 139-146.
- Dantas-Torres, F., Latrofa, S.M., Otranto, D., 2011. Quantification of *Leishmania infantum* DNA in females, eggs and larvae of *Rhipicephalus sanguineus*. Parasites & Vectors. 4, 56.
- De Lima, H., Rodríguez, N., Barrios, M. A., Avila, A., Cañizales, I., Gutiérrez, S., 2008. Isolation and molecular identification of *Leishmania chagasi* from a bat (*Carollia perspicillata*) in northe astern Venezuela. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, 103, 4, 412–414.
- De Oliveira, E.F., Oshiro, E.T., Fernandes, W.S., Ferreira, A.M., De Oliveira, A.G., Galati, E.A., 2017b. Vector Competence of *Lutzomyia cruzi* naturally demonstrated for *Leishmania infantum* and suspected for *Leishmania amazonensis*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 11;96(1):178-181.
- De Oliveira, E.F., Oshiro, E.T., Fernandes, W.S., Murat, P.G., Medeiros, M.J., Souza, A.I., Oliveira, A.G., Galati, E.A., 2017a. Experimental infection and transmission of *Leishmania* by *Lutzomyia cruzi* (Diptera: Psychodidae): Aspects of the ecology of parasite-vector interactions. PLoS Negl. Trop. Dis. 2, 24-11,
- De Oliveira, F.M., Costa, L.H., De Barros, T.L., Ito, P.K., Colombo, F.A., De Carvalho, C., Pedro, W.A., Queiroz, L.H., Nunes, C.M., 2015. First detection of *Leishmania* spp. DNA in Brazilian bats captured strictly in urban areas. Acta Trop. 150, 176-81.
- De Rezende, M.B., Herrera, H.M., Carvalho, C.M., Anjos, E.A.C., Ramos, C.A., De Araújo, F.R., Torres, J.M., De Oliveira, C.E. Detection of *Leishmania* spp. in bats from an area of brazil endemic for visceral leishmaniasis. Transbound Emerg. Dis.
- Dorval, M.E., Oshiro, E.T., Brilhante, A.F., Nunes, V.L., Cristaldo, G., Lima Júnior, M.S., Galati, E.A., 2016. Sandflies in an urban area of transmission of visceral leishmaniasis in midwest Brazil. Parasite. 23, 35.
- Eitz, W.O., Thomas, A.D., 1938. Rickettsiosis in the dog. Journal of south African. Veterinary Medical Association. 9, 166-174.
- Ferreira, C.M.M.; Fischer, E.; Pulchério-Leite, A. Bat fauna in urban remnants of Cerrado in Campo Grande, Mato Grosso do Sul. Biota Neotrop. 10, 3.
- Guimarães, L.D., Silva, M.A.D., Anacleto, T.C., 2006. Natureza viva: Cerrado. Editora da UCG, Goiânia.
- Humberg, R.M., Oshiro, E.T., Cruz, M.S., Ribolla, P.E., Alonso, D.P., Ferreira, A.M., 2012. *Leishmania chagasi* in opossums (*Didelphis albiventris*) in an urban area endemic for visceral leishmaniasis, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. Am. J. Trop. Med. Hyg. 87, 470–472.
- Kassahun, A., Sadlova, J., Benda, P., Kostalova, T., Warburg, A., Hailu, A., Baneth, G., Volf, P., Votypka, J., 2015. Natural infection of bats with *Leishmania* in Ethiopia. Acta. Trop. 150,166-70.

- Koopman, K.F. 1993. Order Chiroptera. In: Wilson, D.E., Reeder D.M. (2^a). Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference. Washington, Smithsonian Institution Press, 1206p.
- Kunz, T.H., Pierson, E.D., 1994. Bats of the World: an introduction,. In: Nowak, R.W. (Eds). Walker's bats of the World. Baltimore, The Johns Hopkins University Press, p. 1-46.
- Lainson, R., Shaw, J.J., 2005. New World Leishmaniasis - the neotropical *Leishmania* species. In: Cox, F.E.G., Kreier, J. P., Wakelin, D. (org.). Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections. London: Arnold, p. 313-49.
- Lainson, R., Shaw, J.J., Ready, P.D., Miles, M.A., Povoas, M., 1981. Leishmaniasis in Brazil: XVI. Isolation and identification of *Leishmania* species from sandflies, wild mammals and man in north Para State, with particular reference to *L. braziliensis guyanensis* causative agent of "pian-bois". Trans R Soc Trop Med Hyg. 75, 4, 530-6.
- Luppi, M.M., Malta, M.C.C., Silva, T.M., Silva, F.L., Motta, R.O., Miranda, I., Ecco, R., Santos, R.L., 2008. Visceral leishmaniasis in captive wild canids in Brazil. Vet. Parasitol. 155, 146-151.
- Maia, C., Campino, L., 2008. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. Vet Parasitol. 158, 274-287.
- Mendonça, F., Danni-Oliveira, I.M., 2007. Climatologia: Noções básicas e climas do Brasil. Oficina de textos, São Paulo. Martins, M.P.V., Torres, J.M., Anjos, E.A.C., 2014. Dieta de morcegos filostomídeos (Mammalia, Chiroptera, Phyllostomidae) em fragmento urbano do Instituto São Vicente, Campo Grande, Mato Grosso do Sul. Pap. Avulsos Zool. 54, 299–305.
- Molinaro, N., Conrad, M., Barber, H.A., Carreiras, M., 2010. On the functional nature of the N400: Contrasting effects related to visual word recognition and contextual semantic integration. Cognitive Neuroscience.1, 1.
- Morsy, T.A., Salama, M.M., Abdel, I., Hamid, M.Y., 1987. Detection of *Leishmania* antibodies in bats. J. Egypt. Soc. Parasitol. 17, 797-798.
- Mutinga, M.J., 1975. The animal reservoir of cutaneous leishmaniasis on Mount Elgon, Kenya. East. Afr. Med. J. 52, 142-151.
- Nogueira, M.R., De Lima, I.P., Moratelli, R., Tavares, V.C., Gregorin, R., Peracchi, A.L., 2014. Checklist of Brazilian bats, with comments on original records. Check List. 10, 808–821.
- Oliveira, A.G., Andrade Filho, J.D., Falcão, A.L., Brazil, R.P., 2003. Estudo de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) na zona urbana da cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, 1999-2000. Cad Saude Publica. 9, 933-944.
- Patterson, B.D., M.R. Willig and Stevens, R.D. 2003. Trophic strategies, niche partitioning and patterns of ecological organization. In: Kunz, T.H.; Fenton, M.B. (Ed.). Bat ecology. University of Chicago Press, Chicago, IL. p. 536-579.
- Reis, N.R., Peracchi, A.L., Pedro, W.A., Lima, I.P., 2007. Morcegos do Brasil. UEL, Londrina.

- Rodriguez, N., Guzman, B., Rodas, A., Takiff, H., Bloom, B.R., Convit, J., 1994. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*. 32, 2246-2252.
- Russo D., and Ancillotto L., 2014. Sensitivity of bats to urbanization: a review. *Mammal. Biol.* 80, 205–212.
- Sambrook, J., Russel. D. W., 2001. *Molecular cloning: a Laboratory manual*, (Eds 3) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York : CSHL.
- Savani, E.M.M., Almeida, M.F., Camargo, M.C.G.O., D'auria, S.R.N., Silva, M. M.S., Oliveira, M.L., Sacramento, D., 2010. Detection of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* and *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* in Brazilian bats. *Vet. Parasitol.* 168, 5-10.
- Schonian, G.A., Nasereddin, N., Dinse, C., Schweynoch, H.D., Schallig, W., Jaffe, C.L., 2003. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 47, 349-358.
- Schubach, A., Haddad, F., Oliveira, M.P.N., Degrave, W., Pirmez, C., Grimalde, G., Fernandes, O., 1998. Detection of *Leishmania* DNA by Polimerase Chain Reaction in scars of treated human patients. *J. Infect. Dis.* 178, 911-914.
- SEMADUR, Secretaria Municipal de Meio Ambiente e Desenvolvimento Urbano. <http://www.capital.ms.gov.br/semadur/artigos/cea-imbirussu/> (Acessed 05.02.2017).
- Shapiro, J.T., Lima Junior, M.S.C., Dorval, M.E.C., França, A.O., Matos, M.F.C., Bordignon, M.O., 2013. First record of *Leishmania braziliensis* presence detected in bat, Mato Grosso do Sul, southwest Brazil. *Acta Tropica*. 128, 171-4.
- SINAN, Sistema De Informação De Agravos De Notificação. Informe epidemiológico nº 1/ 2017 leishmaniose visceral, Mato Grosso do Sul, semana epidemiológica 1 a 52 de 2016. 2017
- Straube, F.C., Bianconi, G. V., 2002. Sobre a grandeza e a unidade utilizada para estimar esforço de captura com utilização de redes-de-neblina. *Chiróp. Neotrop.* 8, 150–152.
- Taddei, V.A., 1996. Sistemática de quirópteros. *Boletim do Instituto Pasteur, São Paulo*. 1(2), 3-15.
- Urbietta, G.L., Torres, J.M., Almeida L.B.M., Shinohara, A., Dos Anjos, E.A.C., 2014. Infestação de morcegos (Mammalia, Chiroptera) por moscas do gênero *Megistopoda* (Diptera, Streblidae) em um fragmento urbano de Cerrado de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. *Bol. Soc. Bras. Mastozool.* 69, 10-13.
- Vizotto, L.D., Taddei, V.A., 1973. Chave para a determinação de quirópteros brasileiros. São José do Rio Preto, Francal. 72.
- Wu J., He C., Huang G., and Yu D., 2013. Urban landscape ecology: past, present, and future. 37–53 in Fu, B.J editor; and Jones, K.B., editor. (Eds.) *Landscape ecology for sustainable environment and culture*. Springer Netherlands, Dordrecht.

APENDICE 1

NORMAS ACTA TROPICA



TABLE OF CONTENTS

•	Description	p.1
•	Audience	p.2
•	Impact Factor	p.2
•	Abstracting and Indexing	p.2
•	Editorial Board	p.2
•	Guide for Authors	p.4



ISSN: 0001-706X

DESCRIPTION

Acta Tropica, is an international journal on infectious diseases that covers public health sciences and biomedical research with particular emphasis on topics relevant to human and animal health in the tropics and the subtropics.

Its scope includes the biology of pathogens and vectors, host-parasite relationships, mechanisms of pathogenicity, clinical disease and treatment, and we welcome contributions in basic or applied research in disciplines such as epidemiology, disease ecology, diagnostics, interventions and control, mathematical modeling, public health and social sciences, climate change, parasite and vector taxonomy, host and parasite genomics, biochemistry and immunology and vaccine testing.

Contributions may be in the form of original papers, review articles or short communications.

Only manuscripts of high scientific significance and innovation will be considered for publication. Manuscripts of minimal international relevance, case reports, and control strategies at very early inconclusive laboratory stages of development will not be considered for publication.

Important Guidelines for Acceptance

Editors and the Editorial Board of *Acta Tropica* provide the following guidelines to help authors prepare manuscripts of high quality that can be considered for publication. Maximize your chances of acceptance by making sure your manuscript:

Matches the scientific scope of the journal, Presents results that significantly advance science including innovative new approaches, Meets quality standards of presentation and literature citation, Demonstrates potential health or biomedical impact.

The above points are critical for publication of original papers. Be aware Editors carefully evaluate initial manuscript submissions and only those meeting the above criteria will be forwarded to review. If reviewed favorably and the authors seriously address all concerns, than chances of acceptance are increased. Review papers, in addition, are expected to carefully synthesize the literature and make recommendations to advance respective scientific fields.

Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our [author services](#).

Please see our [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our [Support Center](#)

AUDIENCE

All clinicians and researchers dealing with tropical diseases, including parasitologists, microbiologists, immunologists and epidemiologists

IMPACT FACTOR

2015: 2.380 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2016

ABSTRACTING AND INDEXING

Abstracts on Hygiene and Communicable Diseases

BIOSIS

Chemical Abstracts

Current Contents

MEDLINE®

EMBASE

Ecological Abstracts

Helminthological Abstracts

Science Citation Index

Tropical Diseases Bulletin

Veterinary Bulletin

CAB Abstracts

Scopus

EDITORIAL BOARD

Editors

J. Beier, Division of Environment & Public Health Department, Public Health Sciences University, University of Miami, Miller School of Medicine, Clinical Research Building, 1120 NW 14th Street, Miami, 33136, USA, Fax: +1 305 256 1306

K. Berzins, Dept. of Molecular Biosciences, The Wenner-Gren Institute, Stockholms Universitet, The Arrhenius Laboratories F5, SE-10691, Stockholm, Sweden, Fax: +46 8 166488

N.W. Brattig, Tropical Medicine Section, Bernhard Nocht Inst., Bernhard-Nocht-Str. 74, 20359, Hamburg, Germany, Fax: +49 40 42818 400

F. Guhl, Fac. de Ciencias, Depto. de Ciencias Biologicas, Calle 18A CRA. 1E Of. A-202, Universidad de Los Andes, Apartado Aereo 4976, Bogotá, Colombia, Fax: 57 1 2841890

Editorial Board

G. Benelli, Pisa, Italy

D. Campbell, Los Angeles, CA

J.M. Cordovez, Bogota, Colombia

A. Flisser-Steinbruch, Mexico City, Mexico

R. Gürtler, Buenos Aires, Argentina

J. Hargrove, Stellenbosch, South Africa

A. Hassanali, Nairobi, Kenya

C. Hatz, Basel, Switzerland

A. Ito, Hokkaido, Japan

N. Kabatereine, Kampala, Uganda

C. H. King, Cleveland, OH

I. Krantz, Skövde, Sweden

A. Kumar, Goa, India

A.G. Lescano, New Orleans, LA

S. Manguin, Montpellier, France

S. Mas-Coma, Valencia, Spain

D.P. McManus, Brisbane, Queensland, Australia

G. Muller, Jerusalem, Israel
F. Ntoumi, Brazzaville, Congo
P.V. Perkins, Orrington, Maine, USA
K.D. Ramaiah, Pondicherry, India
C.T.D. Ribeiro, Rio de Janeiro, Brazil
L. Rombo, Eskilstuna, Sweden
N. Saravia, Cali, Colombia
S. Sayasone, Basel, Switzerland
G. Schaub, Bochum, Germany
P. Steinmann, Basel, Switzerland
S.R. Telford, North Grafton, Massachusetts, USA
J. Utzinger, Basel, Switzerland
G. Vallejo, Ibagué, Colombia
J. Vontas, Heraklion, Crete, Greece
M. Wahlgren, Solna, Sweden
J. Waikagul, Bangkok, Thailand
M. Walker, London, UK
M.L. Wilson, Ann Arbor, Michigan, USA
R.-D. Xue, St. Augustine, Florida, USA
S. Zakeri, Tehran, Iran
B. Zhan, Houston, TX
E. Zhioua, Tunis, Tunisia
X.-N. Zhou, Shanghai, China
B. Zingales, Sao Paulo - SP, Brazil

GUIDE FOR AUTHORS

Your Paper Your Way

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article.

To find out more, please visit the Preparation section below.

INTRODUCTION

Acta Tropica publishes original research papers, short communications, review articles and letter to the editor. Original papers **should normally not exceed 10 printed pages** including tables and figures. Short communications should not exceed 4 printed pages including tables and figures. Manuscripts must be accompanied by a letter signed by all the authors. Submission of a paper to *Acta Tropica* is understood to imply that it has not previously been published (except in an abstract form), and that it is not being considered for publication elsewhere. The act of submitting a manuscript to *Acta Tropica* carries with it the right to publish the paper. Responsibility for the accuracy of the material in the manuscript, including bibliographic citations, lies entirely with the authors. Letters to the Editor is considered for publication provided it does not contain material that has been submitted or published elsewhere. The text, not including references, must not exceed 1000 words. The letter can have one figure or small table. When a letter refers to an article recently published in *Acta Tropica*, the opportunity for reply will be given to the authors of the original article. Such a reply will be published along with the letter. Start the letter with "Dear Editor".

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- Relevant declarations of interest have been made
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Declaration of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. [More information](#).

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [CrossCheck](#).

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. [More information](#).

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of [existing agreements](#) are available online.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our [universal access programs](#).
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following [Creative Commons user licenses](#):

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 2150**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [green open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. [Find out more](#).

This journal has an embargo period of 12 months.

Elsevier Publishing Campus

The Elsevier Publishing Campus (www.publishingcampus.com) is an online platform offering free lectures, interactive training and professional advice to support you in publishing your research. The College of Skills training offers modules on how to prepare, write and structure your article and explains how editors will look at your paper when it is submitted for publication. Use these resources, and more, to ensure that your submission will be the best that you can make it.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

PREPARATION

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

Please submit the manuscript with double line spacing and with continuous line numbering.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file. The corresponding caption should be placed directly below the figure or table.

REVISED SUBMISSIONS

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Please submit the manuscript with double line spacing and with continuous line numbering.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Please provide, when submitting your article, a graphical abstract. This comprises the title, authors and affiliations, identical to the article itself, a summary of about 25 words, and a pictogram: one figure representative of the work described. Maximum image size: 400 × 600 pixels (h × w, recommended size 200 × 500 pixels). Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view [example Highlights](#) on our information site.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files. A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Illustration services

[Elsevier's WebShop](#) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the

journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#) and [Zotero](#), as well as [EndNote](#). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/acta-tropica>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13.03.03).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. Mendeley Data, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

RESEARCH DATA

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that give them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the [Data in Brief website](#). Please use [this template](#) to write your Data in Brief.

Transparency

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, this gives you the opportunity to indicate why. If you submit [this form](#) with your manuscript as a supplementary file, the statement will appear next to your published article on ScienceDirect.

ARTICLE ENRICHMENTS

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. [More information and examples are available](#). Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Google Maps and KML files

KML (Keyhole Markup Language) files (optional): You can enrich your online articles by providing KML or KMZ files which will be visualized using Google maps. The KML or KMZ files can be uploaded in our online submission system. KML is an XML schema for expressing geographic annotation and visualization within Internet-based Earth browsers. Elsevier will generate Google Maps from the submitted KML files and include these in the article when published online. Submitted KML files will also be available for downloading from your online article on ScienceDirect. [More information](#).

Interactive plots

This journal enables you to show an Interactive Plot with your article by simply submitting a data file. [Full instructions](#).

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Webshop](#). Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).

© Copyright 2014 Elsevier | <http://www.elsevier.com>

APÊNDICE 2

ARTIGO PUBLICADO

SHORT COMMUNICATION

Detection of *Leishmania* spp. in Bats from an Area of Brazil Endemic for Visceral Leishmaniasis

M. B. de Rezende¹, H. M. Herrera¹, C. M. E. Carvalho¹, E. A. Carvalho Anjos^{1,2}, C. A. N. Ramos³, F. R. de Araujo⁴, J. M. Torres¹ and C. E. de Oliveira¹

1 Universidade Catolica Dom Bosco – UCDB, Campo Grande, MS, Brazil

2 Bolsista CAPES – Proc. Number 1218-13-1, University of Manitoba, Winnipeg, Canada

3 Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brazil

4 Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, Brazil

SHORT COMMUNICATION

Detection of *Leishmania* spp. in Bats from an Area of Brazil Endemic for Visceral Leishmaniasis

M. B. de Rezende¹, H. M. Herrera¹, C. M. E. Carvalho¹, E. A. Carvalho Anjos^{1,2}, C. A. N. Ramos³, F. R. de Araújo⁴, J. M. Torres¹ and C. E. de Oliveira¹

¹ Universidade Católica Dom Bosco – UCDB, Campo Grande, MS, Brazil

² Bolsista CAPES – Proc. Number 1218-13-1, University of Manitoba, Winnipeg, Canada

³ Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brazil

⁴ Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, Brazil

Keywords:

Chiroptera; *Leishmania infantum*; natural infection; diagnostic; molecular assay

Correspondence:

C. E. de Oliveira. Universidade Católica Dom Bosco – UCDB, Campo Grande 79117-900, MS, Brazil. Tel.: +55 67 3312-3768; Fax: +55 67 3312-3301; E-mail: carinaelisei@yahoo.com.br

Received for publication February 19, 2016

doi:10.1111/tbed.12597

Summary

The multihost parasites *Leishmania* spp. infect a broad range of wild mammalian species including bats. Several species of bats have adapted to a variety of food resources and shelters in urban areas. This study aimed to detect *Leishmania* spp. DNA in bats present in forest fragments located in metropolitan areas endemic for leishmaniasis in Campo Grande, Mato Grosso do Sul (MS), Brazil. Blood samples were obtained from 80 individuals, including eight species of Phyllostomidae and one species of Vespertilionidae. Thirty of the 80 bats were positive for *Leishmania* spp. using conventional PCR, all belonging to the family Phyllostomidae. Eighteen samples tested by real-time PCR (qPCR) using specific primers for the kDNA of *Leishmania infantum* were positive. To the best of our knowledge, this is the first report detecting *Leishmania* spp. in *Platyrrhinus incarum* in addition to being the first reported detection of *L. infantum* in the bat species *Phyllostomus discolor*, *Platyrrhinus lineatus*, *Artibeus planirostris* and *Artibeus lituratus*. Our results show that bats can host *Leishmania* spp. in areas endemic for leishmaniasis, which must be taken into account in disease control operations by public health authorities.

Introduction

Bats (Mammalia, Chiroptera) constitute the second largest group of mammals, with approximately 1120 species documented across several continents and biomes. Brazil has nine families of bats, comprising 68 genera and 178 species, with 103 species inhabiting the *Cerrado* biome (IUCN, 2010; Nogueira et al., 2014). Some species of bats can adapt their feeding behaviours, surviving in forest fragments and sheltering in close proximity to cities (Silva et al., 1996; Oprea et al., 2009). Bats have important ecosystem functions owing to their roles as seed dispersers, pollinators and insect controllers. However, bats in urban areas can harbour and possibly transmit *Leishmania* spp., thereby acting as reservoir hosts (Lampo et al., 2000; Millán et al., 2014).

Leishmaniasis is caused by *Leishmania* species, which are obligate intracellular parasites of the mononuclear

phagocyte system (Malta et al., 2010). These digenetic protozoans present a complex life cycle involving vectors such as phlebotomine sand flies and several mammalian reservoir species, which vary according to ecological conditions (WHO, 2010).

While the most important aetiological agents of human leishmaniasis in the Americas include *Leishmania infantum*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis* and *Leishmania mexicana*, human visceral leishmaniasis (HVL), caused by *L. infantum*, has been reported as a particularly important emerging disease in South America (Alvar et al., 2012). More than 200 000 cases of HVL are estimated to occur worldwide each year, with more than 90% of cases concentrated in six countries, including Brazil, which has an average of 3118 annual cases of HVL (WHO, 2014). HVL is a severe chronic disease, currently reported in the urban and outlying areas of Campo Grande (CG), which is

the capital of the state of Mato Grosso do Sul (MS) in Brazil (Batista et al., 2012). Over the past 5 years, hundreds of people and thousands of dogs have been reportedly infected by *L. infantum* in CG (SINAN/MS, 2012).

Dogs have been considered the main domestic reservoir for infection by *L. infantum*. As a result, one of the control strategies in endemic areas is based on the systematic culling of seropositive dogs. However, this strategy does not prevent new cases of either HVL or canine visceral leishmaniasis (CVL), and parasitosis therefore continues to spread. Although *Leishmania* spp. are multihost parasites, that is they are capable of infecting a wide range of mammalian and vector host species (Woolhouse et al., 2001), few studies have investigated the roles of different mammalian host species on the maintenance of *Leishmania* spp. in endemic areas (Roque and Jansen, 2014). As a consequence, this disease presents an ongoing public health problem and continues to expand its range (Alvar et al., 2012).

This study arose from surveys carried out by a team of researchers who work with the ecology and conservation of bats in urban areas of CG. Because this city is endemic for leishmaniasis and bats have been documented as being infected by *Leishmania* spp. in different parts of Latin America (Savani et al., 2010; Shapiro et al., 2013; Berzunza-Cruz et al., 2015; Oliveira et al., 2015), we took the opportunity to investigate the presence and prevalence of *Leishmania* spp. in this taxonomic group.

Materials and Methods

Area of study

The study was conducted in CG city, which is the capital of the state of MS, Brazil. This city has a population of approximately one million distributed across an area of 8100 km² (IBGE, 2010). The weather is characterized by a wet, tropical savanna climate (Aw subtype) with two well-defined seasons (dry winter and wet summer) (Peel et al., 2007). The annual average temperature reported for this area is 23.3°C, and the annual rainfall is 1579.7 mm, with rainfall concentrated from November to March (Honer, 1993). Bats were collected in forest fragments around the city (Fig. 1).

Collection of animals

Animal collection was conducted between August 2012 and August 2014. Specimen capture was performed on 17 nights using five mist nets (two of 12 m × 2.5 m and three of 7 m × 2 m), which remained open for 12 h every night and were checked at intervals of 20 min. The total sampling effort employed in the catches was 26 600 h.m², calculated according to the method proposed by Straube and Bianconi (2002).

The bats were identified using morphological keys (Vizotto and Taddei, 1973; Gregorin and Taddei, 2002), sexed (Racey, 1988) and assigned to different age groups (juvenile or adult) (Anthony, 1988), and the forearm length (precision = 0.1 mm) and weight (precision = 1 g) were recorded. Blood samples were obtained from each animal by puncturing the uropatagial vein using a microknife (Bioland[®], Bioland Technology Shenzhen, Guangdong, China) and absorbing it into three discs (2 mm) of filter paper (DNA card kit for the collection, storage, transportation, preservation and extraction of biological samples: MGM[®], Curitiba, Brazil) before being stored in plastic tubes (1.5 ml).

After the samples were taken, the animals were released at the same capture site. Capture and handling were conducted in accordance with authorization from the Chico Mendes Institute for Conservation and Biodiversity (ICM-Bio) (SISBIO: 21548-2) and the Committee for Ethics in Animals of UCDB (007/2012).

Molecular diagnosis

DNA extraction

For the DNA extraction, each blood-soaked filter paper was washed for 5 min using the reagent Pure Plus (MGM[®] Curitiba, Brazil) and TE buffer (10 mM Tris-Cl, pH 7.5 1 mM EDTA) (two washes). Subsequently, 50 µl of TE buffer was added to each sample, and the samples were stored at -20°C until PCR analysis. For the samples analysed by real-time quantitative PCR (qPCR), 20% Chelex resin in TE buffer and ultrapure water was added to each tube containing the blood-soaked filter paper. The tubes were heated in a dry bath at 37°C for 1 h and then at 99°C for 7 min (Bereczky et al., 2005).

Polymerase chain reaction (PCR)

The PCR amplifications of the variable region of the kinetoplastid DNA (kDNA) minicircle molecules were carried out using the *Leishmania*-specific primers A: 5'-GGGGAGGGGCGTTCTGCGAA-3' and B: 5'-GGCCC ACTATATTACACCAACCCC-3' (Schubach et al., 1998). The reaction was carried out in a thermocycler (GeneAmp PCR System 9600; Applied Biosystems, Foster City, CA) at a final volume of 50 µl containing 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 0.2 mM of each deoxyribonucleotide, 5 pmol/µl of each primer, 1.25 U *Taq* DNA polymerase (Invitrogen[®], Carlsbad, CA, USA) and 5 µl of DNA extracted from the filter paper. Positive (DNA of *L. infantum chagasi*) and negative (ultrapure water) controls were used in each reaction. The thermocycler settings were 5 min at 94°C, followed by 30 cycles of 30 s each at 94°C, 30 s at 65°C, 30 s at 72°C and a final extension cycle for 7 min at 72°C. The amplification products were subjected to

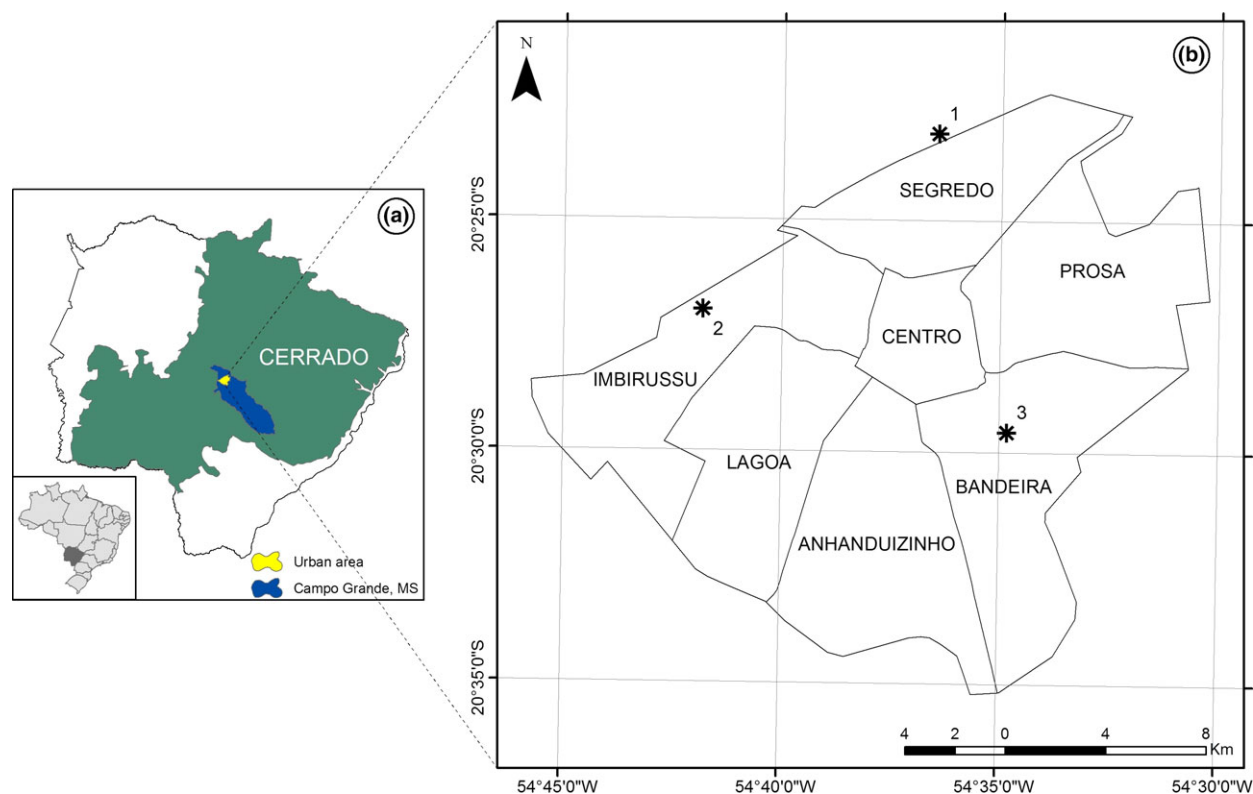


Fig. 1. Map of Campo Grande city, the capital of the state of Mato Grosso do Sul, Brazil, highlighting the capture locations of bats. Area 1, Instituto São Vicente (20°23'08"S, 54°36'27"W). Area 2, Centro de Educação Ambiental Odilza Fernandes Bittar – CEA Imbirussu (20°26'57.86"S and 54°41'48.91"W). Area 3, Coqueiral Chacara (20°29'34.16"S, 54°34'49.05"W). [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

electrophoresis at 100 V for 100 min in a 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide. The amplicons were viewed under ultraviolet light, and positive and negative controls were used in each electrophoresis.

Leishmania real-time PCR (qPCR)

The qPCR reactions were performed on 18 of the 30 positive samples for *Leishmania* spp. (due to the small amount of available DNA) using the *L. infantum*-specific primers LEISH-1 (5'-AACTTTTCTGGTCCTCCGGGTAG-3') and LEISH-2 (5'-ACCCCCAGTTTCCCGCC-3') and the probe FAM-5'-AAAAATGGGTGCAGAAAT-3' non-fluorescent quencher MGB, based on Francino et al. (2006). The reaction was performed in a final volume of 12.5 µl containing 6.25 µl of TaqMan® Universal PCR Master Mix (Life Technologies Corporation, Thermo Fisher, Carlsbad, CA, USA.). Each primer was used at a concentration of 900 nM, the probe at a concentration of 200 nM and 50 ng of DNA template. The amplification protocol consisted of an initial denaturation at 95°C for 3 min, followed by 42 cycles of denaturation (95°C for 10 s) and annealing–extension (60°C for 30 s). Positive (DNA of *L. infantum*) and negative (ultrapure water) controls were used in each run.

Results

We obtained biological samples from nine different species of bats belonging to the Phyllostomidae and Vespertilionidae families (Table 1). The expected fragments of 120 bp of kDNA from *Leishmania* spp. were observed in 30 of the 80 (37.5%) samples, from seven different species of bats. Negative and positive blood samples were tested twice to avoid false-negative and false-positive results. All 18 samples tested by qPCR were positive for the specific probe for *L. infantum*. In general, qPCR amplification occurred from the 32nd cycle.

Discussion

Our results showed the highest prevalence of phyllostomid species such as *Artibeus planirostris*, *Artibeus lituratus*, *Platyrrhinus lineatus* and *Carollia perspicillata*. These species are very abundant in the studied area, which has also been reported in other studies conducted in CG (e.g. Pulchério-Leite et al., 1999; Ferreira et al., 2010; Martins et al., 2014). Some bat families such as Vespertilionidae and Molossidae tend to avoid mist nets (Passos et al.,

Table 1. PCR- and qPCR-positive results in different species of bats collected in forest fragments of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

Family/Species	Collected	Number of Positive (%)a <i>Leishmania</i> spp.					Number of Positive (%)b <i>L. infantum</i>				
		Age		Gender		Total	Age		Gender		Total
		J	A	M	F		J	A	M	F	
Phyllostomidae											
<i>Artibeus planirostris</i>	27	2	5	3	4	7 (25.9)	1	1	1	1	2 (11.1)
<i>Artibeus lituratus</i>	22	6	4	4	6	10 (45.5)	4	5	1	8	9 (50)
<i>Platyrrhinus lineatus</i>	13	2	2	4	—	4 (30.8)	1	1	1	1	2 (11.1)
<i>Carollia perspicillata</i>	11	5	1	2	4	6 (54.5)	3	—	1	2	3 (16.6)
<i>Glossophaga soricina</i>	2	1	—	—	1	1 (50.0)	1	—	—	1	1 (5.5)
<i>Platyrrhinus helleri</i>	2	—	1	—	1	1 (50.0)	—	—	—	—	*
<i>Sturnira lilium</i>	1	—	—	—	—	neg	—	—	—	—	*
<i>Phyllostomus discolor</i>	1	—	1	1	—	1 (100.0)	—	1	1	—	1 (5.5)
Vespertilionidae											
<i>Myotis nigricans</i>	1	—	—	—	—	neg	—	—	—	—	*
Total	80	16	14	13	16	30 (37.5)	10	8	5	13	18

J, young; A, adult; F, feminine; M, masculine.

^aPCR.

^bqPCR.

*dot done.

2003) and so were certainly under-represented in our study.

The 37.5% prevalence of bats positive for *Leishmania* spp. may be an underestimate because we surveyed parasites inhabiting mononuclear phagocytic cells in whole blood. In addition, the collection of blood was performed using filter paper, and this technique yields small total amounts of DNA. However, this technique has previously been reported as being effective useful under field conditions and, importantly, does not require the killing of animals (Herrera et al., 2005; Oliveira et al., 2005).

In our study, despite the small amount of DNA extracted from the filter paper, it was used as a marker for the kDNA, which is highly repetitive and enabled the detection of *Leishmania* in the bats. In fact, studies describing qPCR assays targeting kDNA have proved to be highly sensitive for the detection, species discrimination and quantification of *Leishmania* spp. (Mary et al., 2004; Weirather et al., 2011; Pita-Pereira et al., 2012). Using the qPCR methodology of Francino et al. (2006), Solcà et al. (2014) verified the sensitivity and specificity of the qPCR technique in comparing the amplification profiles of *L. infantum* DNA to some other Old and New World leishmanias.

Here, we report new species of bats as an alternative hosts for *L. infantum*, such as *Phyllostomus discolor*, *P. lineatus*, *A. planirostris* and *A. lituratus*, in the studied area. Some species of bats reported as being infected by *Leishmania* spp. in the present study (*A. planirostris*, *C. perspicillata*, *Glossophaga soricina*, *Sturnira lilium*, *Myotis nigricans*) have been documented as being infected elsewhere in Latin America (Savani et al., 2010; Shapiro et al., 2013;

Berzunza-Cruz et al., 2015), demonstrating that bats can play an important role in the maintenance of *Leishmania* spp. in endemic areas.

Although *Lutzomyia longipalpis* is capable of feeding on *C. perspicillata* and *Glossophaga longirostris*, a congener species of *G. soricina*, under experimental conditions (Lampo et al., 2000), vectorial transmission in the natural environment has not yet been reported. However, because contact between bats and *L. longipalpis* in the urban environment can be expected because these taxa occupy the same habitats, such as inside or around human buildings (Deane and Deane, 1962; Esbérard et al., 1999; Quintela et al., 2011), natural transmission by feeding habits should be considered. Moreover, we should consider that the presence of parasite DNA in the blood of collected animals does not necessarily indicate vectorial transmission, as it does not provide enough evidence to indicate parasitic integrity within the host (Silva et al., 2005).

Bats may become infected by *Leishmania* spp. in the studied area by feeding on sand flies infected by leishmanias. In fact, the consumption of different food items by bats can vary in response to seasonal changes in available resources at different locations (Sih et al., 2011), forcing frugivorous or nectarivorous bats to supplement their diet with insects (Gardner, 1977; Mikich, 2002). This adaptive plasticity has already been recorded in the city of CG (Martins et al., 2014).

Thus, the oral route as a transmission mechanism for *Leishmania* in bats cannot be ruled out because (i) phlebotomines including *L. longipalpis* are very abundant in CG (De Oliveira et al., 2008; Silva et al., 2008; Cunha et al.,

2014), (ii) bats belonging to the family Phyllostomidae show a generalist diet, opportunistically consuming arthropods (Gardner, 1977; Bernard, 2002; Zortéa, 2003), (iii) *A. lituratus*, *A. planirostris* and *C. perspicillata*, which were found to be infected by *Leishmania* in the present study, have already been reported supplementing their diet with arthropods in the study area (Martins et al., 2014) and (iv) bats and *L. longipalpis* have overlapping crepuscular and nocturnal activity patterns (Rebêlo, 2001; Feliciangeli et al., 2004). Furthermore, it has previously been shown that bats can become infected by trypanosomatid species when they ingest parasitized insects (Thomas et al., 2007; Ramírez et al., 2014).

In the city of CG, thousands of *L. infantum* seropositive dogs are killed annually, but the increasing incidence of HVL and CVL shows that the existing control measures are not effective (Cunha et al., 2014). Therefore, the classic epidemiological approach involving dogs–shadflies–humans should be reconsidered in this urban environment. In this context, although dogs are the main reservoir for humans, some wild species such as bats as well as synanthropic opossums (*Didelphis albiventris*) (Humberg et al., 2012) could be contributing to the maintenance of *Leishmania* spp. in the studied area.

Funding

This project was funded by CNPq, FUNDECT-MS and Universidade Católica Dom Bosco (UCDB). The authors are grateful to Dr. Prof. Carla Cardozo Pinto de Arruda from the University Federal of Mato Grosso do Sul and Cristina Henriques from the FIOCRUZ/MS for providing *Leishmania* spp., and to the anonymous reviewer for suggestions.

References

- Alvar, J., I. D. Velez, C. Bern, M. Herrero, P. Desjeux, J. Cano, J. Jannin, and M. Boer, 2012: Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS ONE* 7, e35671.
- Anthony, E. L. P., 1988: Age determination in bats. In: Kunz, T. H. (ed.), *Ecological and Behavioral Methods for the Study of Bats*, pp. 47–58. Smithsonian Institution, Washington.
- Batista, L. F., M. Segatto, C. E. Guedes, R. S. Sousa, C. A. Rodrigues, J. C. Brazuna, J. S. Silva, S. O. Santos, D. Laranjeira, A. M. Macedo, A. Schrieffer, and P. S. Veras, 2012: An assessment of the genetic diversity of *Leishmania infantum* isolates from infected dogs in Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 86, 799–806.
- Bereczky, S., A. Mårtensson, G. J. Pedro, and A. Farnert, 2005: Short Report: Rapid DNA extraction from archive blood spots on filter paper for genotyping of *Plasmodium falciparum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 72, 249–251.
- Bernard, E., 2002: Diet, activity and reproduction of bat species (Mammalia, Chiroptera) in Central Amazonia, Brazil. *Rev. Bras. Zool.* 19, 173–188.
- Berzunza-Cruz, M., Á. Rodríguez-Moreno, G. Gutiérrez-Granados, C. González-Salazar, C. R. Stephens, M. Hidalgo-Mihart, C. F. Marina, E. A. Rebollar-Téllez, D. Bailón-Martínez, C. D. Balcells, C. N. Ibarra-Cerdeña, V. Sánchez-Cordero, and I. Becker, 2015: *Leishmania* (L.) *mexicana* infected bats in Mexico: novel potential reservoirs. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 28, e0003438.
- Cunha, R. C., R. Andreotti, M. C. Cominetti, and E. A. Silva, 2014: Detection of *Leishmania infantum* in *Lutzomyia longipalpis* captured in Campo Grande, MS. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 23, 269–273.
- De Oliveira, A. G., A. M. Marassá, C. A. Consales, M. E. Dorval, C. E. Fernandes, G. R. de Oliveira, R. P. Brazil, and E. A. Galati, 2008: Observations on the feeding habits of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Campo Grande, an endemic area of visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Acta Trop.* 107, 238–241.
- Deane, L. M., and M. P. Deane, 1962: Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. *Rev. Inst. Med. Trop.* 4, 198–212.
- Esbérard, C. E. L., E. M. Luz, and A. S. Chagas, 1999: Use of residence for bats refuges in the state of Rio de Janeiro January (Mammalia: Chiroptera). *Rev. Bras. Med. Veterinary.* 21, 17–20.
- Feliciangeli, M. D., J. C. Arrivillaga, A. Bravo, and F. Arias, 2004: Activity of *Lutzomyia pseudolongipalpis* and *L. longipalpis* s.l. (Diptera: Psychodidae) in Venezuela. *Parasite* 11, 273–278.
- Ferreira, C. M. M., E. Fischer, and A. Pulchério-Leite, 2010: Fauna de morcegos em remanescentes urbanos de Cerrado em Campo Grande, Mato Grosso do Sul. *Biota Neotrop.* 10, 155–160.
- Francino, O., L. Altet, E. Sánchez-Robert, A. Rodriguez, L. Solano-Gallego, J. Alberola, L. Ferrer, A. Sánchez, and X. Roura, 2006: Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmanioses. *Vet. Parasitol.* 137, 214–221.
- Gardner, A. L., 1977: Feeding habits. In: Barker, R. J., J. K. Jones Jr, and D. C. Carter (eds), *Biology of Bats of the New World Family Phyllostomatidae*, 2nd edn. pp. 293–350. Special Publications Museum Texas Tech University, Lubbock.
- Gregorin, R., and V. A. Taddei, 2002: Artificial key for identification of Brazilian molossids (Mammalia, Chiroptera). *J. Neotrop. Mammal.* 9, 13–32.
- Herrera, H. M., A. Norek, T. P. Freitas, O. V. Fernandes. Rade-maker, and A. M. Jansen, 2005: Domestic and wild mammals infection by *Trypanosoma evansi* in a pristine area of the Brazilian Pantanal Region. *Parasitol. Res.* 96, 121–126.
- Honer, M. R., 1993: Precipitação pluviométrica na região de Campo Grande, MS: uma análise do período 1970–1991. EMBRAPA-CNPQC, Campo Grande.

- Humberg, R. M., E. T. Oshiro, M. S. Cruz, P. E. M. Ribolla, D. P. Alonso, A. M. Ferreira, R. A. Bonamigo, N. Jr Tasso, and A. G. de Oliveira, 2012: *Leishmania chagasi* in opossums (*Didelphis albiventris*) in a urban area endemic for visceral leishmaniasis, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 87, 470–472.
- IBGE, 2010: Censo Demográfico. Available at <http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/temas.php?lang=&codmun=500270&idtema=1&search=mato-grosso-do-sul|campo-grandecenso-demografico-2010> (accessed April 22, 2015).
- IUCN, 2010: of Nature Red List of Threatened Species. Available at <http://www.iucnredlist.org/details/20468/0> (accessed April 30, 2015).
- Lampo, M., M. D. Feliciangeli, L. M. Marquez, C. Bastidas, and P. Lau, 2000: A possible role of bats as a blood source for the *Leishmania* vector *Lutzomyia longipalpis* *Leishmania* (*Viannia*). *J. Clin. Microbiol.* 40, 601–606.
- Malta, M. C., H. P. Tinoco, M. N. Xavier, A. L. Vieira, E. A. Costa, and R. L. Santos, 2010: Naturally acquired visceral leishmaniasis in non-human primates in Brazil. *Vet. Parasitol.* 169, 1193–1197.
- Martins, M. P. V., J. M. Torres, and E. A. C. Anjos, 2014: Dieta de morcegos filostomídeos (Mammalia, Chiroptera, Phyllostomidae) em fragmento urbano do Instituto São Vicente, Campo Grande, Mato Grosso do Sul. *Pap. Avulsos Zool.* 54, 299–305.
- Mary, C., F. Faraut, L. Lascombe, and H. Dumon, 2004: Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. *J. Clin. Microbiol.* 42, 5249–5255.
- Mikich, S. B., 2002: Dieta dos morcegos frugívoros (Mammalia, Chiroptera, Phyllostomidae) de um pequeno remanescente de Floresta Estacional Semidecidual do sul do Brasil. *Rev. Bras. Zool.* 19, 239–249.
- Millán, J., E. Ferroglio, and L. Solano-Gallego, 2014: Role of wildlife in the epidemiology of *Leishmania infantum* infection in Europe. *Parasitol. Res.* 113, 2005–2014.
- Nogueira, M. R., I. P. de Lima, R. Moratelli, V. D. C. Tavares, R. Gregorin, and A. L. Peracchi, 2014: Checklist of Brazilian bats, with comments on original records. *Check List* 10, 808–821.
- Oliveira, F. S., C. M. Q. Pires, R. P. Brazil, and R. S. Pacheco, 2005: PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. *Vet. Parasitol.* 129, 219–227.
- Oliveira, F. M., L. H. Costa, T. L. Barros, P. K. Ito, F. A. Colombo, C. de Carvalho, W. A. Pedro, L. H. Queiroz, and C. M. Nunes, 2015: First detection of *Leishmania* spp. DNA in Brazilian bats captured strictly in urban areas. *Acta Trop.* 150, 176–181.
- Oprea, M., P. Mendes, T. B. Vieira, and A. D. Ditchfield, 2009: Do wooded streets provide connectivity for bats in an urban landscape? *Biodivers. Conserv.* 18, 2361–2371.
- Passos, F. C., W. R. Silva, W. A. Pedro, and M. R. Bonin, 2003: Frugivoria em morcegos (Mammalia, Chiroptera) no Parque Estadual Intervales, sudeste do Brasil. *Rev. Bras. Zool.* 20, 511–517.
- Peel, M. C., B. L. Finlayson, and T. A. McMahon, 2007: Update world map of the Koppen-Geiger climate classification. *Hydrol. Earth Syst. Sci.* 11, 1633–1644.
- Pita-Pereira, D., R. Lins, M. P. Oliveira, R. B. Lima, B. A. Pereira, O. C. Moreira, R. P. Brazil, and C. Brito, 2012: SYBR green-based real-time PCR targeting kinetoplast DNA can be used to discriminate between the main etiologic agents of Brazilian cutaneous and visceral leishmaniasis. *Parasit. Vectors* 5, 15.
- Pulchério-Leite, A., V. A. Taddei, and M. Meneghelli, 1999: Morcegos da Região de Campo Grande, Estado do Mato Grosso do Sul, com ênfase para as espécies urbanas. *Ens. Cienc.* 3, 113–129.
- Quintela, F. M., C. Ibarra, deOliveira S. V., I. G. Medvedovskiy, F. Correa, D. Gianuca, A. Gava, and S. M. Pacheco. 2011: Mammalia, Chiroptera, Rio Grande, state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Check List* 7, 443–447.
- Racey, P. A., 1988: Reproductive assessment in bats. In: Kunz, T. H. (ed.), *Ecological and Behavioral Methods for the Study of Bats*. pp. 31–46. Smithsonian Institution, Washington.
- Ramírez, J. D., G. Tapia, G. Muñoz, C. Poveda, L. M. Rendón, E. Hincapié, and F. Guhl, 2014: Trypanosome species in Neotropical bats: biological, evolutionary and epidemiological implications. *Infect. Genet. Evol.* 22, 250–256.
- Rebêlo, J. M. M., 2001: Frequência horária e sazonalidade de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) na Ilha de São Luís, Maranhão, Brasil. *Cad. Saúde Pública* 17, 221–227.
- Roque, A. L. R., and A. M. Jansen, 2014: Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 3, 251–262.
- Savani, E. M. M., M. F. Almeida, M. C. G. O. Camargo, S. R. N. D'Auria, M. M. S. Silva, M. L. Oliveira, and D. Sacramento, 2010: Detection of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* and *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* in Brazilian bats. *Vet. Parasitol.* 168, 5–10.
- Schubach, A., F. Haddad, M. P. N. Oliveira, W. Degraive, C. Pirmez, G. Grimalde, and O. Fernandes, 1998: Detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction in scars of treated human patients. *J. Infect. Dis.* 178, 911–914.
- Shapiro, J. T., M. S. C. Lima Junior, M. E. C. Dorval, A. O. França, M. F. C. Matos, and M. O. Bordignon, 2013: First record of *Leishmania braziliensis* presence detected in bat, Mato Grosso do Sul, southwest Brazil. *Acta Trop.* 128, 171–174.
- Sih, A., M. C. Ferrari, and D. J. Harris, 2011: Evolution and behavioral responses to human-induced rapid environmental change. *Evol. Appl.* 4, 367–387.
- Silva, M. M. S., N. M. S. Harmani, E. F. B. Gonçalves, and W. Uieda, 1996: Bats from the metropolitan region of São Paulo, southeastern Brazil. *Chiropt. Neotrop.* 2, 39–41.
- Silva, E. S., C. M. Gontijo, and M. N. Melo, 2005: Contribution of molecular techniques to the epidemiology of neotropical *Leishmania* species. *Trends Parasitol.* 21, 550–552.
- Silva, E. A., R. Andreotti, E. S. Dias, J. C. Barros, and J. C. M. Brazuna, 2008: Detection of *Leishmania* DNA in

- phlebotomines captured in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Exp. Parasitol.* 119, 343–348.
- SINAN/MS, 2012: Informe epidemiológico das leishmanioses no 1/2012. Available at <http://www.saude.ms.gov.br/control/ShowFile.php?id=113329> (accessed April 22, 2015).
- Solcà, M. S., L. A. Bastos, C. E. S. Guedes, M. Bordoni, L. S. Borja, D. F. Laranjeira, P. G. S. E. Tuy, L. D. A. F. Amorim, E. G. Nascimento, G. G. S. Oliveira, W. L. C. dos-Santos, D. B. M. Fraga, and P. S. T. Veras, 2014: Evaluating the accuracy of molecular diagnostic testing for canine visceral leishmaniasis using latent class analysis. *PLoS ONE* 9, e103635.
- Straube, F. C., and G. V. Bianconi, 2002: Sobre a grandeza e a unidade utilizada para estimar esforço de captura com utilização de redes-de-neblina. *Chirop. Neotrop.* 8, 150–152.
- Thomas, M. E., J. J. Rasweiler, and A. D'Alessandro, 2007: Experimental transmission of the parasitic flagellates *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* between triatomine bugs or mice and captive neotropical bats. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102, 559–565.
- Vizotto, L. D., and V. A. Taddei, 1973: Key to identification of Brazilian chiropractors. *Bol. Cienc. Fac. Filos. Cienc. São Rio Preto.* 1, 1–72.
- Weirather, J. L., S. M. Jeronimo, S. Gautam, S. Sundar, M. Kang, M. A. Kurtz, R. Haque, A. Schrieffer, S. Talhari, E. M. Carvalho, J. E. Donelson, and M. E. Wilson, 2011: Serial quantitative PCR assay for detection, species-discrimination and quantification of *Leishmania* spp. in human samples. *J. Clin. Microbiol.* 49, 3892–3904.
- WHO, 2010: Control of the leishmaniasis. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22–26 March 2010. WHO technical report series 949. World Health Organization, Geneva. Available at: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44412/1/WHO_TRS_949_eng.pdf (accessed January 10, 2016)
- WHO, 2014: Leishmaniose, Epidemiological Report of the Americas. Available at http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=21608&Itemid= (accessed January 10, 2016)
- Woolhouse, M. E., L. H. Taylor, and D. T. Haydon, 2001: Population biology of multi host pathogens. *Science* 292, 1109–1112.
- Zortéa, M., 2003: Reproductive patterns and feeding habits of three nectarivorous bats (Phyllostomidae: Glossophaginae) from the Brazilian Cerrado. *Braz. J. Biol.* 63, 159–168.