

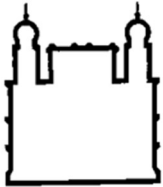
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Biologia Parasitária

INFECÇÃO POR TRIPANOSOMATÍDEOS EM MORCEGOS
(MAMMALIA: CHIROPTERA) CAPTURADOS EM DIFERENTES ÁREAS
DO BRASIL E O DESENVOLVIMENTO DE UMA PCR MULTIPLEX
COMO FERRAMENTA DIAGNÓSTICA DA INFECÇÃO POR
LEISHMANIA SPP. EM MAMÍFEROS SILVESTRES

RENATA DE CÁSSIA PIRES

Rio de Janeiro
Junho de 2017



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

RENATA DE CÁSSIA PIRES

Infecção por tripanosomatídeos em morcegos (Mammalia: Chiroptera) capturados em diferentes áreas do Brasil e o desenvolvimento de uma PCR Multiplex como ferramenta diagnóstica da infecção por *Leishmania* spp. em mamíferos silvestres.

Tese de doutorado apresentada à coordenação do Programa de Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor (a) em Ciências, área de concentração em Ecologia e Epidemiologia. A tese foi desenvolvida no Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos do Instituto Oswaldo Cruz, com suporte financeiro da CAPES e CNPQ.

Orientador: Dr. André Luiz Rodrigues Roque

RIO DE JANEIRO
Junho de 2017

Pires, Renata de Cássia.

Infecção por tripanosomatídeos em morcegos (Mammalia: Chiroptera) capturados em diferentes regiões do Brasil e o desenvolvimento de uma PCR Multiplex como ferramenta diagnóstica da infecção por *Leishmania* spp. em mamíferos silvestres / Renata de Cássia Pires. - Rio de Janeiro, 2017.

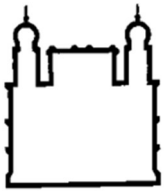
172 f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2017.

Orientador: André Luiz Rodrigues Roque.

Bibliografia: f. 87-118

1. Morcegos . 2. Reservatórios Silvestres. 3. *Leishmania* spp. 4. Tripanosomatídeos. 5. PCR Multiplex. I. Título.



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTORA: RENATA DE CÁSSIA PIRES

INFECÇÃO POR TRIPANOSOMATÍDEOS EM MORCEGOS (MAMMALIA: CHIROPTERA) CAPTURADOS EM DIFERENTES ÁREAS DO BRASIL E O DESENVOLVIMENTO DE UMA PCR MULTIPLEX COMO FERRAMENTA DIAGNÓSTICA DA INFECÇÃO POR *LEISHMANIA* SPP. EM MAMÍFEROS SILVESTRES.

ORIENTADOR: Dr. André Luiz Rodrigues Roque

Aprovada em: 28/06/2017

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Constança Britto - Presidente e Revisora (IOC - FIOCRUZ/RJ)

Prof. Dra. Célia Gontijo (Centro de Pesquisa René Rachou - FIOCRUZ/MG)

Prof. Dr. Ricardo Moratelli (Estação Fiocruz da Mata Atlântica - FIOCRUZ/RJ)

Prof. Dra. Mariana Cortez Boité (IOC - FIOCRUZ/RJ)

Prof. Dra. Verônica Amaral (Universidade Federal Fluminense - UFF/RJ)

Rio de Janeiro, 28 de junho de 2017



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

DECLARAÇÃO

Declaramos, para fins curriculares, que **Renata de Cássia Pires**, sob orientação do Dr. André Luiz Rodrigues Roque, foi aprovada em 28/06/2017, em sua defesa de tese de doutorado intitulada: **“INFECÇÃO POR TRIPANOSOMATÍDEOS EM MORCEGOS (MAMMALIA: CHIROPTERA) CAPTURADOS EM DIFERENTES ÁREAS DO BRASIL E O DESENVOLVIMENTO DE UMA PCR MULTIPLEX COMO FERRAMENTA DIAGNÓSTICA DA INFECÇÃO POR LEISHMANIA SPP. EM MAMÍFEROS SILVESTRES.”**, área de concentração: Ecologia e Epidemiologia. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr^a. Constança Felícia de Paoli de Carvalho Britto - IOC/FIOCRUZ (presidente), Dr^a. Célia Maria Ferreira Gontijo - CPqRR/MG e Dr. Ricardo Moratelli Mendonça da Rocha - CFMARJ e como suplentes: Dr^a. Mariana Côrtes Boité - IOC/FIOCRUZ e Dr^a. Verônica Figueiredo do Amaral - UFF/RJ.

A Pós-graduação *Stricto sensu* em Biologia Parasitária (Mestrado e Doutorado) está credenciada pela CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, de acordo com Portaria nº. 2720, de 20.12.89, do Ministério da Educação e Cultura, tendo validade no Brasil para todos os efeitos legais, e alcançando conceito 7 (sete) na última avaliação trienal da CAPES.

Informamos ainda que, de acordo com as normas do Programa de Pós-graduação, **a liberação do Diploma e do Histórico Escolar está condicionada à entrega da versão definitiva da dissertação/tese em capa espiral (1 cópia), juntamente com o termo de autorização de divulgação da dissertação/tese on line e o CD-rom com a dissertação completa em PDF.**

Rio de Janeiro, 28 de junho de 2017.

Rafael Maciel de Freitas
Matrícula SIAPE 1603050
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária
Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz

Documento registrado sob nº DCE-4617/16 no livro nº I, folha 68v em 28/06/2017.

*Dedico esta tese à minha mãe,
Maria de Cássia Morais Pires e ao
meu pai, **Cristóvão Tiago Pires**
(sempre presente)*

Amo vocês!!

***Força e coragem à nós, jovens
pesquisadores brasileiros!!***

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, eu preciso agradecer, **à vida!!** Com **“tudo de bom e de não tão bom”** que ela me ofereceu ao longo da minha jornada. Sou extremamente grata e feliz por toda minha trajetória de vida, com todos os acertos e desacertos que me possibilitaram estar aqui hoje!! Viver é tão bom!!! E assim como os ciclos de transmissão, objeto de estudo deste trabalho, a vida é tão dinâmica e me apresentou tropeços dos quais eu queria evitar, mas também me apresentou novas pessoas, sensações, cores e oportunidades às quais serei grata eternamente!!

Agradeço, sem palavras que conseguem mensurar a minha gratidão, à minha mãe, **Maria de Cássia Morais Pires**. Mãe, sua força juntamente com sua serenidade e sabedoria foram fundamentais para o desenvolvimento desta tese. Não há palavras para agradecer o quanto você foi e é fundamental na minha vida. Te amo e te quero ter como exemplo sempre!! Obrigada pelo carinho tão singelo que só as mães podem oferecer!! Ir embora sempre me dói, um pedacinho meu fica aí mas levo comigo uma parte sua, grande, cheia de amor e coragem que me fazem companhia e acalmam meu coração nos dias ruins. Obrigada sempre!! Eu te amo!! Ao meu irmão, **Tiago Pires**, para mim, meu eterno **Juninho!!** Você é meu exemplo de responsabilidade, trabalho e seriedade!! Obrigada por estar sempre presente e cuidando de mim, não só nesses quatro anos de doutorado, mas também ao longo desses 30 que eu já existo na sua vida!! Eu te amo e te admiro, seu peça rara!! Ao meu irmão de vida, **Marlon di Paula!!** Você me conhece há tanto tempo e apesar da distância nessa caminhada da vida, o carinho e a amizade que sentimos um pelo outro continuam exatamente o mesmo. Te amo e te quero para toda a minha vida, independentemente de onde eu ou você esteja vivendo!! Aos meus primos **Anderson Xavier e Raquel Roseira!!** Obrigada por me receberem sempre tão bem e com um sorriso aconchegante no rosto durante os meus retornos à Minas. Eu amo vocês, como irmãos de verdade!! E falando em família, o pilar parte mais importante para o desenvolvimento deste trabalho, eu não posso deixar de agradecer ao **Cipó!!** Sim, ele é da família!! Meu amigo mais fiel e companheiro durante todas as etapas do doutorado!! Acredito que somente você tenha me visto sendo eu mesma em todos os momentos desse doc!! Obrigada por tudo!! Te amo demais dog!!

Gratidão especial às amigas antigas e verdadeiras de Belo Horizonte, principalmente a **Bruna Jota (Bruninha)**, e a **Patrícia Mendes (Paty) !!** Muito obrigada por estarem comigo desde o início e acompanharem de perto, cada momento, ao longo de todos esses anos. Mesmo sem compreender muito bem o que eu fazia, estiveram ali, nos momentos de êxtase e de muita felicidade e também, nos momentos não tão felizes. Agradeço ao meu lindo presentinho de Recife, **Myllena Beltrão**. Você passou de amiga à colaboradora e peça imprescindível em um dos artigos deste trabalho. Muito obrigada pelo carinho e amizade de sempre, seja no Brasil, na Austrália ou em qualquer lugar desse mundão. À minha **big yellow, Kkk!! Anna Carolina Forneiro Aguiar**, sua amizade foi fundamental para a finalização desta tese. Não imaginava que nós duas, calouras na UFSJ, fôssemos seguir na carreira acadêmica e que a vida nos colocaria em contato, de novo, aqui no Rio. Muito obrigada pelos devaneios, conversas e companhia que deixam minha vida mais leve e mais engraçada!! Não posso deixar de agradecer à minha linda, **Andressa Suzigan!!** Embora a rotina tenha nos distanciado geograficamente, a nossa amizade se fortalece a cada reencontro e eu só posso ser muito grata a você, por tudo!!

Agradeço a todos do LabTrip!! Obrigada Valquíria Trajano, Maria Felipe (Lippo), Dra. Juliana Barros, Dra. Valdirene Lima e Dra. Samanta Xavier, pelo carinho que sempre tiveram comigo!! Gratidão especial ao **Marcão e ao Carlos!!** Aprendi muito com vocês durante as intermináveis leituras de lâminas!! Agradecimento especial ao **Bruno Alves, o famoso Peppa Pig!!** Sua presença sempre deixa os dias de trabalho mais leves e engraçados!! Agradeço a todos do laboratório, foi um prazer poder ter trabalhado aqui ao longo desses seis anos e compartilhado um pouquinho desse amor, carinho e respeito que existe nessa grande família, chamada LabTrip!! Às minhas lindas do Lauro Travassos, **Edilene Pontes, Tainan Guedes, Elena D'Andrea, Elida Vasconcelos e Camila Rodrigues**. Poder ensinar vocês, foi uma via de mão dupla onde eu mais aprendi e ainda aprendo bastante com cada uma. A companhia de vocês foi fundamental em toda a dispendiosa parte de bancada e ajudaram a diminuir um pouco a solidão naquele terrível Lab., quase abandonado!! Agradeço à **Alessandra Filgueiras** e a **Diana Azevedo** por estarem sempre próximas nesses últimos dois anos, mas principalmente por dividirem comigo as dores, angústias e alegrias desse fim de tese!! Obrigada meninas!!

Um agradecimento especial à **Camila Lopes, Cristiane Varella, Isabel di Azevedo e Maria Augusta Dario!!** Meninas, vocês foram fundamentais, no laboratório e na vida, ao longo de todo esse processo!! De fato, o que a ciência uniu, o **CoolerTrip** fortaleceu. Cada uma de vocês, com suas particularidades, me encantam e fazem bem!! Muito obrigada pela amizade, carinho, respeito e apoio!! Tudo o que vivemos ao longo desse tempo, serviu para fortalecer ainda mais esse laço!! Vou levar os momentos vividos para sempre na memória!! E que o término desse doutorado não seja o fim do velho e bom cooler!! O que começou no campo da Fiocruz, já se expandiu pela cidade e agora ele vai ao nosso encontro onde quer que possamos estar!!

Agradeço ao **Dr. Pedro Estrela**, do Laboratório de Mamíferos da UFPB, por me permitir fazer parte dessa grande equipe de ecólogos, mastozoólogos e parasitologistas, a qual tive a honra de trabalhar e aprender muito na Rebio!! Agradeço pela parceria, ensinamentos, conhecimento de campo e discussões científicas que me possibilitaram ser mais crítica mais racional frente ao meu trabalho. Agradeço também à **Dra. Fabiana Rocha** (eterna LabTrip e agora, Laboratório de Mamíferos – MAME/UFPB), que tem uma gentileza, simpatia, amor pela ciência, pelos animais e pelo próximo que me encantam. Com você eu aprendi a ser uma profissional firme, mas muito mais humana. Muito obrigada por tudo, Dra. Bia!! Obrigada pela amizade, carinho, cafés e ótimas discussões científicas!! Gratidão também a todos da Rebio Guaribas, Mamanguape, Paraíba, onde parte deste doutorado foi executado. Agradecimento mais que especial à alguns integrantes do MAME que se tornaram amigos de vida!! **Emmanuel Messias (Messi), Hannah Nunes e Jeaneson Sales !!** Vocês são meus presentes do **PPBat** que vou levar para a vida, que seja ela na Paraíba, em Recife, em Minas, no Rio ou no Canadá!!

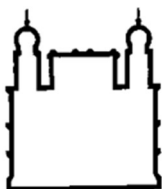
Agradeço a todos Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose, especialmente à **Dra. Elisa Cupolillo**, pela sua grande competência científica e por ter me recebido tão bem em seu grupo de pesquisa. Agradeço também à **Dra. Mariana Boité**, que me acompanha desde o mestrado, sempre muito carinhosa, paciente, firme e com uma sabedoria impecável ao discutir cada passo de nossos experimentos e analisar todos os possíveis resultados dentro desse fantástico, mas nada fácil mundo da taxonomia molecular.

Sempre vou ter uma gratidão eterna à **Dra. Ana Jansen**, chefe do LabTrip, e que me permitiu estar em seu laboratório. Obrigada por ter me recebido sempre tão bem e de forma tão fraternal!! Obrigada pelas discussões científicas que sempre me instigaram a pensar e fazer ciência. Te agradeço pela sabedoria, carinho e humildade em cada fala, e em todos os aspectos da vida!! Sem o seu **SIM**, nada disso teria acontecido!! **Muito obrigada Dra. Ana, de verdade!!**

Um agradecimento especial e muito importante, ao meu orientador, **Dr. André Roque!!** Obrigada pela confiança, paciência, perseverança, firmeza e respeito ao longo dessa trajetória!! Muito obrigada pela condução impecável, e ao mesmo tempo humana, em todas as etapas desse trabalho, sua orientação, seriedade, ensinamentos e conselhos me ajudaram muito crescer como profissional!! Você é um exemplo de pessoa, pesquisador e orientador e eu sou muito grata por ter sido sua aluna ao longo desses seis anos!! Muito obrigada mesmo!!

Obrigada também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pela concessão de auxílios financeiros que auxiliaram o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço, de coração, a todos que contribuíram nesta tese, o meu sincero e expressivo muito obrigada!



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

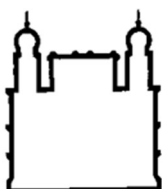
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Infecção por tripanosomatídeos em morcegos (Mammalia: Chiroptera) capturados em diferentes áreas do Brasil e desenvolvimento de uma PCR Multiplex como ferramenta diagnóstica da infecção por *Leishmania* spp. em mamíferos silvestres.

Renata de Cássia Pires - RESUMO

A capacidade de voo verdadeiro dos morcegos os permite explorar uma diversidade de ambientes com características epidemiológicas distintas. Embora sejam hospedeiros de outros tripanosomatídeos, sua participação no ciclo de transmissão de *Leishmania* spp. ainda é subestimada. Nesse sentido buscamos identificar a infecção em amostras de baço de morcegos previamente coletadas em seis localidades do Brasil, além de duas expedições realizadas em uma área de transmissão de Leishmaniose (Rebio Guaribas/PB). Entendendo a necessidade de refinar o diagnóstico molecular no sentido de evitar resultados falso-negativos, padronizamos um sistema de PCR Multiplex capaz de detectar simultaneamente a infecção por *Leishmania* spp. através do kDNA e a viabilidade da amostra por meio da detecção de um fragmento de DNA constitutivo do hospedeiro mamífero (gapdh). Das amostras de baço previamente coletadas 23,2% (32/138) foram positivas para *Leishmania* spp. As coletas realizadas na Rebio resultaram em 354 morcegos capturados, dos quais 183 foram examinados frente a infecção por tripanosomatídeos. Em quatro animais foi possível o isolamento de três espécies de *Trypanosoma*, a saber: *T. cruzi* TcI, *T. dionisii*, além do primeiro relato de *T. marinkelai* em *Micronycteris minuta*. Não foi possível o isolamento de *Leishmania* spp. entre as culturas de fragmentos de pele, baço ou fígado, entretanto no diagnóstico molecular 37,7% (69/183) foram positivos para o kDNA de *Leishmania* spp. Sete espécies, do total de 15 analisadas, foram relatadas, pela primeira vez, como hospedeiros de *Leishmania* spp. no Brasil. No geral, dentre as 101 amostras kDNA positivas, realizamos a PCR direcionada para o marcador HSP70(234) em 64, com amplificação de 76,5% delas (n=49). Destas, 37 foram submetidas ao sequenciamento, porém não obtiveram qualidade suficiente para serem analisadas. A clonagem gênica foi realizada em 27 amostras, porém não foi possível a identificação do inserto e a caracterização das espécies. O sistema de PCR Multiplex foi desenhado para detectar um fragmento de 212pb do domínio catalítico do gene constitutivo gapdh, dentro das condições previamente estabelecidas para o diagnóstico de 120pb do kDNA de *Leishmania* spp. As melhores condições de amplificação foram obtidas usando tanto a enzima TaqDNA HiFidelity quanto o pré-mix de PCR por beads (Ge Healthcare®) sob a seguinte ciclagem: 95°C por 1 min, seguido de 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 61°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos e extensão final a 72°C por 1 min. O teste foi capaz de detectar até 0,1ng de DNA de *Leishmania* em 100ng de DNA de mamífero. A técnica se mostrou eficaz quando testadas em amostras de 106 mamíferos silvestres, utilizando tecidos de pele, baço e fígado, de mais de 20 espécies de mamíferos silvestres de quatro ordens: Chiroptera, Didelphimorphia, Lagomorpha e Rodentia. A reprodutibilidade da técnica permite que este teste possa ser incorporado a rotina do diagnóstico molecular de *Leishmania* spp. em mamíferos silvestres. A diversidade de morcegos naturalmente infectados e o seu encontro em todas as localidades analisadas, demonstra que esses animais são hospedeiros de espécie(s) de *Leishmania* em diferentes regiões do país, incluindo áreas endêmicas da parasitose e que o seu papel como reservatórios silvestres ainda necessita ser melhor definido. O monitoramento contínuo destes animais em expedições que busquem não somente o diagnóstico da infecção por *Leishmania* sp, mas que avancem no sucesso da caracterização em nível específico, é fundamental para o conhecimento das espécies envolvidas em cada localidade, em especial devido à complexidade e dinamicidade da transmissão destes parasitos na natureza.

Palavras-chave: Morcegos, Reservatórios silvestres, *Leishmania* spp., Tripanosomatídeos, PCR Multiplex.



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Natural infection of trypanosomatid species in bats (Mammalian: Chiroptera) captured in different regions of Brazil and development of Multiplex PCR as a toll diagnosis for *Leishmania* spp. infection in wild mammals.

Renata de Cássia Pires – ABSTRACT

The ability to fly allow bats to explore a huge diversity of environments with distinct epidemiological characteristics. Although they are hosts of other trypanosomatid species, their participation in the transmission cycle of *Leishmania* spp. is still underestimated. In this sense, we searched for *Leishmania* infection in spleen samples of bats previously collected in six localities from Brazil; besides two field expeditions performed in a Leishmaniasis transmission area (Rebio Guaribas/PB). Aiming to refine the molecular diagnosis in order to avoid false negative results, we standardized a Multiplex PCR system able to simultaneously diagnose the *Leishmania* infection through kDNA detection and the viability of the sample by the detection of a constitutive DNA fragment of the mammalian host (*gapdh*). Of the previously collected spleen samples, 23.2% (32/138) were positive for *Leishmania* spp. The scientific expeditions made in Rebio resulted in 354 captured bats, from which 183 were examined for trypanosomatid infection. In four animals, it was possible to isolate three *Trypanosoma* species: *T. cruzi* TcI, *T. dionisii*, and the first report of *T. marinkeleri* in *Micronycteris minuta*. It was not possible to isolate parasites from cultures of skin, spleen or liver fragments; however, in the molecular diagnosis, 37.7% (69/183) were positive for the *Leishmania* spp. kDNA. Seven out of 15 captured species were reported for the first time as hosts of *Leishmania* spp. in Brazil. Of the 101 kDNA positive samples, we performed the PCR directed to the HSP70 (234) target in 64 samples, with PCR amplification in 76.5% of them (n=49). From those, 37 were submitted to DNA sequencing, but did not generate sequences with enough quality to be analyzed. Gene cloning was performed in 27 samples, but it was not possible to identify the DNA insert and characterize the *Leishmania* species. The Multiplex PCR system was designed to detect a 212bp fragment of the catalytic domain of the constitutive *gapdh* gene, using the conditions previously established for the diagnosis of a 120bp fragment of *Leishmania* kDNA. The established amplification conditions were obtained using both the HiFidelity TaqDNA enzyme and the Pre-Mix PCR beads (Ge Healthcare®) under the following cycling conditions: 95°C for 1 min followed by 30 cycles of 95°C for 30 s, 61°C for 30 s, and 72°C for 30 s and a final extension at 72°C for 1 min. The system was able to detect up to 0.1ng of *Leishmania* DNA in 100ng of mammal DNA. This technique proved effective when tested on skin, spleen and liver samples derived from 106 wild mammals belonging to more than 20 species from four mammal orders: Chiroptera, Didelphimorphia, Lagomorpha and Rodentia. The reproducibility of this technique allows its incorporation into the routinely molecular diagnosis of *Leishmania* spp. in wild mammals. The species diversity of the naturally infected bats and their encounter in all analyzed localities demonstrate that these animals are hosts of *Leishmania* species in different regions of the country, including endemic areas, and that their role as wild reservoirs still needs be clarified. The continuous monitoring of these animals in expeditions that not only diagnose the infection by *Leishmania* sp., but also achieve to successfully characterize the parasite in specific level, is essential for expanding the knowledge of the involvement of bats in *Leishmania* sp. transmission cycle. This is especially important due to the complexity and dynamicity of the transmission cycle of those parasites in nature.

Key words: Bats, Wild reservoir, *Leishmania* spp, Trypanosomatid, PCR Multiplex

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	xv
LISTA DE TABELAS	xvi
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xvii
LISTA DE ANEXOS	xix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Morcegos (Mammalia: Chiroptera)	1
1.2 Hospedeiros e reservatórios silvestres	2
1.3 Tripanosomatídeos	3
1.3.1 <i>Trypanosoma</i> sp.	6
1.3.2 <i>Leishmania</i> sp.	7
1.4 Morcegos como hospedeiros de parasitos	9
1.5 Morcegos como hospedeiros de tripanosomatídeos	13
1.6 Diagnóstico de infecção por tripanosomatídeos	16
1.6.1 Diagnóstico molecular da infecção por <i>Trypanosoma</i> spp.	19
1.6.2 Diagnóstico molecular da infecção por <i>Leishmania</i> spp.	21
1.7 Sistema Multiplex de diagnóstico molecular	23
2. JUSTIFICATIVA	27
3. OBJETIVOS	30
3.1 Objetivos específicos	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 Declaração de comitê de ética	31
4.2 Amostras provenientes da Coleção de Baços	31
4.3 Amostras obtidas em trabalho de campo	32
4.3.1 Captura e coleta de animais	33
4.4 Diagnóstico Parasitológico	34

4.5	Caracterização Molecular.....	35
4.5.1	<i>Trypanosoma</i> sp.....	35
4.5.2	<i>Leishmania</i> spp.....	36
4.6	Desenvolvimento de PCR Multiplex.....	40
4.6.1	Desenho dos iniciadores e análise in sílica.....	40
4.6.2	Amostras de DNA controle.....	41
4.6.3	Padronização da PCR Multiplex.....	41
4.6.4	Teste de sensibilidade.....	42
4.6.5	Reações de PCR Multiplex em mamíferos silvestres	42
5.	RESULTADOS.....	44
5.1	Diagnóstico Molecular de <i>Leishmania</i> spp. em amostras de baços	44
5.2	Rebio Guaribas	45
5.2.1	Quiropterofauna	46
5.2.2	Diagnóstico Parasitológico e Molecular	49
5.2.3	Análise molecular da infecção por <i>Leishmania</i> spp.	50
5.3	PCR Multiplex.....	57
6.	DISCUSSÃO	62
7.	CONCLUSÕES.....	85
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
9.	LISTA DE ANEXOS.....	119
Anexo 1	Comissão de Ética.....	119
Anexo 2	Ministério do Meio Ambiente 2014.....	122
Anexo 3	Ministério do Meio Ambiente 2015.....	126
Anexo 4	Marcadores moleculares - PCR Multiplex.....	130
Anexo 5	Análise in silico do gene <i>GAPDH</i>	131
Anexo 6	Artigo 2014 - Plos Neglected Tropical Diseases.....	133
Anexo 7	Artigo 2017 - Plos One.....	142

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	As principais classes morfológicas de tripanosomatídeos.....	4
Figura 2.	Classificação atual de tripanosomatídeos.....	5
Figura 3.	DNA do cinetoplasto presente em todo Kinetoplastea.....	18
Figura 4.	Espécies de morcegos positivas para o kDNA de <i>Leishmania</i> spp., capturados em seis localidades brasileiras.....	44
Figura 5.	Riqueza de espécies de morcegos capturados na Rebio Guaribas, Mamanguape/PB.....	46
Figura 6.	Total de morcegos e riqueza de espécies capturadas nas expedições de 2014 e 2015 na Rebio Guaribas.....	48
Figura 7.	Esquema ilustrativo de gel de poliacrilamida 8% corado por prata para amostras de morcegos analisadas com os iniciadores direcionados ao kDNA de <i>Leishmania</i> spp.....	50
Figura 8.	Riqueza de espécies capturadas na Rebio Guaribas positivas para o kDNA de <i>Leishmania</i> spp.....	51
Figura 9.	Gel de poliacrilamida 8% corado com prata obtido a partir da reamplificação da PCR direcionada ao iniciador HSP70(234).....	53
Figura 10.	Eletroferogramas obtidos a partir do sequenciamento do gene <i>HSP70(234)</i> em amostras de morcegos kDNA positivas.....	54
Figura 11.	Alinhamento e árvore filogenética das sequências de <i>gapdh</i> entre espécies de <i>Leishmania</i> e hospedeiros mamíferos.....	58
Figura 12.	Gel de poliacrilamida 8% corado com prata obtido a partir da amplificação no sistema de PCR Multiplex dos marcadores GAPDH e kDNA.....	59
Figura 13.	Gel de poliacrilamida 8% corado com prata obtido do teste de sensibilidade para detecção do DNA de <i>Leishmania</i> spp. em uma mistura constante de 100 ng de DNA humano.....	60

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Origem das amostras de fragmentos de baços de morcegos
- Tabela 2.** Localização e caracterização florestal dos pontos de amostragem da Rebio Guaribas.
- Tabela 3.** Identificação das amostras de mamíferos silvestres utilizadas para validar o sistema de PCR multiplex.
- Tabela 4.** Amostras kDNA positivas (Baçoteca) submetidas ao processo de caracterização de espécies.
- Tabela 5.** Proporção entre fêmeas e machos de indivíduos capturados, analisados e liberados na Rebio Guaribas.
- Tabela 6.** Identificação por sequenciamento gênico de hemoflagelados capturados na Rebio Guaribas.
- Tabela 7.** Amostras positivas para o kDNA de *Leishmania* de acordo com o tecido infectado.
- Tabela 8.** Amostras kDNA positivas (Rebio) submetidas ao processo de caracterização de espécies.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CFMA – Campus Fiocruz Mata Atlântica

CLIOC – Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DATASUS – Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde

dNTPs – Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados

DTUs – *Discrete Typing Units* (Unidades Discretas de Tipagem)

Ha – Hectares

Km – Kilômetro

kDNA – DNA do cinetoplasto

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

G6PD – Glicose-6-Fosfato Desidrogenase

Hsp70 – Gene codificante para proteínas de choque térmico de 70 kDa

HSP70 (234) – Região polimórfica do alvo HSP70 com 234 pares de bases

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais

IGS – Espaçadores Intergênicos

IPTG – Isopropil-tio- β -D-galactosídeo

ITS1 – *Internal Transcribed Spacer 1* (Região espaçadora do transcrito interno 1)

kDa – Kilodalton

LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana

LV – Leishmaniose Visceral

LVA – Leishmaniose Visceral Americana

M – Molar

maa – Milhões de anos

mL – Mililitro

mm – Milímetro

mM – Milimolar

MLEE – Análise por Enzimas Multilocus

nM – Nanomolar

pb – Pares de bases

PBS – *Phosphate buffered saline* (Tampão fosfato salina)

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação da Polimerase em Cadeia)

PDTIS – Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde

pH - Potencial Hidrogeniônico

pmol – pico mol

RNAr – Ácido Ribonucleico Ribossomal

RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta

rpm – Rotação por minuto

SDS – *Sodium Dodecyl Sulfate* (Dodecilsulfato sódico)

SYBR – Corante comercial *Syber Green®*

TAE – Tris-Acetato-EDTA

TBE – Tris-Borato-EDTA

µL – Microlitro

µM – Micromolar

UV – Luz Ultravioleta

V – Volts

X-gal – 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactosídeo

WHO – World Health Organization

LISTA DE ANEXOS

- Anexo 1.** Comissão de ética no uso de animais – CEUA/FIOCRUZ – LW81/12
- Anexo 2.** Autorização para atividades com finalidade científica – Ministério do Meio Ambiente – MMA, 2014;
- Anexo 3.** Autorização para atividades com finalidade científica – Ministério do Meio Ambiente – MMA, 2015;
- Anexo 4.** Sequência de DNA e região genômica dos marcadores moleculares utilizados no sistema de PCR multiplex;
- Anexo 5.** Análise *in silico* da identidade das sequências entre os iniciadores direcionados para o fragmento de *gapdh* e as sequências representativas do gene *gapdh* para as espécies de *Leishmania* e hospedeiros mamíferos;
- Anexo 6.** Artigo publicado durante o doutorado com dados referentes à dissertação de mestrado. Distinct *Leishmania* Species Infecting Wild Caviomorph Rodents (Rodentia: Hystricognathi) from Brazil. Renata Cássia-Pires, Mariana C. Boité, Paulo S. D'Andrea, Heitor M. Herrera, Elisa Cupolillo, Ana Maria Jansen, André Luiz R. Roque. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014 8(12): e3389. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003389>;
- Anexo 7.** Artigo referente a resultados do Doutorado. Multiplex PCR as a tool for the diagnosis of *Leishmania* spp. kDNA and the *gapdh* housekeeping gene of mammal hosts. de Cássia-Pires R, de Melo MF, Barbosa RD, Roque AL. *PLoS One.* 2017 Mar 16; 12(3):e0173922. doi: 10.1371/journal.pone.0173922. eCollection 2017.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Morcegos (Mammalia: Chiroptera)

A origem da ordem Chiroptera está estimada em aproximadamente 64 milhões de anos atrás (maa) durante o Eoceno (Altringham, 1996; Jones, 2002). Exemplos de *Onychonycteris finneyi* são considerados como os registros fósseis mais antigos dos morcegos atuais (Simmons et al., 2008). Sugere-se que a evolução dos morcegos esteja relacionada com um significativo aumento da temperatura global, da diversificação das plantas com flores e da abundância de insetos durante o período Terciário (Teeling et al., 2005; Nogueira et al., 2014). Ao longo desse tempo de evolução, os morcegos apresentaram grande sucesso adaptativo e tornaram-se a segunda mais numerosa ordem entre os mamíferos, representando aproximadamente 20% da mastofauna, com mais de 1120 espécies descritas em 18 famílias e 202 gêneros (Wilson & Reader, 2005; Nogueira et al., 2014). Atualmente, os quirópteros são animais cosmopolitas com indivíduos ausentes apenas nas regiões polares e algumas poucas ilhas oceânicas (Jones, 2002; Simmons, 2005; Reis, 2007). Embora algumas espécies de morcegos possam ser encontradas em regiões de clima temperado, a maior riqueza e diversidade destes animais é observada nas regiões tropicais e subtropicais (Nowak, 1991). No Brasil, foram descritos até então, nove famílias distribuídas em 64 gêneros e 174 espécies de morcegos (Reis et al., 2007; Paglia et al., 2011).

A primeira classificação da ordem Chiroptera baseada em caracteres morfológicos, a dividiu em duas subordens: Megachiroptera e Microchiroptera (Simmons, 1998). Entretanto, de acordo com estudos filogenéticos e comportamentais, aliados a morfologia, atualmente essa ordem é dividida entre as subordens Yinpterochiroptera e Yangochiroptera (Teeling et al., 2002; Lei e Dong, 2016). A primeira compreende as espécies da antiga subordem Microchiroptera e a segunda é composta pelas famílias dos grandes morcegos: Rhinolophidae, Rhinopomadidae, Megadermatidae e Pteropodidae (Teeling, 2009).

A origem grega do termo Chiroptera, significa “*Cheir (Chiro): Mãos*” e “*Ptera: Asas*”. A adaptação para o voo, juntamente com a capacidade de ecolocalização, são

consideradas como as características mais importantes para a elevada distribuição deste grupo de mamíferos (Fenton & Ratcliffe, 2010). A capacidade de movimentação desses animais também está associada com o hábito de forrageio, busca por abrigos e capacidade de percorrer longas distâncias em busca de alimentos (Galindo-González, 1998). Morcegos são animais que apresentam uma elevada longevidade com relatos de indivíduos vivos por mais de 15 anos na natureza e até 30 anos em cativeiro (Trapido, 1946; Kenn & Hitchcock, 1980; Delpietro et al., 1992; Weigl, 2005). Geralmente, esses animais apresentam uma taxa de sobrevivência 3,5 vezes superior a outros mamíferos placentários não voadores com tamanho semelhante (Wilkinson & South, 2002). Entre os fatores responsáveis para a elevada longevidade desses animais, pode-se citar sua elevada taxa metabólica, seu pequeno tamanho corporal além de sua habilidade do voo que permitem aos morcegos evitar o contato com predadores reduzindo, dessa maneira, seu risco de morte (Bouliere, 1958; Sohal, 1986; Austad & Fischer, 1991; Holmes & Austad, 1994). O alcance desta longevidade potencial é dependente, principalmente, de sua mobilidade na busca de comida e abrigo, dessa maneira, a fragmentação de florestas, a redução da disponibilidade e alteração na distribuição dos recursos, os leva a empreenderem movimentações de longa distância para áreas urbanas (Menezes Jr. et al., 2008; Arnone et al., 2016), favorecendo também o transporte de parasitos entre os ambientes silvestres e urbanos (Taylor et al., 2001). A variedade de nichos ecológicos ocupados pelos morcegos permite o encontro destes animais em uma diversidade de ambientes nos quais podem se expor a diferentes ciclos de transmissão de parasitos e exercerem diferentes papéis na manutenção desses ciclos.

1.2 Hospedeiros e reservatórios silvestres

Ao longo dos últimos anos, o caráter antropocêntrico, no qual um animal reservatório é frequentemente referido como “a espécie que é fonte de infecção de um determinado parasito para o homem” vem sendo modificado e substituído por novos conceitos e visões da relação parasito-hospedeiro. De acordo com os trabalhos de Ashford (1997) e Haydon e colaboradores (2002), reservatório não é classificado apenas como uma única espécie de mamífero infectado por uma espécie de parasito que potencialmente infecta o homem e animais domésticos, mas como um sistema

que pode incluir uma ou mais espécies de animais responsáveis pela manutenção de uma dada espécie de parasito na natureza (Roque e Jansen, 2014). Em cada sistema reservatório, as espécies envolvidas podem desempenhar papéis diferentes na manutenção do ciclo de transmissão de um parasito. Esse papel tem que ser considerado como único, dentro de uma escala espaço-temporal restrita e específica para cada local e cada momento (Roque et al., 2010). A complexidade da interação hospedeiro/reservatório-parasito é principalmente devida ao caráter dinâmico e imprevisível desta unidade biológica em constante mudança em função das alterações do meio ambiente e do processo co-evolutivo dos componentes desta interação (Roque, 2009; Roque & Jansen, 2014).

Um diagnóstico positivo para um determinado parasito em um animal, não é suficiente para classificá-lo como um reservatório. Um animal infectado é um hospedeiro do parasito, mas sua importância na manutenção do ciclo de transmissão numa dada área dependerá das peculiaridades desta interação parasito-hospedeiro; é esta que vai determinar a competência da espécie animal em questão na manutenção e/ou transmissão do parasito e que, portanto, definirá seu papel (ou não) como reservatório (Brandão-Filho et al., 2011; Roque & Jansen, 2014). Cada interação parasito-hospedeiro apresenta particularidades inerentes aos hospedeiros, ao parasito e aos vetores. Dessa maneira, as espécies não desempenham o mesmo papel no ciclo de transmissão de um parasito nos diferentes recortes de tempo e espaço. As diferentes características epidemiológicas e padrões de infecção se modificam de uma região para outra. Mudanças ambientais, sejam naturais ou antrópicas, aceleram o processo de intercâmbio de parasitos entre o homem e hospedeiros silvestres, promovendo a dispersão dos parasitos para novas áreas e proporcionando o contato destes com hospedeiros que possam vir a atuar como reservatórios (Gompper & Williams, 1998; Daszak, 2001, 2007; Dobson e Foufopoulus, 2001; Dunn et al., 2009).

1.3 Tripanosomatídeos

A família Trypanosomatidae é caracterizada pela presença de uma estrutura denominada cinetoplasto, composta por cadeias de ácido dextrorribonucléico (DNA) em formato de disco, com várias cópias de genoma mitocondrial, localizada no interior de

uma mitocôndria única associada à base do flagelo do organismo (Riou & Delain, 1969; Vickerman & Preston, 1976; Simpson et al., 1987; Rodgers et al., 1990, Moreira et al., 2004).

O flagelo está presente em todas as formas celulares destes protozoários e sua estrutura é originada na bolsa flagelar, localizada próximo ao cinetoplasto. A membrana ondulante, visível apenas nas formas tripomastigotas e epimastigotas é formada como um estiramento da membrana celular por ação mecânica do flagelo que, após emergir da bolsa flagelar, percorre a superfície extracelular da membrana citoplasmática, aderida fortemente a mesma (Hoare, 1972). Suas diferentes formas celulares são descritas de acordo com a exteriorização e ponto de emergência do flagelo no corpo celular, à existência e a extensão da membrana ondulante, a posição do cinetoplasto relativa ao núcleo e as porções anterior e posterior da célula e ao formato geral da célula (Figura 1).

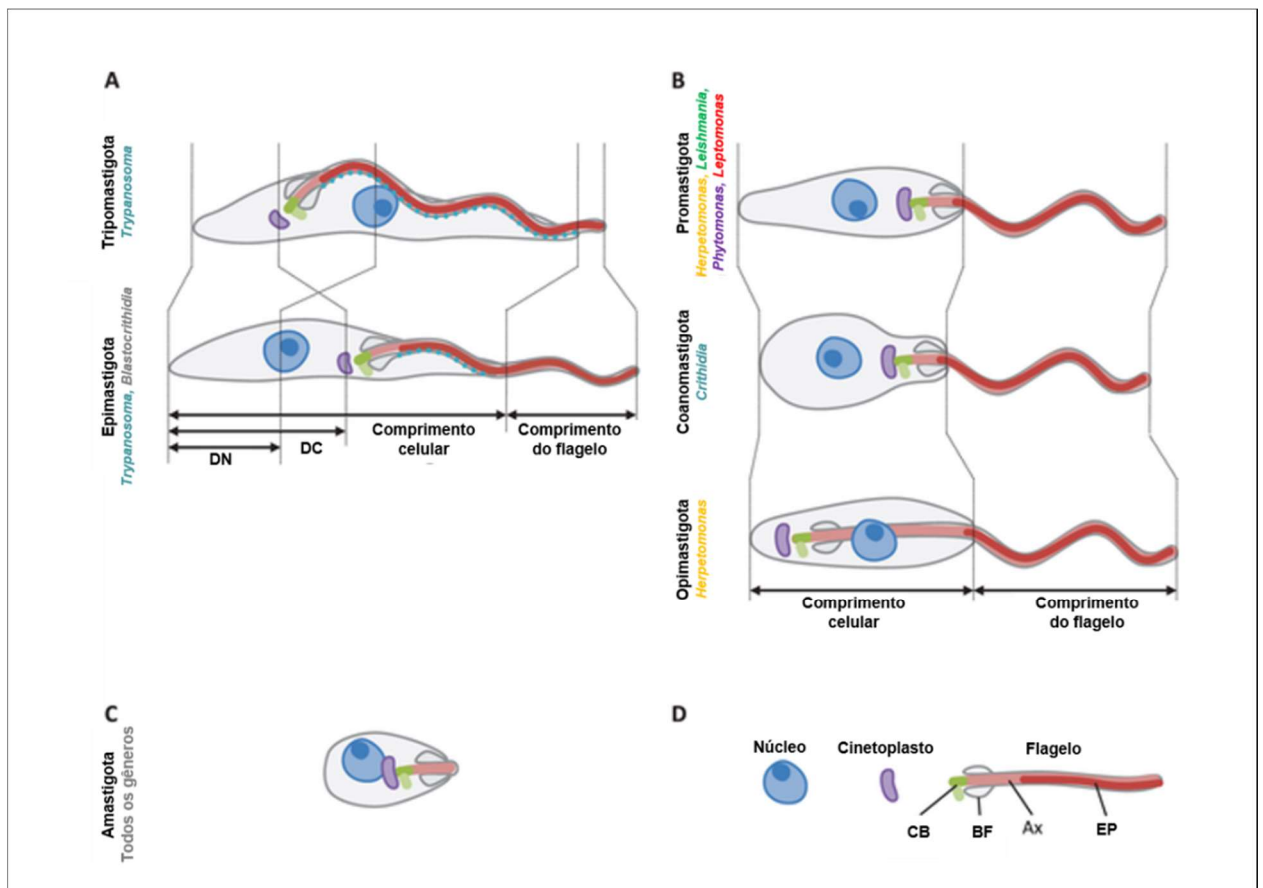


Figura 1. As principais classes morfológicas de tripanosomatídeos (Adaptado de Wheeler, 2013).

Diagrama de seis morfologias mais comuns em tripanosomatídeos. **(A)** Morfologia com um flagelo lateralmente ligado ao corpo celular: formas tripomastigota e epimastigota. **(B)** Morfologia com flagelo livre: formas promastigota, coanomastigota e opistomastigota. **(C)** Morfologia com flagelo invaginado: forma amastigota. **(D)** Estruturas associadas ao flagelo: CB: Corpo Basal; BF: Bolsa Flagelar; Ax: Axonema; EP: Estrutura Paraflagelar. Métricas utilizadas para registrar a morfologia celular: comprimento celular, comprimento do flagelo, DC: Distância posterior do cinetoplasto; DN: Distância posterior do núcleo.

Os tripanosomatídeos estão inseridos no Filo Sarcomastigophora e Classe Kinetoplastea, com duas subclasses: Prokinetoplastina e Metakinetoplastina. A primeira possui uma única ordem, denominada Prokinetoplastida enquanto a segunda subclasse apresenta quatro ordens: Eubodonida, Parabodonida e Neobodonida, compostas por espécies de vida livre e parasitária; e Ordem Trypanosomatida, com uma única família Trypanosomatidae, composta de espécies de parasitas obrigatórios (Moreira et al., 2004; D'Avila-Levy et al., 2015) (Figura 2).

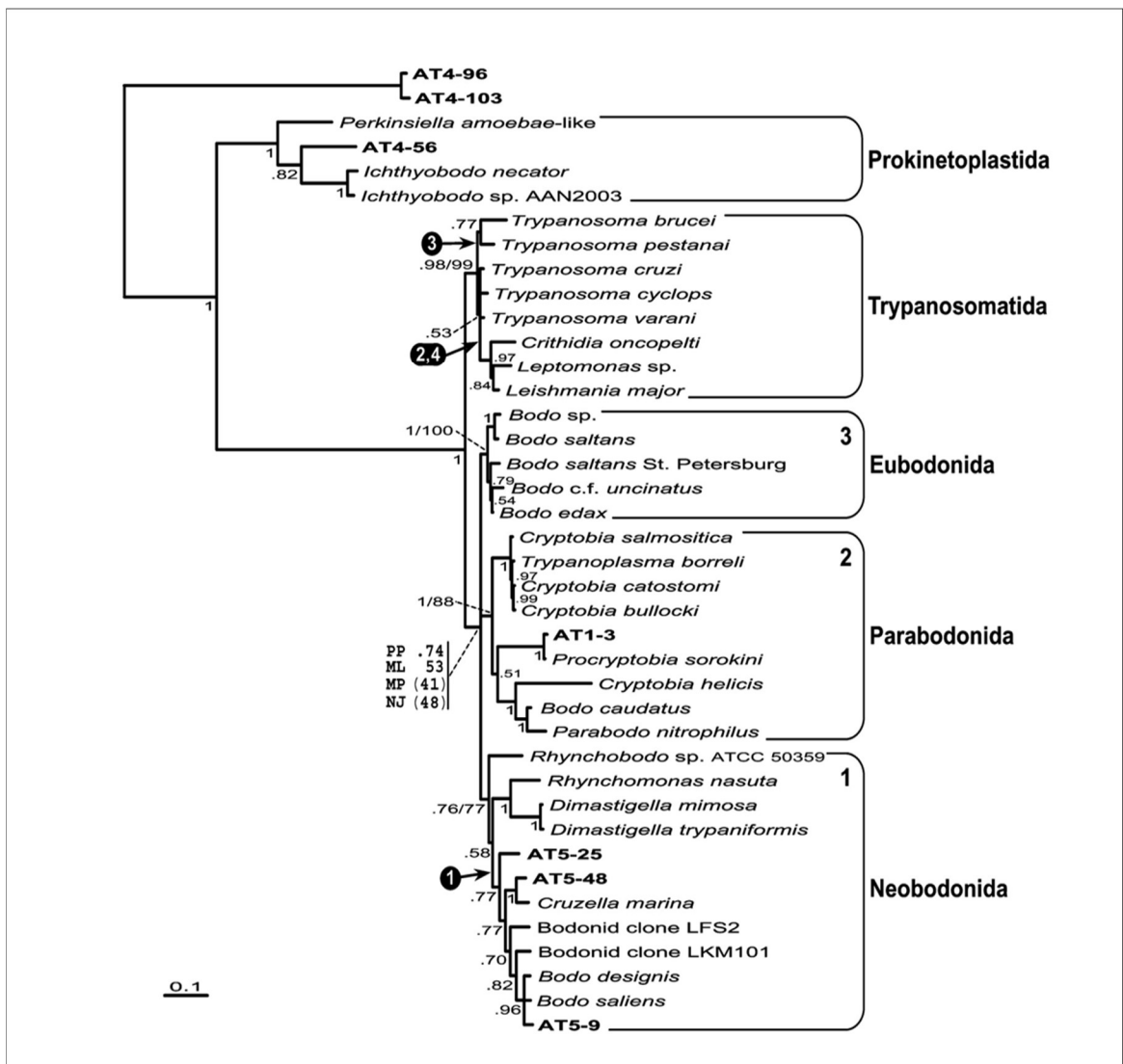


Figura 2. Classificação atual de tripanosomatídeos. Árvore filogenética baseada na análise das sequências de 18S rDNA, mostrando classificação dos tripanosomatídeos proposta por Moreira e colaboradores (2004) e corroborada por D'Avila-Levy et al (2015).

Atualmente, os flagelados da família Trypanosomatidae estão distribuídos em 20 gêneros: 16 que albergam parasitos monoxênicos de insetos (*Angomonas*, *Blastocrithidia*, *Blechomonas*, *Crithidia*, *Herpetomonas*, *Jaeinimonas*, *Kentomonas*, *Lafontella*, *Leptomonas*, *Lotmaria*, *Novymonas*, *Paratrypanosoma*, *Rhynchoidomonas*, *Strigomonas*, *Sergeia* e *Wallacemonas*), um que abriga parasitas heteroxênicos de insetos e plantas (*Phytomonas*) e os gêneros heteroxênicos *Leishmania*, *Endotrypanum* e *Trypanosoma* que abrigam espécies de importância médica e veterinária capazes de infectar insetos e vertebrados (Hoare e Wallace; 1966; Wallace, 1966; 1983; Vickerman & Preston, 1976; Camargo, 1999; Merzlyak et al., 2001, Podlipaev, 2001; Svobodová et al., 2007; Teixeira et al., 2011; Votýpka et al., 2014, 2013; Borghesan et al., 2013; Flegontov et al., 2013; Kostygov et al., 2014, 2016; Schwarz et al., 2015; Yurchenko et al., 2016).

1.3.1 *Trypanosoma* sp.

O gênero *Trypanosoma* foi originalmente proposto por Gruby (1843) para classificar um hemoparasita, denominado *T. sanguinis*, encontrado em rãs (*Rana esculenta*). Desde então, várias outras espécies deste gênero foram observadas infectando uma diversidade de outros hospedeiros, vertebrados e invertebrados, além de plantas (Hoare, 1972; Busse & Preisfeld, 2003; Von der Heyden et al., 2004; Simpson et al., 2006).

Hoare (1964), de acordo com o desenvolvimento no inseto vetor e seu mecanismo de eliminação de formas infectivas, propôs a separação do gênero *Trypanosoma* em duas diferentes seções: Salivaria e Stercoraria. A seção Salivaria é composta por espécies que se desenvolvem no tubo digestivo e glândulas salivares de seus insetos vetores sendo transmitidas sob as formas tripomastigotas metacíclicas durante o repasto sanguíneo. Atualmente, esta seção está dividida em quatro subgêneros: (I) *Trypanozoon*; (II) *Nannomonas*; (III) *Duttonella* e (IV) *Pycnomonas*. A seção Stercoraria é composta por espécies cujo desenvolvimento ocorre exclusivamente no intestino de seus insetos vetores, sendo transmitidas através das fezes. Nesta seção, estão descritos três subgêneros: (I) *Megatrypanum*,

(II) *Herpetosoma* e (III) *Schizotrypanum*. A posição taxonômica do subgênero *Tejeraia* proposto por Añez (1982) e que contém apenas a espécie *T. (Tejeraia) rangeli* é discutível, podendo ser classificada tanto na seção Salivaria quanto na seção Stercoraria (Añez 1982, Grisard, 2003).

Estudos mais recentes sugerem a divisão do gênero *Trypanosoma* em sete clados: (i) Clado *T. cruzi*, que inclui as espécies *T. cruzi*, *T. rangeli*, *T. conorhini*, *T. dionisii*, *T. noyesi* e vários outros tripanosomas até então encontrados apenas em morcegos, como *T. marinkellei*, *T. vespertilionis*, *T. livingstonei*, *T. erneyi* e *T. wauwau*; (ii) Clado *T. brucei* que apresenta tripanosomas de mamíferos africanos relacionados às moscas tsetsé; (iii) Clado aquático, que inclui tripanosomas de anuros, peixes e outros vertebrados aquáticos; (IV) Clado *T. avium/T. corvi* que apresenta tripanosomas de aves; (V) Clado *T. lewisi*, que corresponde a espécies do subgênero *Herpetosoma*; (VI) Clado Squamata composto por tripanosomas de répteis e (VII) Clado *T. theileri* composto por tripanosomas comumente identificados em mamíferos ungulados (Stevens et al., 1999; Jakes et al., 2001; Hamilton et al., 2004, 2008, 2009; Ferreira et al., 2007, 2008; Viola et al., 2009a, 2009b; Hamilton & Stevens, 2010; Lima et al., 2012, 2013, 2015; Fermino et al., 2013; Botero et al., 2016; Yurchenko et al., 2016).

1.3.2 *Leishmania* sp.

O primeiro registro fóssil de *Leishmania* spp., *Protoleishmania proteus*, data do início do cretáceo (100 maa) no meridiano sul do supercontinente Gondwana. Deste mesmo período, também foi descoberto fósseis de larvas de insetos que coabitavam com flagelados de vida livre semelhantes a tripanosomatídeos. Dessa maneira, foi sugerido que a ingestão dessas larvas e a posterior replicação dos flagelados nestes insetos, pode ter dado origem ao ciclo de transmissão deste protozoário (Poinar & Poinar, 2004; Poinar, 2007).

Tendo em vista a morfologia bastante similar entre as espécies do gênero *Leishmania*, a classificação clássica destes parasitos foi baseada na infecção em humanos e em caracteres biológicos, geográficos e epidemiológicos (Chance, 1979). Atualmente, a classificação propõe a divisão do gênero em três subgêneros: (I) *Leishmania (Leishmania)*; (II) *Leishmania (Viannia)*; (III) *Leishmania*

(*Sauroleishmania*). Lainson e Shaw em 1987, propuseram a divisão do gênero de acordo com o desenvolvimento de suas espécies no intestino do vetor. Esta classificação separou os parasitos em três seções: (I) Hipopilária: que engloba os parasitos do subgênero *L. (Sauroleishmania)* com desenvolvimento restrito ao intestino posterior do inseto; (II) Peripilária: composta majoritariamente por parasitos do subgênero *L. (Viannia)* com desenvolvimento no intestino posterior e migração para os intestinos médio e anterior; (III) Suprapilária: que engloba os parasitos do subgênero *L. (Leishmania)* que já se desenvolvem nas porções anterior e médio do intestino dos insetos vetores. Desde então, todos os marcadores bioquímicos e moleculares utilizados em estudos de filogenia e taxonomia molecular vêm corroborando esta classificação (Rioux et al., 1990; Noyes et al., 1997; Cupolillo et al., 2000, Fraga et al., 2010).

A separação dos grandes continentes, durante o Mioceno em 24 maa, também favoreceu a divergência do gênero *Leishmania*, com estabelecimento das espécies do subgênero *Leishmania* tanto no Velho quanto no Novo Mundo (Lukes et al., 2007). As cepas de *L. (L.) infantum* encontradas no Novo Mundo são indistinguíveis do ponto de vista genético e molecular das cepas encontradas no Velho Mundo (Kuhls et al., 2011). A ampla distribuição desta espécie atualmente nos continentes do Novo Mundo, e principalmente no Brasil, é devida às múltiplas entradas deste parasito vindo principalmente da região Mediterrânea da Europa além de sua adaptação ao principal vetor, *Lutzomyia longipalpis*, amplamente disperso no país (Volf & Myskova, 2007; Myskova et al., 2007; Kuhls et al., 2011). *Leishmania (L.) amazonensis* e as demais espécies do subgênero *Viannia* são autóctones do Novo Mundo e seu surgimento está relacionado à separação entre a África e o continente Americano. Espécies destes dois subgêneros são agentes etiológicos de parasitoses com grande importância epidemiológica e importantes problemas de saúde pública sendo diagnosticadas em mamíferos de nove diferentes ordens (Roque & Jansen, 2014). O subgênero *L. (Sauroleishmania)* está restrito ao Velho Mundo e alberga apenas espécies encontradas em répteis (Noyes et al., 1998). Atualmente há cerca de 30 espécies de *Leishmania* divididas nos subgêneros *L. (Viannia)* e *L. (Leishmania)* e agrupadas em oito diferentes complexos (Fraga et al., 2010; Schonian et al., 2010).

1.4 Morcegos como hospedeiros de parasitos

A diversidade de parasitos já diagnosticados em morcegos reflete, em parte, a longevidade destes animais, sua elevada capacidade de dispersão assim como sua adaptabilidade em uma diversidade de ambientes. Estes movimentos de grande distância permitem a dispersão de parasitos bem como o intercâmbio de parasitos entre as diferentes populações de morcegos e/ou de outros mamíferos presentes nos locais por onde se refugiam (Fowler & Miller, 2008). O tamanho e a densidade de uma população de mamíferos também estão relacionados à diversidade de parasitos albergados entre estes animais (Von Zuben, 1997). Em relação aos morcegos, o hábito de viverem em colônias favorece a reprodução, a manutenção e a persistência de um dado parasito entre seus indivíduos (Wibbelt et al., 2010). A redução constante e cada vez mais frequente nos ambientes de mata, além da introdução de atividades antrópicas, possibilita um contato maior dos morcegos entre os ambientes silvestres e urbanos, onde podem ter contato com vetores e atuarem como fonte de infecção e risco para outras populações, inclusive fora do ambiente silvestre.

Historicamente, uma ampla variedade de infecções virais foi relacionada aos morcegos (Serra-Cobo & Lopez-Roig, 2016). Mais de 200 vírus já foram detectados e/ou isolados nestes animais (Morateli & Calisher, 2015). Morcegos frugívoros do gênero *Pteropus* já foram identificados como reservatórios na Ásia e Austrália, de Nipah e Hendra vírus (Mononegavirales: Paramyxoviridae) (Plowright et al., 2008). O vírus Ebola (Mononegavirales: Filoviridae) foi encontrado na África Central em morcegos frugívoros das famílias Pteropodidae (*Hypsignathus monstrosus*, *Epomops franqueti* e *Myonycteris torquata*) (Leroy et al., 2005; Dobson, 2005; Woo et al., 2006; Towner et al., 2008). Em 2011, Kuzmin e colaboradores isolaram um novo vírus do gênero *Lyssavirus* em cérebro de *Hipposideros commersoni*. Corona vírus - SARS (Nidovirales: Coronaviridae) já foi diagnosticado durante um surto na China em cinco espécies de morcegos do gênero *Rhinolophus*, família Rhinolophidae (Lau et al., 2005; Li et al., 2005). O vírus MERS (Nidovirales: Coronaviridae) é considerado endêmico em morcegos da família Vespertilionidae na África e região da península Arábica (Birmingham et al., 2012). Em 2007, Dominguez e colaboradores, identificaram, pela primeira vez no continente Americano, um Corona vírus

(Alphacoronavirus) em *Eptesicus fuscus* e *Myotis occultus*. Morcegos já foram incriminados como hospedeiros ancestrais dos vírus das hepatites B e C, caxumba e outros vírus da família Flaviridae (Drexler et al., 2012; Quan et al., 2013). *Sturnira lilium* foi recentemente diagnosticado com duas linhagens do vírus *Influenza A* (Orthomyxoviridae: *Influenza*) na Guatemala (Mehle, 2014). Cepas de Hantavírus já foram registradas na Coreia e na África em duas espécies da família Vespertilionidae e uma de Rhinolophidae (Kim et al., 1994; Weiss et al., 2012).

Desmodus rotundus é considerado como o principal transmissor do vírus da Raiva (Mononegavirales: Rhabdoviridae) desde o início do século passado (Carini, 1911). No Brasil, diversas espécies de morcegos estão relacionadas à manutenção e/ou transmissão deste vírus, com registro da infecção em 41 e isolamento viral obtido em 36 delas (Ito et al., 2001; Shoji et al., 2004; Castilho et al., 2010; Sodré et al., 2010). *D. rotundus* é a espécie mais comumente encontrada infectada por este vírus no Brasil, com registro da infecção em todas as regiões do país e sendo responsável por surtos de raiva humana na região norte do país com mais de 60 mortes (da Rosa et al., 2006; Barbosa et al., 2008; Schineider et al., 2009; Costa & Fernandes, 2016).

Embora a transmissão do vírus da raiva seja mais frequente em morcegos hematófagos, espécies de todas as guildas tróficas podem albergar e transmitir este parasito de forma acidental (Uieda et al., 1996; Páez et al., 2003; Jackson & Wunner 2007; Kotait et al., 2010). Morcegos não hematófagos de três famílias: Molossidae, Phyllostomidae e Vespertilionidae, já foram diagnosticados com o vírus da Raiva no Brasil (Ruschi, 1952; Silva et al., 1967; Amorim et al., 1970; Cunha et al., 1998, 2005, 2006; Martorelli et al., 1995, 1996, 2002, 2009; Uieda et al., 1995, 1996, 2005; Passos et al., 1998, Favoretto et al., 2002; Carrieri et al., 2003; Deus et al., 2003; Massunaga et al., 2003; Bianconi et al., 2004; Stutz et al., 2004; Shoji et al., 2004, 2006; Almeida et al., 2005; Kobayashi et al., 2005; Langoni et al., 2005; Schaefer et al., 2005; Silva et al., 2007; Scheffer et al., 2007; Sodré et al., 2007, 2010; Tomaz et al., 2007; Castilho et al., 2008; Queiroz et al., 2009; Asano et al., 2016).

Além do vírus da Raiva, há relatos de diagnóstico no Brasil, de Alphacoronavirus em *D. rotundus*, *Molossus molossus*, *M. rufus*, *Tadarida brasiliensis*, *Carollia perspicillata* e *C. brevicaudata* (Brandão et al., 2008; Corman et al., 2013; Góes et al., 2013; Lima et al., 2013). Rubulavírus (Mononegavirales: Paramyxoviridae) já foi isolado em glândulas salivares de *S. lilium* (Henderson et al., 1995),

Mastadenovírus (Adenoviridae) foi detectado pela primeira vez em *D. rotundus* (Lima et al., 2013b) e o vírus Mojuí dos Campos (Bunyavirus) foi isolado de um morcego não identificado, no município homônimo, estado do Pará (Wanzeller et al., 2002)

Em comparação aos múltiplos trabalhos de diagnóstico de vírus em morcegos, pouco se conhece sobre a presença e a importância médica e veterinária das infecções causadas por bactérias nestes animais (Mühldorfer, 2013). Com a emergência e reemergência de algumas doenças bacterianas, o interesse dos morcegos como potenciais reservatórios e/ou vetores de bactérias vem em crescente nas últimas décadas (Evans et al., 2009; Mühldorfer, 2013; Dietrich et al., 2015). Bactérias dos gêneros *Pasteurella*, *Salmonella*, *Escherichia* e *Yersinia* com potencial zoonótico foram diagnosticadas em morcegos das famílias Carollinae, Desmodontinae, Glossophaginae, Molossidae e Mormoopidae (Klite & Kourani, 1965; Souza et al., 1999; Mühldorfer, 2013). No Brasil, bactérias do gênero *Leptospira* já foram encontradas nos estados do Mato Grosso do Sul e São Paulo com relatos da infecção em *Artibeus lituratus*, *D. rotundus*, *G. soricina*, *Platyrrhinus lineatus*, *M. molossus* e *M. rufus* (Zetun et al., 2009; Bessa et al., 2010). Bactérias do gênero *Rickettsia* (*R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. amblyommii* e *R. rhipicephali*) já foram encontradas em morcegos da família Phyllostomidae (*A. lituratus* e *P. lineatus*); família Molossidae (*Eumops auripendulus*, *E. perotis*, *M. molossus*, *M. rufus*, *Nyctinomops laticaudatus*, *N. macrotis* e *T. brasiliensis*) e família Vespertilionidae com relatos da infecção em *Histiotus velatus* e *M. nigricans* (Zetun et al., 2009; Bessa et al., 2010; D'Auria et al., 2010).

Em relação a fauna de helmintos, sugere-se que a maior diversidade destes parasitos esteja relacionada a dieta dos morcegos. Animais onívoros, seguidos dos insetívoros tendem a ser mais infectados que outras famílias de morcegos (Bordes & Morand, 2008; Lord et al., 2012; Pinheiro et al., 2013). No Brasil, até o momento, 59 diferentes espécies de helmintos já foram relatadas como agente infeccioso em morcegos (Albuquerque, 2016). Em relação aos nematoides (Nematelmintos: Nematoda), 28 espécies já foram diagnosticadas em morcegos de 15 espécies encontradas apenas no Continente Americano (Cardia, 2012; Cardia et al., 2015; Santos & Gibson, 2015). Platelminintos das classes Cestoda (n=06) e Trematoda (n=23), já foram relatados como agentes infecciosos em 15 espécies de morcegos, com primeira descrição brasileira de *Anenterotrema eduardocaballeroi* (Digenea:

Anenterotrematidae) em *E. brasiliensis* e *M. molossus* além do relato do cestódeo *Vampirolepis* sp. em *D. rotundus* (Cardia, 2012; Cardia et al., 2015; Santos & Gibson, 2015). Duas espécies de acantocéfalos: *Oligacanthorhynchid acanthocephala* (Acanthocephala: Oligacanthorhynchidae) e *Neoncolica artibeii* (Acanthocephala: Archiacanthocephala) foram relatadas infectando *Tonatia silvicola* na Costa Rica e *A. lituratus* no Paraguai (Gibson & McCarthy, 1987; Smales, 2007). Além dos relatos pontuais de infecção por helmintos, não se pode deixar de mencionar os episódios de coinfeção por parasitos das classes Nematoda/Cestoda em *Eumops glaucinus*, *G. soricina*, *C. perspicillata*, *M. molossus* e *Phylostomus discolor*; Nematoda/Trematoda em *E. glaucinus*, *G. soricina* e *T. brasiliensis*; Nematoda/Cestoda/Trematoda em *N. laticaudatus* (Mello et al., 2014).

Sabe-se que morcegos estão implicados na manutenção e transmissão de diferentes espécies de protozoários desde o século passado (Côrrea et al., 2013). Parasitos dos gêneros *Cryptosporidium*, *Eimeria* e *Plasmodium*, do filo Apicomplexa, já foram diagnosticados nos quirópteros (Murakoshi et al., 2016). O primeiro relato de *Cryptosporidium* em morcegos foi em *E. fuscus* no estado de Oregon, Estados Unidos - EUA. *Cryptosporidium* sp, foi diagnosticada, na Austrália, em amostras fecais de *M. adversus* (Zhao et al., 2001; Morgan et al., 1999). Na China, os genótipos I e II de *Cryptosporidium* foram identificados em *Rhinolophus sinicus*, *Hipposideros fulvus*, *Rousettus leschenaultii* e *Aselliscus stoliczkamus* (Wang et al. 2013). Nos EUA e República Checa, os genótipos III e IV foram identificados em *E. fuscus* e *Pipistrellus pipistrellus* (Kváč et al., 2015). Parasitos do gênero *Eimeria* (*E. antrozoii*) foram inicialmente reportados em morcegos insetívoros, *Antrozous pallidus*, coletados no México e no Novo México por Scott & Duszynski, em 1997. Schaer e colaboradores (2013) observaram a presença de parasitos do gênero *Plasmodium* em morcegos frugívoros (*Myonycteris angolensis*) e insetívoros (*Hipposideros cyclops*). Parasitos do gênero *Polychromophilus* já foram descritos em *Miniopterus villiersi* e *Pipistrellus aff. grandidieri* (Garnham, 1973; Schlee, 1990; Draper et al., 1994; Poinar & Mastalerz, 2000). O gênero *Nycteria* já foi relatado na infecção de dois morcegos da família Rhinolophidae: *R. alcyone* e *R. landeri*, enquanto parasitos do gênero *Hepatocystis* foram diagnosticados em seis espécies de morcegos da família Pteropodidae (Garnham, 1973; Rosin et al., 1978; Gardner & Molyneux, 1988b).

A infecção de morcegos por parasitos da família Trypanosomatidae, objeto de estudo desta tese, será tratada em uma seção única, logo abaixo.

1.5 Morcegos como hospedeiros de Tripanosomatídeos

Parasitos dos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* são caracterizados pela elevada heterogeneidade genética e ecletismo biológico quanto às ordens de mamíferos que são capazes de infectar (Roque & Jansen, 2014). Dessa maneira, estes protozoários estão inseridos em complexos ciclos de transmissão com particularidades que variam de acordo com o espaço e tempo (Rotureau, 2006). Entre os animais silvestres encontrados naturalmente infectados por esses parasitos, os morcegos exercem um papel importante na manutenção e transmissão devido a sua elevada abundância, capacidade de deslocamento e de explorar diferentes tipos de habitats, além de sua adaptação a ambientes antropizados. Estes fatores em conjunto podem constituir um fator de risco de infecção para populações de animais silvestres, domésticos e o homem (Fabian, 1991; Roque & Jansen, 2010). Mamíferos da ordem Chiroptera já foram diagnosticados com mais de 70 espécies de *Trypanosoma* sp., principalmente dos subgêneros *Herpetosoma*, *Schizotrypanum*, *Megatrypanum* e *Trypanozoon* (Hoare, 1972; Molyneux & Stiles, 1991; Barnabe et al., 2003; Lisboa et al., 2008; Cottontail et al., 2009; Cavazzana et al., 2010; Hamilton et al., 2012; Lima et al., 2012, 2013; Silva-Iturriza et al., 2013; Ramírez et al., 2014).

Algumas espécies do subgênero *Schizotrypanum* tem distribuição global, já sendo descritas infectando morcegos em todo o mundo (Hamilton et al., 2012). Embora *T. cruzi* seja um parasito eclético quanto às ordens de mamíferos capazes de infectar (Roque & Jansen, 2014), outras espécies desse subgênero como *T. erneyi* e *T. marinkellei* são descritas, até então, como exclusivas de morcegos (Lima et al., 2012). *T. dionisii* também vinha sendo considerado um parasito exclusivo de morcegos até ser observada a infecção em tecido cardíaco de uma criança no estado do Espírito Santo (Dario et al., 2016). De fato, *T. dionisii* é capaz de formar pseudocistos *in vitro* em tecidos de mamíferos, e mesmo tendo sido descrito previamente neste estado localidade (Acosta et al., 2014), este é o primeiro relato da infecção por esta espécie em mamíferos de outra ordem (Gardner & Molyneux, 1988(a); Dario et al., 2016). *T. dionisii* é uma espécie cosmopolita e transmitido por

insetos da família Cimicidae, enquanto *T. marinkellei* ocorre apenas nas Américas sendo transmitido por insetos do gênero *Cavernicola*. No Brasil, *T. dionisii* foi detectado em morcegos das famílias Phyllostomidae, Vespertilionidae, Noctilionidae e Molossidae, enquanto *T. marinkellei* foi encontrado em espécies das famílias Phyllostomidae e Vespertilionidae no nordeste, sudeste, e Brasil central, e *T. cruzi* em quatro famílias (Phyllostomidae, Vespertilionidae, Noctilionidae e Thyropteridae) (Marcili et al., 2009, 2013).

Infecções por cinco diferentes genótipos de *T. cruzi*: TcI, TcII, TcIII, TcIV e TcBat, já foram reportadas em morcegos dispersos em todo o continente Americano (Cottontail et al., 2009; García et al., 2012; Ramírez et al., 2014; Pinto et al., 2015; Lima et al., 2015; da Costa et al., 2016; Argibay et al., 2016; Hodo et al., 2016). No Brasil, os mesmos cinco genótipos além de infecções mistas por TcI e TcIV; TcI e TcII; TcI e TcIII/TcIV; e TcII e TcIII/TcIV foram relatadas em morcegos das famílias Phyllostomidae, Vespertilionidae, Thyropteridae, Noctilionidae, Emballonuridae, Mormoopidae e Molossidae capturados na Amazônia, Mata Atlântica e Pantanal (Marcili et al., 2009; Cavazzana et al., 2010; da Costa et al., 2016).

Parasitas da espécie *T. vespertilionis* foram diagnosticados em morcegos no Velho Mundo (Soria & Dusanic, 1975; Morsy et al., 1986; Steindel et al., 1998). Outras espécies deste subgênero, *T. hedricki* e *T. myoti*, foram diagnosticadas na América do Norte e Canadá (Bower & Woo, 1981). Lima e colaboradores (2012, 2013), diagnosticaram duas novas espécies de tripanosomatídeos em morcegos africanos: *T. erneyi* em *Mopys condylurus* e *Tadarida* sp., e *T. livingstonei* em *Hipposideros caffer* e *Rhinolophus landeri*. No Brasil, *Pteronotus parnelli*, capturado em Rondônia foi identificado com uma nova espécie de tripanosoma denominada *T. wauwau* (Lima et al., 2015).

As infecções por parasitos dos demais subgêneros *Herpetosoma*, *Megatrypanum*, *Tejeraia* e *Trypanozoon* são menos frequentes entre os morcegos, embora haja relatos pontuais da infecção por *T. (H.) aunawa* e *T. lineatum* na África e na Venezuela (Hoare, 1972; Ewers, 1974). *T. (M.) pessoai*, *T. pifanoi*, *T. leonidasdeanei* e *T. megadermaem*-like foram relatados em São Paulo, Pará e Rio de Janeiro (Deane & Sugay, 1963; Vilar et al., 2004). *T. (T.) rangeli* já foi associado a morcegos no Panamá, Colômbia e Pantanal brasileiro (Lisboa et al., 2008; Cottontail et al., 2009; Maia da Silva et al., 2009; Ramírez et al., 2014). *T. (T.) evansi* também

foi descrito infectando morcegos no Pantanal (Herrera et al., 2004), e é um parasito que também pode ser transmitido pela saliva de morcegos hematófagos durante o repasto sanguíneo (Desquenes et al., 2013).

Em relação às infecções por *Leishmania* spp., Mutinga (1975) relatou, através de evidências sorológicas, o primeiro registro da infecção em morcegos no Quênia. Pouco tempo depois, Morsy e colaboradores (1987), também observaram este tipo de associação no Egito. De fato, estes hospedeiros ainda são muito pouco estudados em relação à infecção por *Leishmania* sp., e prova disso é que, até o momento, existem apenas três isolamentos destes parasitos descritos na literatura: *L. infantum* em *C. perspicillata* na Venezuela (de Lima et al., 2008), *L. tropica* em *Cardioderma cor* e *L. major* em *Nycteris hispida*, ambos capturados na Etiópia (Kassahun et al., 2015).

Nos últimos dez anos, notou-se um crescimento nos estudos e interesse na possibilidade desses animais atuarem como reservatórios de *Leishmania* spp. Apesar disso, no Brasil, os relatos da infecção por *Leishmania* sp. em morcegos ainda são escassos e pontuais com diagnóstico em macerados de tecidos, lesões e sangue de poucas espécies de morcegos. *Leishmania* (*L.*) *infantum* foi relatada infectando as espécies *D. rotundus*, *G. soricina* e *M. molossus*. Já *L.* (*L.*) *amazonensis* foi identificada em 12 espécies de morcegos: *A. lituratus*, *A. planirostris*, *D. rotundus*, *E. auripendulus*, *E. glaucinus*, *G. soricina*, *M. molossus*, *M. rufus*, *M. nigricans*, *N. laticaudatus*, *P. lineatus* e *S. lillium*, pertencentes às famílias Molossidae, Phyllostomidae e Vespertilionidae (Savani et al., 2010; Oliveira et al., 2015). Oliveira e colaboradores (2015), também identificaram uma infecção mista entre estes dois parasitos em fragmentos de pele, baço e fígado em *M. rufus*. Em relação às espécies do subgênero *Leishmania* (*Viannia*), composto por uma diversidade maior de espécies e o mais disperso no país, apenas um trabalho conseguiu identificar, através de PCR RFLP direcionado à região do ITS1 e digestão com a enzima *HaeIII* (El Tai et al., 2000; Schönian et al., 2003; Lima Jr et al., 2009), *L.* (*V.*) *braziliensis* em sangue e fragmentos de tecido de *M. molossus* e *G. soricina*, ambos capturados no Mato Grosso do Sul (Shapiro et al., 2013). No México, em 2015, foi descrito a presença de *L.* (*L.*) *mexicana* por PCR, em fragmentos de coração, fígado, baço e pele de *A. lituratus*, *Choeroniscus godmani*, *Glossophaga commissarisi*, *G. soricina* e *S. lillium* (Berzunza-Cruz et al., 2015).

Todos esses recentes encontros da infecção natural por *Leishmania* spp. em morcegos e em espécies de flebotomíneos tipicamente de cavernas (Carvalho et al., 2013; Ogawa et al., 2016) demonstra a importância desses animais na manutenção do ciclo de transmissão de *Leishmania* spp. na natureza. Morcegos também já foram reportados como fonte alimentar de *Lutzomyia longipalpis* em ambientes de cavernas (Lampo et al., 2000; Bessa et al., 2010). Essa espécie de vetor apresenta um caráter oportunista e eclético quanto às ordens de mamíferos das quais se alimenta. Trata-se do principal vetor de *L. infantum* nas Américas, sendo frequentemente encontrado em cavernas, abrigos domésticos, fendas de rochas e ocos de árvores habitadas por morcegos (Quinnel et al., 1992; Morrison et al., 1993; Lampo et al., 2000). Estudos de fonte alimentar relataram DNA de quatro diferentes espécies de morcegos (*P. parnellii*, *Glossophaga longirostris*, *C. perspicillata* e *Myotis oxyotus*) em conteúdo intestinal de *L. longipalpis* (Lampo et al., 2000).

1.6 Diagnóstico de infecção por tripanosomatídeos

Os principais métodos para o diagnóstico de um parasito consistem em sua detecção através da visualização em microscopia óptica, isolamento e posterior cultivo em meio de cultura e/ou inoculação do agente etiológico em animais de laboratório, para seu posterior isolamento e caracterização. A Eletroforese de Enzimas Multilocus – MLEE (Rioux et al., 1990) é ainda considerado o padrão ouro para a identificação de espécies de *Leishmania*, no entanto exige uma etapa prévia de isolamento dos parasitos. Em animais silvestres, este isolamento ainda é um pouco mais complexo devido às dificuldades de cultivo asséptico durante as expedições de campo. Além disso, a baixa carga parasitária tipicamente observada aliada a distribuição irregular de parasitas entre os tecidos do hospedeiro reduz ainda mais a eficácia do isolamento (Lopez et al., 1993; Degraeve et al., 1994; Volpini et al., 2004; Ampuero et al., 2009; Roque et al., 2010). Os métodos sorológicos, embora muito úteis, podem apresentar resultados imprecisos em hospedeiros imunossuprimidos, além de não identificarem as espécies de *Leishmania* envolvidas na infecção (Piarroux et al., 1993; Wilson, 1995; Ozensoy et al., 1998; Hu et al., 2000; Ikonopoulou et al., 2003). Já para o diagnóstico da infecção por *T. cruzi*, o exame a fresco, os métodos de concentração e esfregaço em gota espessa são considerados como padrão ouro para seu

diagnóstico em áreas endêmicas da doença humana, dada sua elevada sensibilidade de detectar o parasito na fase aguda da infecção (com parasitemia patente) (Brasil, 2009). Nesta fase, o isolamento do parasito pode ser facilmente obtido e os parasitos podem ser submetidos à caracterização molecular por diferentes alvos, embora até o momento não haja um consenso sobre uma abordagem metodológica que pudesse ser considerada como padrão ouro para esta caracterização (Brasil, 2009; Ministério da Saúde, 2013). Apesar da elevada especificidade das técnicas parasitológicas, sua sensibilidade pode ser bem mais baixa em comparação a outras abordagens, dependendo da fase da infecção, por exemplo na fase crônica (com parasitemia intermitente) (Murray et al., 2005; Tojal da Silva et al., 2006).

Com a diversidade de tripanosomatídeos encontrada na natureza, aliada as semelhanças morfológicas entre algumas destas espécies, as ferramentas de biologia molecular tornaram-se essenciais para a acurada identificação do agente etiológico envolvido. Devido à importância médica e veterinária de parasitos desta família e a diversidade genética desses organismos, o conhecimento do genoma de diferentes espécies tem sido um campo bastante explorado nos últimos anos (Cavazzana et al., 2010; Martinkovic et al., 2012; Ramírez et al., 2014; Tschoeke et al., 2014). O genoma nuclear desta família mostra considerável plasticidade inter e intraespecífica, com espécies de *Leishmania* com 35 e 36 cromossomos (Peacock et al., 2007), enquanto que parasitos do gênero *Trypanosoma* apresentam entre 64 a 80 cromossomos (Cano et al., 1995; Henriksson et al., 1995). O kDNA também varia consideravelmente entre essas espécies e intra-espécie, especialmente em termos de número e diversidade na sequência dos minicírculos e maxicírculos. A presença das regiões conservadas e variáveis nas milhares de moléculas de minicírculos do kDNA, o torna um excelente marcador molecular para estudos de diagnóstico dos tripanosomatídeos. O número dessas regiões é variável e específico em determinados grupos destes parasitos (Figura 3). Somente uma região conservada é encontrada em *Crithidia oncopelti*, *T. brucei* e *Leishmania* spp. Já em *C. fasciculata*, *T. lewisi* e *Phytomonas serpens* são descritas duas cópias da região conservada, enquanto que em *T. cruzi* e algumas

cepas de *T. rangeli* existem quatro cópias dessa região conservada por molécula de minicírculo.

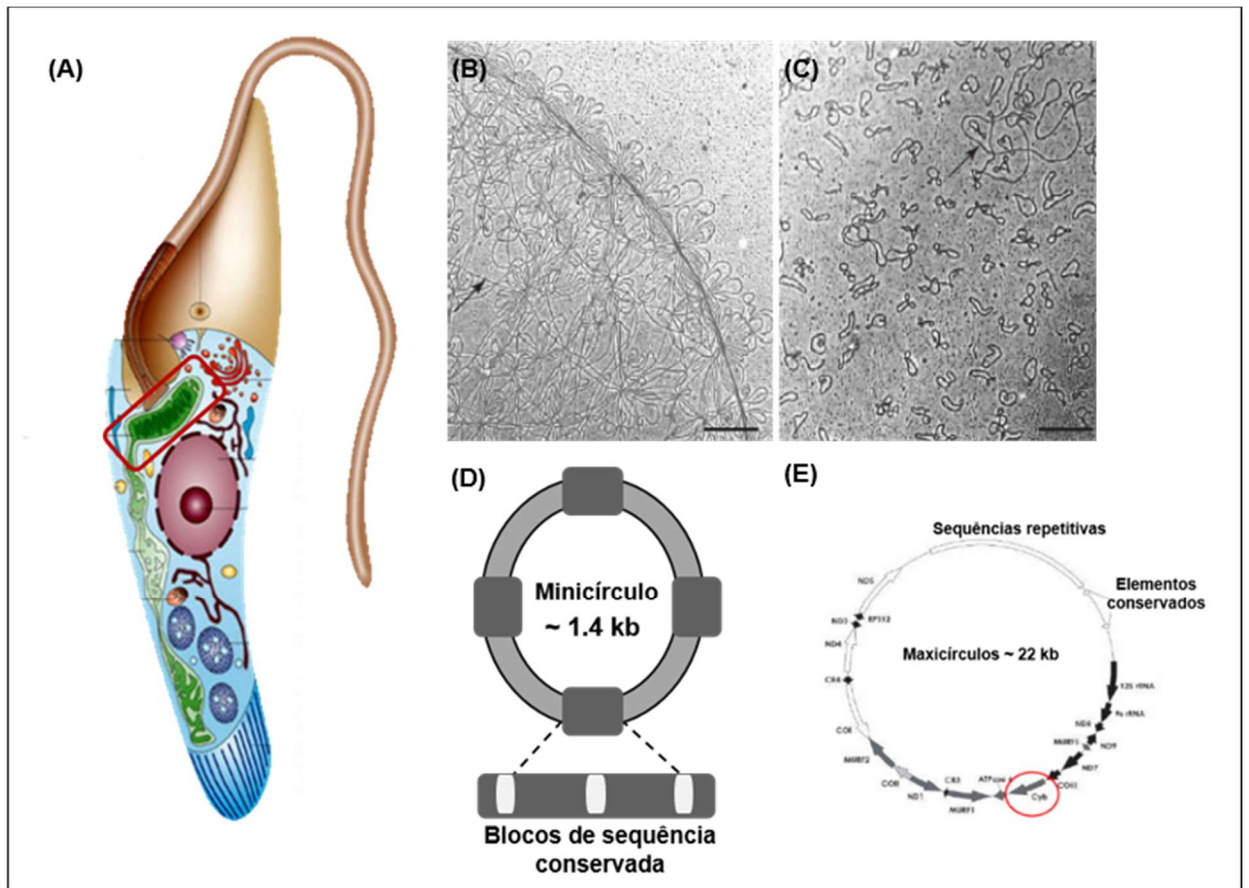


Figura 3. DNA do cinetoplasto presente na família Kinetoplastea. (A) Esquema ilustrativo da morfologia e organelas observadas na forma epimastigota de *T. cruzi* (Adaptado de Flávia Leite). (B) Microscopia eletrônica da estrutura de kDNA de *C. fasciculata*. (C) kDNA desconcatenado. (B e C – adaptados de Liu et al., 2005). As setas indicam os maxicírculos. (D) Minicírculo do kDNA de *T. cruzi* com suas quatro regiões conservadas (destacando os blocos de sequências altamente conservadas), intercaladas por sequências variáveis. Adaptado de Pimentel, 2012. (E) Maxicírculo de kDNA e os principais genes codificados nesta região. Adaptado de Westenberger et al., 2006.

Os marcadores comumente utilizados para diagnóstico e estudos de filogenia molecular para os tripanosomatídeos, são direcionados a diversas regiões do gene ribossômico como o SSU rRNA e sequencias espaçadoras intergênicas, genes mitocondriais como Citocromo B, Citocromo Oxidase e as regiões conservadas dos

minicírculos do kDNA, além de genes nucleares como gGAPDH, "*spliced leader*", a região variável do gene hsp70 e sequências satélites nucleares (Souto et al., 1999; Noyes et al., 1999; Stevens & Gibson, 1999; Hamilton et al., 2004; Deborggraeve et al., 2008; Smith et al., 2008; Luciana Lima, 2011).

1.6.1 Diagnóstico molecular da infecção por *Trypanosoma* spp.

O diagnóstico molecular de *Trypanosoma* spp. pode ser realizado a partir dos genomas mitocondrial e nuclear. Os genes mitocondriais dos tripanosomas estão localizados nas moléculas de maxi e minicírculos, concatenadas entre si, que em conjunto, compõem a rede de DNA do cinetoplasto ou kDNA. Os minicírculos (~750 - 1400 pb) são encontrados em grande quantidade (10.000 – 20.000 cópias por célula) e são responsáveis pela codificação de RNAs guias (RNAg) que controlam a especificidade da edição de RNA dos genes de maxicírculos (Simpson 1986; Lukes et al., 2002). Já os maxicírculos, apresentam aproximadamente 20 - 40 kilo bases (kb), são encontrados em menor quantidade (20 – 50 cópias por célula) e são, em sua maior parte, conservados entre todos os tripanosomas (Flegontov et al., 2006; Simpson 1986; Westenberger et al., 2006). São responsáveis pelo carregamento de genes que codificam para o rRNA, além de genes estruturais codificantes para proteínas ribossômicas e enzimas da cadeia respiratória como Citocromo B e Citocromo Oxidase I (Simpson et al., 1985) (Figura 3). A manutenção dessa organização inalterada do kDNA (presença de quatro regiões de sequências conservadas intercaladas pelas regiões altamente variáveis) nas diferentes linhagens de *T. cruzi*, sugere que os minicírculos podem possuir um papel funcional ou estrutural relevante, e pelo elevado número de cópias destas moléculas por célula, poderiam representar um marcador molecular para o diagnóstico deste tripanosomatídeo, apesar do grande polimorfismo observado nas regiões variáveis dos minicírculos em um único parasito e entre as populações (Junqueira et al., 2005).

A caracterização molecular (identificação de espécie de *Trypanosoma* e/ou subpopulação do parasito) atualmente é realizada quase que exclusivamente baseada em genes ribossômicos (RNA ribossômicos – rRNA). A ampla distribuição, a diversidade de funções em todos os organismos e as diferentes taxas de evolução

destes genes os coloca entre aqueles mais utilizados em diversos estudos (Hernandez et al., 1990; Dietrich et al., 1993). Esses genes consistem de unidades de repetição compostas por unidades de transcrição (cistrons ribossômicos), intercaladas por um espaçador intergênico (IGS), que se repete "*in tandem*" entre 100 e 200 vezes no genoma (Ramirez & Guevara, 1987; Guevara et al., 1992). A unidade de transcrição do pré rRNA é composta por três moléculas menores denominadas como 18S (SSU ou subunidade menor), e duas subunidades maiores (LSU): 5.8S e 24S (Sogin et al., 1986; Hernandez et al., 1990). Em tripanosomatídeos, a sequência da subunidade maior, 24S rDNA, é interrompida por um espaçador interno que gera duas moléculas: 24S α e 24S β . As sequências da subunidade do 18S rDNA, têm sido as mais utilizadas devido ao seu tamanho, facilidade de amplificação e a presença de regiões conservadas que permitem alinhamentos mais confiáveis (Hamilton & Stevens, 2010; Pinto et al., 2012). Essa subunidade é composta por oito regiões universalmente conservadas (U1 - U8) e nove regiões variáveis (V1 - V9) (Hernández et al., 1990). A região V7V8 dessa subunidade é uma das regiões hipervariáveis do gene que codifica a subunidade menor do RNA ribossômico, sendo também bastante utilizada para análise filogenética dentro da família Trypanosomatidae. Sequências de SSU rRNA de diferentes espécies do gênero *Trypanosoma* já estão depositadas em bancos de sequências, que facilitam a identificação de novas espécies e possibilitam inferir nas relações entre essas novas espécies, linhagens e isolados.

Outros genes comumente utilizados para o estudo do gênero *Trypanosoma* são o gGAPDH e o *spliced leader* ou mini éxon (Pavão 2002; Leite et al., 2009). A família Trypanosomatidae possui uma organela denominada glicossoma, responsável pelo metabolismo da glicose e glicerol (Michels et al., 1986, 2000; Borghesan et al., 2013). São encontrados no genoma nuclear destes organismos, dois genes: gGAPDH, que codifica a enzima presente no glicossomo e o gene cGAPDH que codifica a enzima encontrada no citosol (Michels et al., 1986; Kendall et al., 1990). Os genes de gGAPDH apresentam duas cópias praticamente idênticas, apresentam taxa de evolução menor quando comparado aos genes ribossômicos e também são muito utilizados para a análise de relações filogenéticas entre organismos distantes (Hannaert et al., 1998; Cabalero-Espinosa, 2014). A análise em conjunto das sequências geradas pelos genes gGAPDH e SSU rDNA geram topologias congruentes e vem sendo recomendada na descrição de novas espécies de

tripanosomatídeos (Hamilton et al., 2004, 2005, 2009; Viola et al., 2009; Maslov et al., 2010; Teixeira et al., 2011, Lopes, 2014). Já o grande número de cópias do gene de mini éxon e seus diferentes graus de conservação, com éxons altamente conservados, íntrons ligeiramente conservados e regiões intergênicas bastante variáveis, permitem o diagnóstico e inferências taxonômicas entre diferentes espécies de *Trypanosoma* spp (Sturm et al., 1998; Brisse et al., 2001; Ventura et al., 2001; Herrera et al., 2007; Falla et al., 2009; Rodrigues et al, 2010).

1.6.2 Diagnóstico molecular da infecção por *Leishmania* spp.

Devido ao elevado número de cópias de minicírculos por célula, o kDNA é o alvo mais comumente utilizado para o diagnóstico da infecção por *Leishmania* spp. (Simpson, 1973; Volpini et al., 2004, 2006; Pereira et al., 2008; Ampuero et al., 2009; Romero et al., 2009; Roque et al., 2010; Cássia-Pires et al., 2014). São propostos vários iniciadores que amplificam regiões do kDNA, porém a maioria desses marcadores, são direcionados à região conservada dos minicírculos e comum a todas as espécies do gênero, não sendo capazes de identificar variabilidade interespecífica (da Graça et al., 2012). Embora a análise de polimorfismo a partir de fragmentos de restrição do kDNA apresente variabilidade para diferenciar entre gêneros e subgêneros e alguns complexos, sua capacidade discriminatória, através da PCR RFLP, foi descrita apenas para algumas espécies do gênero, como *L. braziliensis* e *L. infantum* (Arno & Barket, 1981; Pacheco et al., 2000; Volpini et al., 2004, 2006). O gene mitocondrial, Citocromo b (Cyt b), está envolvido nos processos de transporte de elétrons da cadeia respiratória mitocondrial (Asato et al., 2009). É um gene conservado, de cópia única, localizado nas moléculas dos maxicírculos do kDNA e bastante utilizado para a caracterização de isolados do gênero *Leishmania* (Luyo-Acero et al., 2004). Trabalhos de filogenia, utilizando esse marcador molecular, sugerem algumas modificações pontuais na classificação taxonômica deste grupo, principalmente entre as espécies do Velho Mundo, mas ainda corroborando a classificação clássica proposta por Lainson e Shaw (1987) (Asato et al., 2009). Embora os ensaios moleculares direcionados para Cyt b, tenham essa capacidade discriminatória em diferenciar as espécies de ambos os subgêneros, a sensibilidade

desse marcador é muito menor frente à sensibilidade analítica e diagnóstica da PCR para o kDNA (Lopes et al., 2016).

Dentre os marcadores moleculares que resultam em produtos de PCR com variação interespecífica nas sequências de DNA, estão aqueles direcionados para as sequências repetitivas de DNA nuclear, para os genes codificantes da glicoproteína 63 (gp63) e da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), para o gene mini éxon e os espaçadores internos transcritos (ITS) 1 do rDNA, além do gene codificante para as proteínas de choque térmico (hsp) e do gene 7SL RNA (Piarroux et al., 1993; Victoir et al. 1998; Castilho et al., 2003; Schönian et al., 2003; Garcia et al., 2004; Kato et al., 2005; Zelazny et al., 2005; Fraga et al., 2010).

O gene codificante para a proteína de superfície gp63, encontrada em todo o gênero *Leishmania*, é bastante utilizado no Velho Mundo com elevada capacidade discriminatória entre as espécies do complexo *L. donovani*, além de ter sido utilizado para o diagnóstico de *L. infantum* no Novo Mundo (Mauricio et al., 2000; Guerbouj et al., 2001; Dujardin et al., 2002). A Glicose-6-fosfato–desidrogenase (G6PD) é uma enzima que participa na via das pentoses (PPP) e na síntese de proteínas que atuam contra o estresse oxidativo que o parasita enfrenta dentro da célula hospedeira. A sua isoforma, G6PD-7, possibilita a diferenciação de *L. braziliensis* das demais espécies do subgênero *L. (Viannia)* tendo como base a diferença de três pares de bases do gene codificante (Barrett, 1997; Cupolillo et al., 1994; 1997; Castilho et al., 2003, 2008). O gene 7SL RNA codifica moléculas responsáveis pela translocação de proteínas através do retículo endoplasmático (Walter & Blobel, 1982). Essas moléculas são abundantes nas células de todos os tripanosomatídeos e possui regiões conservadas e variáveis que permitem a diferenciação em nível de espécies de *Leishmania* (Zelazny et al., 2005; Nasereddin & Jaffe, 2010).

O gene do mini éxon está envolvido no processo de *trans-splicing* em todos os tripanosomatídeos. São genes nucleares multicópias que se repetem *in tandem* mais de cem vezes no genoma, onde cada cópia contém tanto uma região transcrita conservada quanto uma região variável não transcrita, a qual consegue diferenciar os três grandes complexos do gênero: *L. braziliensis*, *L. mexicana* e *L. donovani*, em relação ao tamanho e sequência desta região (Hassan et al., 1992; Fernandes et al., 1994; Haris et al., 1998). A região ITS1 do rDNA está entre as mais utilizadas para o diagnóstico e identificação de espécies de *Leishmania* no Velho Mundo e, embora a

PCR RFLP com a enzima de restrição *HaeIII*, possibilite a distinção entre algumas espécies do Novo Mundo, seu perfil discriminatório não é capaz de diferenciar entre todas as espécies do subgênero *Viannia* (Cupolillo et al., 1995; Schönian et al., 2000, 2003, 2010; Acardi et al., 2012; Tomás-Pérez e Riera, 2013). Embora eficazes, a maioria dos métodos descritos apresenta limitações em seus perfis discriminatórios e/ou necessitam de associação de técnicas, como a combinação de vários iniciadores e o fracionamento do DNA por enzimas de restrição, não existindo até então, um algoritmo molecular reproduzível e eficaz para a caracterização de *Leishmania* spp., principalmente aquelas do subgênero *L. (Viannia)*, que são as mais dispersas no país.

Entre os alvos já mencionados para a identificação específica de *Leishmania*, o gene codificante para as proteínas de choque térmico tem se mostrado bastante útil para a identificação de uma ampla gama de espécies de diversas origens geográficas (Zampieri et al., 2016). Essas proteínas (hsp70) atuam como componentes de vias celulares relacionadas com chaperonas moleculares e dobramento de proteínas envolvidas em processos decorrentes de danos provocados por calor (Bukau & Horwich, 1998; Lindquist & Craig, 1988). A proteína, bem como o seu gene codificante, vem sendo amplamente utilizados para estudos filogenéticos de diferentes parasitos, como *Cryptosporidium* spp., *Babesia* spp., *Giardia* spp., *Entamoeba* spp., *Microsporidium* spp. e *Blastocystis hominis* (Sulaiman et al., 2000; Arisue et al., 2002; Yamasaki et al., 2002; 2007; Langkjaer et al., 2007). O gene hsp possui regiões conservadas e polimórficas, e seus polimorfismos permitiram que Graça e colaboradores (2012) desenvolvessem iniciadores que se anelam à região altamente polimórfica desse gene, de 234 pares de bases (pb), sendo capazes de diferenciar as principais espécies de *Leishmania* que circulam em território nacional, incluindo espécies do subgênero *L. (Viannia)*.

1.7 Sistema Multiplex de diagnóstico molecular

As ferramentas de biologia molecular utilizadas como métodos de diagnóstico buscam associar a alta sensibilidade para a detecção dos parasitos aliada à elevada especificidade para a acurada identificação do agente etiológico (Bensoussan et al., 2006; Schönian, 2010; da Graça et al., 2012; Koltas et al., 2016). Entretanto, independente do marcador escolhido, resultados falso negativos em uma PCR podem

ser decorrentes das etapas iniciais do processo, como degradação da amostra, problemas na extração de DNA e a presença de inibidores da enzima DNA polimerase no material a ser processado para análise. Esses resultados falso negativos afetam o cálculo das taxas de infecção, às vezes subestimando-as em uma determinada localidade e minimizando o problema de saúde pública.

Chamberlain e colaboradores (1988) descreveram pela primeira vez um sistema de PCR multiplex que consistia na amplificação simultânea de dois *locus* de um mesmo gene envolvido na distrofia muscular de Duchene, em única reação usando mais de um par de iniciadores. No campo da Parasitologia, esse tipo de abordagem vem sendo utilizada tanto para o diagnóstico simultâneo de parasitos quanto para a detecção da viabilidade de uma amostra, atuando como um controle interno da reação, para evitar resultados falso negativos (Sachadyn & Kur, 1998; McAuliffe et al., 2013; Gonçalves-de-Albuquerque et al., 2012, 2014; Hu et al., 2015). Trabalhos recentes, utilizando PCR Multiplex, se mostraram capazes de detectar até sete espécies distintas de parasitos em uma única reação, otimizando tempo e reagentes que seriam consumidos ao se realizar múltiplas reações para o diagnóstico desses parasitos (Taniuchi et al., 2011). Entretanto, a maioria de trabalhos que utilizam essa ferramenta, busca o diagnóstico de parasitos próximos e/ou sublinhagens de uma mesma espécie (Elnifro et al., 2000; Nordstorm et al., 2007; Lee et al., 2016; Maria et al., 2016). Como controle interno da reação, essa metodologia está um pouco mais difundida para o diagnóstico de bactérias patogênicas, para o controle de qualidade em amostras de origem alimentar, além do diagnóstico de vírus em plantas e animais, incluindo o homem (Jones et al., 2000; Menzel et al., 2002; Rip & Gouws, 2009). Com exceção dos trabalhos de diagnóstico de *Leishmania* spp. em flebotomíneos (Pita-Pereira et al., 2005), a maioria dos trabalhos para o diagnóstico da infecção por protozoários foca nas possíveis coinfeções em uma mesma amostra, e não utilizam os genes constitutivos de seus hospedeiros como controle interno da reação (Haque et al., 2006; Hove et al., 2007; Liarte et al., 2009; Cura et al., 2015; Shin et al., 2016). Os genes mais utilizados como controles internos são classificados como “*housekeeping genes*” e estão envolvidos nos processos básicos para a manutenção celular (Chapman & Waldenström, 2015). É esperado que esses genes sejam expressos em todas as células de um organismo em condições normais, independente do tipo de tecido, fase de desenvolvimento, estágio do ciclo celular e/ou

sinais externos (Eisenberg & Levanon, 2013). Em estudos com hospedeiros vertebrados, os iniciadores mais comumente utilizados são aqueles direcionados ao gene *GAPDH*, β -actina, tubulina, albumina e as subunidades 18S e 28S do rRNA (Suzuki et al., 2000; Chapman & Waldenström, 2015).

A enzima Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase (G3PD), codificada pelo gene nuclear *GAPDH*, possui um papel crucial no metabolismo da glicose. Essa enzima é expressa nas células de todos os organismos que utilizam glicose para produção energética, possui funções nucleares, citoplasmáticas e de membrana, as quais estão envolvidas na catalização do processo no qual a glicose é convertida em piruvato (Meyer-Siegler et al. 1991; Edwards and Denhardt 1985; Winer et al. 1999). A presença deste gene em todas as células de mamíferos garante a sua detecção em amostras que têm condições adequadas para testes de diagnóstico, tornando-se uma ferramenta potencial para o controle da qualidade das amostras nos ensaios de PCR (Castilho et al., 2008; Paiva-Cavalcanti et al., 2009). Outros *housekeeping genes* como β -actina, β -globina e os codificantes para as proteínas da família albumina também vêm sendo utilizados como controles internos de ensaios de PCR (Mary et al., 2004; Gilsbach et al., 2006; Kompalic-Cristo et al., 2007; Solano-Gallego et al., 2007). Entretanto, na maioria destes testes, a avaliação da qualidade da amostra é feita em uma reação separada daquela realizada para o diagnóstico. Embora também eficaz, essa metodologia gera ainda mais custos e tempo necessário para o diagnóstico do que seria se estes genes fossem testados concomitantemente ao agente etiológico pesquisado, em uma mesma reação de PCR (Müller et al., 2003; Gonçalves-de-Albuquerque et al., 2012).

Considerando o diagnóstico molecular da infecção por *Leishmania* spp. em mamíferos, um sistema de PCR Multiplex deve associar o diagnóstico de infecção por *Leishmania* spp. com a confirmação da viabilidade da amostra, pela identificação de parte constitutiva do DNA do hospedeiro mamífero. Para o diagnóstico da infecção em insetos vetores, a metodologia de PCR Multiplex já é bem estabelecida com o diagnóstico simultâneo do kDNA de *Leishmania* spp. e da região IV6 do gene *cacophony* em insetos flebotomíneos (Pita-Pereira et al., 2005; Carvalho et al., 2013; Neitzke-Abreu et al., 2014). Em *Leishmania* spp., dois estudos propuseram metodologias semelhantes, buscando associar o diagnóstico da infecção e de genes constitutivos de mamíferos, no entanto, as abordagens propostas podem limitar a

capacidade de detecção destes parasitos, visto que foram padronizadas com alvos moleculares para diagnóstico espécie-específico do parasito, a saber *L. braziliensis* e *L. infantum* (Gonçalves-de-Albuquerque et al., 2012, 2014). Dessa maneira, não há na literatura, até o presente estudo, um sistema de PCR Multiplex que detecte, em uma única reação, um gene constitutivo de um hospedeiro mamífero silvestre e a infecção por parasitos do gênero *Leishmania*, de forma ampla, principalmente sabendo-se da diversidade de espécies deste parasito que circulam no Brasil.

2. JUSTIFICATIVA

As leishmanioses são doenças reemergentes e consistem em importante problema de saúde pública em expansão em todo o Brasil. O desconhecimento de muitos aspectos da biologia e epidemiologia dos componentes do ciclo de transmissão destes parasitos pode resultar em falhas no estabelecimento de estratégias de controle. Muitos mamíferos hospedeiros de espécies de *Leishmania* ainda são desconhecidos, o que reforça a necessidade de estudos que busquem, de uma forma ampla e representativa, verificar a distribuição destes parasitos em outros táxons de mamíferos, além daqueles classicamente apontados como reservatórios.

Algumas espécies do gênero *Leishmania*, como *L. infantum*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis*, são parasitos multi-hospedeiros envolvidos em ciclos de transmissão complexos com a participação de mamíferos de diversas ordens e dezenas de espécies de flebotomíneos. Apesar disso, o conhecimento da enzootia ainda carece de estudos que investiguem as diferentes espécies de *Leishmania* que circulam na fauna silvestre, especialmente naqueles grupos de mamíferos cuja biologia e/ou relatos prévios da infecção sugerem sua participação como reservatórios. Entre estes, incluem-se algumas espécies de mamíferos sinantrópicos, ou seja, mamíferos adaptados a viver em um ambiente modificado pelo homem. Nestes ambientes, a redução progressiva dos habitats silvestres decorrentes principalmente da ação humana, leva a perda da diversidade da fauna local e da disponibilidade de recursos naturais. Esse cenário promove um maior contato entre animais silvestres, sinantrópicos, domésticos e o homem, bem como modificações na ecologia de vetores, parasitos e potenciais reservatórios, o que pode favorecer a emergência e a reemergência de infecções por esses parasitos (Roque & Jansen, 2014).

Os quirópteros representam 39% das 560 espécies de mamíferos já reportadas na América do Sul, sendo o grupo mais comum em termos de diversidade e biomassa neste continente (Emmons e Feer, 1997; Rotureau, 2006). A capacidade de voar destes animais permite-os a exploração de uma ampla área geográfica. Além da dispersão, a longevidade dos morcegos pode influenciar na disseminação e persistência de *Leishmania* spp. na natureza. A sua elevada abundância e adaptabilidade ao ambiente peridoméstico reforçam a importância de se investigar a

infecção por *Leishmania* spp. nestes mamíferos, já reconhecidos como reservatórios de outros tripanosomatídeos (Roque & Jansen, 2014).

O surgimento de novas metodologias para o diagnóstico molecular desses parasitos facilita o diagnóstico da infecção em tecidos coletados de diversos hospedeiros vertebrados durante expedições a campo, onde o sucesso da realização de culturas é sempre comprometido dado às dificuldades de realizá-la de forma asséptica. Nesse sentido, a ferramenta de PCR Multiplex que busque dois alvos simultaneamente: (i) um de alta sensibilidade e que identifica a presença do parasito; (ii) e outro que identifica a viabilidade do material genético do hospedeiro vertebrado, atuando como controle interno da reação, evitando assim a ocorrência de resultados falso negativos; pode contribuir fortemente para o conhecimento de novos hospedeiros naturais de *Leishmania* spp. Com a melhoria no diagnóstico decorrente do uso desta ferramenta e a ampliação do número de animais amostrados em estudos de diagnóstico da infecção, aumenta-se também a probabilidade do encontro de infecção em espécies até então pouco estudadas, como os morcegos, que podem se revelar importantes reservatórios da parasitose. No sentido de manter a sensibilidade de um alvo multicópias como o kDNA para o diagnóstico de *Leishmania* e evitar possíveis falso negativos por conta de degradação da amostra, a padronização de uma PCR Multiplex para o gene GAPDH de mamíferos e a região conservada dos minicírculos do kDNA de *Leishmania* spp. pode se tornar um diferencial em estudos futuros.

O diagnóstico específico de *Leishmania* é crucial para entendermos a complexa rede de transmissão das diferentes espécies deste gênero. Esta identificação é especialmente relevante na América Latina, onde diferentes espécies podem ser encontradas no mesmo foco de transmissão (Montalvo et al., 2010). Apesar disso, poucos trabalhos avançam na proposição de um chaveamento taxonômico reprodutível e padronizado para a identificação de espécies de *Leishmania* como proposto por Cássia-Pires e colaboradores (2014).

Assim como *Leishmania* spp, parasitos do gênero *Trypanosoma* também infectam morcegos e apresentam características semelhantes entre si: ciclos de transmissão complexos e peculiares para cada região de ocorrência. Diversos trabalhos relatam a infecção natural de morcegos por diversos tripanosomatídeos, dos subgêneros *Schizotrypanum* e *Megatrypanum* (Grisard et al., 2003). No Brasil, apesar dos inúmeros relatos da infecção por parasitos do gênero *Trypanosoma*, há poucos

estudos que estudem o ciclo de transmissão destes parasitos na natureza (Deane, 1961; Molyneux, 1991) e, em especial, sua ocorrência concomitante em morcegos infectados por *Leishmania* spp.

Esta tese propõe-se a: (i) padronizar uma ferramenta de PCR Multiplex para diagnóstico da infecção por *Leishmania* em tecidos de mamíferos silvestres, minimizando a possibilidade de resultados falso negativos; (ii) buscar a infecção em um número representativo de espécies de morcegos provenientes de diferentes habitats e coletados em áreas com distintos perfis de transmissão; e (iii) avaliar o papel destes animais diretamente numa área endêmica e recente de transmissão, avaliando sua participação no ciclo de transmissão de parasitos dos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*.

3. OBJETIVOS

Os objetivos centrais desta tese consistem em investigar a infecção natural de morcegos por parasitos dos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* em diferentes regiões do Brasil e estabelecer uma ferramenta de PCR-Multiplex para o diagnóstico da infecção por *Leishmania* spp. em hospedeiros mamíferos.

3.1 Objetivos específicos

- Diagnosticar a infecção por *Leishmania* spp. em fragmentos de baço de morcegos previamente coletados em diferentes regiões do Brasil;
- Analisar e descrever a fauna de morcegos capturados uma área endêmica de ocorrência de Leishmaniose Visceral Americana (LVA);
- Diagnosticar a infecção por tripanosomatídeos nestes morcegos;
- Caracterizar os isolados de tripanosomatídeos sanguíneos de morcegos;
- Identificar a espécie de *Leishmania* envolvida nas amostras positivas através da PCR HSP70(234) e posterior sequenciamento;
- Estabelecer a PCR-Multiplex como ferramenta de triagem no diagnóstico da infecção por *Leishmania* spp. em hospedeiros mamíferos silvestres.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Declaração de comitê de ética

Todos os procedimentos realizados com os animais utilizados neste trabalho foram autorizados pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais (IBAMA) (41683-3, 41683-5) (Anexos 1 e 2) e seguiram os protocolos do Comitê de Ética e Uso de Animais da Fiocruz (P0007-99, P0179-03, P0292/06, L0015-07, e L81-12) (Anexo 3). A amostra de DNA humano não infectado utilizado como controle em uma das etapas deste trabalho, foi gentilmente doado pela Dra. Constança Britto, sendo derivado de estudos aprovados pelo Comitê de Ética e conduzidos no Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas (IOC/FIOCRUZ).

4.2 Amostras provenientes da Coleção de Baços

Amostras de fragmentos de baço de 138 morcegos, de 18 diferentes espécies capturadas em três biomas brasileiros (Tabela 1) foram coletadas em sete diferentes expedições científicas no Brasil entre 2006 e 2015, realizadas pelo Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, e incorporadas ao presente estudo para o diagnóstico molecular de *Leishmania* spp. Os fragmentos de baço utilizados neste trabalho foram armazenados em tubos plásticos a -20°C. Os métodos de captura dos animais foram semelhantes ao descrito com maior detalhamento no próximo tópico.

Tabela 1. Origem das amostras de fragmentos de baços de morcegos

Espécie	N Amostral	Bioma	Município/Estado	Mês/Ano
<i>Anoura caudifer</i>	14	Mata Atlântica	Petrópolis/RJ	Julho/2010
<i>Anoura geoffroyi</i>	13	Mata Atlântica	Petrópolis/RJ	Julho/2010
<i>Artibeus fimbriatus</i>	3	Mata Atlântica	Florianópolis/SC	Out/2014; Mai/2015
<i>Artibeus lituratus</i>	5	Mata Atlântica	Petrópolis/RJ	Julho/2010
	2	Mata Atlântica	Piraí/RJ	Junho/2008
	4	Amazônia	Abaetetuba/PA	Agosto/2008
<i>Artibeus planirostris</i>	12	Amazônia	Abaetetuba/PA	Agosto/2008
<i>Carollia perspicillata</i>	9	Mata Atlântica	Petrópolis/RJ	Julho/2010
	11	Mata Atlântica	Rio de Janeiro/RJ	Outubro/2013
	3	Mata Atlântica	Florianópolis/SC	Out/2014; Mai/2015
	3	Amazônia	Abaetetuba/PA	Agosto/2008
<i>Desmodus rotundus</i>	7	Mata Atlântica	Petrópolis/RJ	Julho/2010
	7	Mata Atlântica	Rio de Janeiro/RJ	Outubro/2013
<i>Diphylla ecaudata</i>	1	Mata Atlântica	Petrópolis/RJ	Julho/2010
<i>Eptesicus brasiliensis</i>	2	Cerrado	Aporé/GO	Agosto/2006
<i>Glossophaga soricina</i>	10	Mata Atlântica	Petrópolis/RJ	Julho/2010
<i>Micronycteris microtis</i>	1	Mata Atlântica	Petrópolis/RJ	Julho/2010
	1	Mata Atlântica	Rio de Janeiro/RJ	Outubro/2013
<i>Myotis nigricans</i>	1	Cerrado	Aporé/GO	Agosto/2006
<i>Myotis sp.</i>	3	Mata Atlântica	Florianópolis/SC	Out/2014; Mai/2015
<i>Phyllostomus hastatus</i>	10	Cerrado	Aporé/GO	Agosto/2006
<i>Sturnira lilium</i>	2	Mata Atlântica	Piraí/RJ	Junho/2008
	8	Mata Atlântica	Petrópolis/RJ	Julho/2010
	1	Mata Atlântica	Florianópolis/SC	Out/2014; Mai/2015
<i>Sturnira tildae</i>	1	Mata Atlântica	Florianópolis/SC	Out/2014; Mai/2015
<i>Tonatia bidens</i>	1	Mata Atlântica	Rio de Janeiro/RJ	Outubro/2013
<i>Vampyressa pusilla</i>	3	Mata Atlântica	Florianópolis/SC	Out/2014; Mai/2015
	N=138			

4.3 Amostras obtidas em trabalho de campo

As demais amostras de morcegos para o desenvolvimento deste trabalho foram coletadas na Reserva Biológica Guaribas – Rebio Guaribas (6°43'44.9" S, 35°08'22.4" W), localizada entre os municípios de Mamanguape e Rio Tinto, litoral norte do estado da Paraíba. Ambos os municípios são classificados como endêmicos para LVA, com relatos da infecção em cães e humanos (Ministério da Saúde/DATASUS, 2015). O clima da região é classificado como tropical úmido, com estação seca no verão e chuvosa no inverno (Köppen, 1936). A precipitação média anual é de 1512 mm para

Mamanguape e 1310 mm para Rio Tinto com médias térmicas entre 24° e 26°C e elevação entre 60 e 204m (Ibama, 2003; AESA/PB, 2004).

A Rebio é composta por um dos poucos remanescentes de Floresta Atlântica preservada na região nordeste do Brasil, e está inserida em uma área de 4028.55 ha, sendo dividida em três fragmentos distintos: SEMA 1 - 673.64 ha; SEMA 2 - 3016.09 ha; e SEMA 3 - 338.82 ha (Ibama, 2003; Feijó et al., 2016). A reserva é composta principalmente por dois tipos de fitofisionomias: (I) Savana arbórea aberta, caracterizada por espécies herbáceas e aglomerações esparsas de vegetação arbórea arbustiva, além de espécies peculiares, (II) Floresta Estacional Semidecídua, composta por uma formação florestal com espécies típicas da Mata Atlântica e elementos amazônicos com algumas áreas em processo de regeneração (Prates et al., 1981; Oliveira Filho & Carvalho, 1993; Darrault & Schlindwein, 2002; de Souza et al., 2005).

4.3.1 Captura e coleta de animais

Os morcegos foram coletados na Rebio Guaribas, nas áreas denominadas: SEMA 1, com um ponto de amostragem; e SEMA 2, com quatro pontos de amostragem. As coletas ocorreram entre os meses de maio/junho (2014) e março/abril (2015), ambas durante a estação chuvosa com duração de 10 noites/cada (Tabela 2).

Tabela 2. Localização e caracterização florestal dos pontos de amostragem da Rebio Guaribas

Área de coleta	Áreas de amostragem	Coordenadas geográficas (SUL/OESTE)	Fitofisionomia Floresta Atlântica
SEMA 2	Unhão	35.1404; 6.7340	Floresta semidecídua
	Cabeça de Boi	35.1728; 6.7286	Floresta semidecídua
	Poste de Cimento	35.1929; 6.7135	Floresta semidecídua
	Tabuleiro Grande	35.1641; 6.6971	Savana arbórea aberta
SEMA 1	Capim Azul	35.1222; 6.7007	Savana arbórea aberta

As coletas foram realizadas por duas noites consecutivas em cada ponto de amostragem. Para a captura dos morcegos, foram utilizadas 10 redes de neblina (5 de tamanho 12m x 2,5m, 3 com 3m x 2,5m e 2 com 7m x 2,5m), modelo *mist-net* e confeccionadas em nylon com malha de 20 mm. Nas áreas com vegetação florestal decídua, foram utilizadas sete redes dispostas no sub-bosque e três armadas nos

dosséis das árvores. Nas demais áreas, todas as redes foram dispostas apenas no sub-bosque. Em cada ponto de coleta, foi traçado um transsecto de 30 metros no qual as redes foram dispostas com equidistância de três metros. As redes foram abertas a partir do período noturno e examinadas a cada 30 minutos de intervalo, com início às 18:00h e término às 00:00h. O esforço de amostragem total, ao longo dos dois anos, foi de 25.722 m² x hora.

Para cada animal capturado foi realizado as medidas biométricas, peso corporal e comprimento de estruturas chaves para identificação, além de outras informações como sexo, idade e condição reprodutiva. Os morcegos foram identificados taxonomicamente através de descrições originais e chaves de identificação para morcegos da América do Sul (Vizotto & Taddei, 1973; Anderson, 1997; Gardner, 2008). Todos os animais capturados foram depositados na Coleção de Mamíferos do Laboratório de Mamíferos, Departamento de Sistemática e Ecologia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

4.4 Diagnóstico Parasitológico

Os animais foram anestesiados com uma mistura de ketamina e acepran na proporção de 9:1, sendo 0,1 mL dessa solução para cada 100 g de peso corpóreo. Aproximadamente, 0,6 a 0,8 mL de sangue de cada animal foi retirado e cultivado em três diferentes tubos: dois com meio de cultura bifásico Novy-Mc Neal-Nicole (NNN) e infusão de triptose hepática; e outro contendo meio NNN enriquecido com Schneider, ambos buscando o isolamento de *Trypanosoma* spp. As hemoculturas foram examinadas a cada 15 dias por até cinco meses, enquanto as culturas de fragmentos de tecidos foram examinadas uma vez por semana durante um mês. No momento em que alguma forma flagelada fosse detectada, as culturas foram expandidas até obter massa de parasita com aproximadamente 10⁷-10⁸ parasitos, criopreservada e depositadas na Coleção de Tripanosomatídeos de Animais Domésticos, Silvestres e Vetores do Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos – COLTRYP (www.coltryp.fiocruz.br). Fragmentos de pele, baço e fígado também foram coletados em microtubos plásticos contendo etanol absoluto e mantidos a -20°C para o diagnóstico molecular de *Leishmania* spp.

4.5 Caracterização Molecular

4.5.1 *Trypanosoma* spp.

A extração de DNA das hemoculturas positivas foi realizada através do método de Fenol/Clorofórmio (Vallejo et al., 1999). Inicialmente, as culturas foram lavadas com solução fosfato salina (PBS), incubadas com proteinase K (100 µg/mL) e 0.5% de dodecil sulfato sódico (SDS) à 56°C por duas horas. O DNA extraído foi quantificado em NanoDrop 1000 Spectrophotometer® (Thermo Fisher Scientific) e ajustado sua concentração final entre 50 e 100 ng/µL. A caracterização molecular foi realizada através da análise de sequencias dos produtos amplificados nas reações de PCR direcionadas aos alvos 18S SSU e gGAPDH. Os ensaios de PCR foram realizados em ambientes totalmente separados das etapas pré e pós reação, além da descontaminação prévia da cabine de segurança e do material plástico utilizado com solução de hipoclorito de sódio à 0,5% e luz ultravioleta.

A amplificação para a região 18S da subunidade menor do rRNA foi realizada através de *Nested* PCR (~ 600/700 pb), através dos iniciadores externos TRY927 F (5'GAA ACA AGA AAC ACG GGA G3') e TRY927 R (5'CTA CTG GGC AGC TTG GA 3') e iniciadores internos: SSU561 F (5'TGG GAT AAC AAA GGA GCA3') e SSU561 R (5'CTG AGA CTG TAA CCT CAA AGC3') (Noyes et al., 1999). A primeira etapa consistiu em reações de 50 µL em tampão de enzima 5X contendo dNTPs (Fisher Biotec, Perth, Austrália), 3 mM de MgCl₂, 1,4 unidades de Taq DNA polimerase (Promega, Madison, EUA), 16 pmol de cada iniciador, DNA (~100 ng) e água ultrapura, durante 30 ciclos a 94°C por 30 segundos, 55°C por 60 segundos e extensão a 72°C por 90 segundos. Os produtos da primeira amplificação foram diluídos na proporção de 1:10 em água deionizada estéril, sendo utilizados 2 µL desta diluição como molde de DNA para a segunda amplificação, sob as mesmas condições de ciclagem descritas acima.

As reações de PCR para o gene gGAPDH (~800 pb) foram realizadas com os iniciadores GAPTRYmod F (5'GGB CGC ATG GTS TTC CAG3') e GAPTRYr R (5' CCC CAC TCG TTR TCR TAC C3') em volume final de 50 µL contendo tampão de enzima 10X (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 200 µM de dNTPs, 1.5 mM de MgCl₂, 2,5 unidades de Taq DNA polimerase (Platinum™ Taq DNA Polymerase), 10 pmol de cada iniciador, DNA (~100 ng) e água ultrapura sendo submetidas à ciclagem térmica

sob as seguintes condições: etapa inicial a 94°C por 3 minutos, seguida de 30 ciclos a 94°C por 1 minuto, 55°C por 2 minutos, 72°C por 1 minuto e uma extensão final a 72°C por 10 minutos (Violla et al., 2009a; Teixeira et al., 2011).

Os produtos amplificados foram diluídos em tampão de amostra (125 mM Tris-HCl, pH 6,8; 4% SDS; 20% glicerol e 0,002% azul de bromofenol), submetidos a corrida eletroforética a 100 V por uma hora em cuba horizontal em gel de agarose a 2%, visualizados após coloração com brometo de etídeo (10 mg/mL) e fotodocumentados em equipamento Gel Logic 212 Pro com o uso do programa Carestream MI SE. A purificação desses produtos de PCR foi realizada com o kit Illustra GFX PCR DNA (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) seguindo as especificações do fabricante. Os DNAs purificados foram submetidos a reação de sequenciamento, pelo método de terminação de cadeia através do kit *Big Dye Terminator V3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, Foster City, EUA). As reações para sequenciamento gênico foram realizadas com volume final de 7,5 µL utilizando-se 3,2 pmol de cada iniciador (18S rRNA e gGAPDH) e submetidas a 40 ciclos de repetição sob as seguintes condições de ciclagem térmica: 94°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos. Os produtos obtidos desta reação foram ressuspensos em isopropanol 75% (Merck, Alemanha) e 10 µL de formamida *Hi-Di*® (Applied Biosystems, EUA) que posteriormente, foram aplicados no sequenciador automático ABI3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, EUA)

As sequências foram editadas e alinhadas manualmente pelo programa BioEdit - Versão v7.1.11 (Hall, 1999) disponível no endereço <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/page2.htm>. A identificação das espécies foi feita por análise de similaridade obtida através do algoritmo *BLAST* (Basic Local Alignment Search Tool) descrito por Zhang e colaboradores (2000) e disponível no endereço <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/> contra sequências de referência obtidas junto ao *GenBank* (NCBI – *National Center for Biotechnology Information*) disponível no endereço <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>.

4.5.2 *Leishmania* spp.

O diagnóstico molecular frente a infecção por *Leishmania* spp. foi realizado tanto para as amostras de tecidos da Baçoteca quanto para todos os fragmentos de

tecido coletados e armazenados em etanol durante as expedições de campo realizadas na Rebio Guaribas. Inicialmente, estes fragmentos foram lavados por três vezes com Água Mili-Q para hidratação do material. O procedimento de extração de DNA foi realizado através do kit comercial *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega, Madison, EUA), seguindo instruções do fabricante. Após purificação, o DNA foi ressuspendido em 100 µL de solução de hidratação de DNA (*DNA Rehydration Solution*) e armazenado à -20°C até sua utilização. Para controle positivo da PCR foram utilizados fragmentos de baço e fígado de hamsters provenientes do Biotério do Instituto Oswaldo Cruz previamente infectados por *L. braziliensis* (MHOM/BR/2000/LTCP13396 = IOC-L2483) obtida junto à Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC/FIOCRUZ). Como controles negativos da etapa de extração de DNA, foram utilizados fragmentos de baço e fígado de hamster sadios obtidos do mesmo biotério. Um controle positivo e um negativo foram utilizados em cada reação. Tanto a extração de DNA quanto os ensaios de PCR foram realizados em ambientes separados fisicamente, além da realização das etapas de descontaminação prévia com hipoclorito de sódio 0,5% do material e bancada de trabalho. Para checar a presença de contaminantes nas reações de PCR, foi utilizado um controle negativo da reação, contendo todos os reagentes necessários, com exceção do DNA, além de água ultrapura para completar o volume.

As reações de PCR para o kDNA (~120 pb) foram realizadas com os iniciadores 150 F (5'GGG (G/T)AG GGG CGT TCT (C/G)CG AA3') e 152 R (5'(C/G)(C/G)(C/G) (A/T)CT AT(A/T) TTA CAC CAA CCC C3') através do kit comercial *PCR pureTaq Beads* (ilustra PuReTaq Ready-To-Go PCR Beads®, GE Healthcare). Cada reação foi realizada em volume final de 25 µL contendo 100 ng de cada iniciador, 200 µM de dNTPs, 50 mM de KCl, 1.5 mM de MgCl₂, tampão de enzima 1X, 2,5 unidades de Taq DNA Polimerase, 2 µL de DNA e água ultrapura para completar o volume. As reações foram submetidas à amplificação no termociclador Eppendorf Mastercycler® (Eppendorf, Stevenage, Inglaterra), sob as seguintes condições térmicas: etapa inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos a 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto, 72°C por 30 segundos e uma extensão final a 72° C por 5 minutos.

As amostras positivas para o kDNA, foram submetidas a reações de PCR para a região HSP70 (~234pb) realizadas com os iniciadores (5'GGA CGA GAT CGA GCG CAT GGT3') e (5'TCC TTC GAC GCC TCC TGG TTG3') em volume final de 50 µL

contendo 10 µM de cada iniciador, 250 µM de dNTPs, 50mM de MgSO₄, 5 unidades de Taq DNA Polimerase Hi Fidelity (Affymetrix, USB), DNA (concentração) e água ultrapura para completar o volume. As reações foram submetidas à ciclagem térmica no equipamento Eppendorf Mastercycler® obedecendo as seguintes condições: etapa inicial a 94°C por 1 minuto, seguida de 36 ciclos de amplificação a 94°C por 30 segundos, 58°C por 40 segundos, 72°C por 1 minuto e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Para aumentar a sensibilidade da reação, 5 µL dos produtos obtidos na primeira reação para HSP70(234) foram submetidos a uma segunda PCR com os mesmos iniciadores e mesmas condições. Como controles da reação foram utilizados o DNA obtido como controle positivo da etapa de extração e DNA extraído de promastigotas de *L. braziliensis* obtida junto à CLIOC (IOC/L0566 MHOM/BR/1975/M2903).

Os produtos amplificados de ambas as reações foram diluídos em tampão de amostra e submetidos a eletroforese com voltagem constante à 110 V, em mini géis de poliacrilamida 8% em tampão TBE 1X (Tris 0,04 M, Ácido Bórico 0,04 M e EDTA 0,02 M) por aproximadamente 50 minutos. Foram aplicados em cada poço de gel 7 µL de cada produto da PCR. Em cada corrida eletroforética foram adicionadas, além das amostras a serem testadas, os controles positivos e negativos utilizados desde a extração, o controle da mistura de PCR e um padrão de peso molecular de 50 pb (Promega, Madison, EUA). Após a eletroforese os géis foram revelados por nitrato de prata utilizando o kit Silver Stain Plus® (Bio Rad, Hercules, EUA). As imagens dos géis foram documentadas com o densitômetro GS-800® (Bio-Rad, Hercules, EUA).

Quando necessário, os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% preparado em tampão TAE 1X (10mM Tris-Acetato, 1mM EDTA) contendo 5 µL de SYBR® Green 10 X (Applied Biosystems, EUA) para a retirada das bandas de interesse e posterior purificação. Todas as amostras positivas para o marcador HSP70 (234) foram purificadas com o kit Illustra GFX PCR DNA (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) e submetidas ao processo de clonagem gênica através do kit *pGEM®-T Easy Vector System I* (Promega, Madison – WI, EUA). A reação de ligação dos fragmentos purificados obedeceu à relação molar vetor/inserto 5:1 em volume final de 6 µL, contendo 3 µL de tampão de ligação 2X, 0,5 µL (50 ng/ µL) de pGem T– Easy, 2 µL do produto de PCR para HSP70 purificado e 0,5 µL da enzima T4 DNA ligase (3 unidades/ µL). Essa reação foi incubada por 1 hora a 25°C e, posteriormente, a 4°C de um dia para o outro.

A etapa de transformação foi realizada através de choque térmico com o auxílio de células competentes de *Escherichia coli*, linhagem DH5 α (Sambrock et al., 1989). Um volume de 200 μ L da solução contendo as células já transformadas com os produtos da ligação foi disposto em placas de Petri, produzidas previamente, contendo 20 mL de meio LB ágar suplementado com 100 μ g/mL de ampicilina, 80 μ g/mL de X-gal (50 mg/mL) e 0,5 mM de IPTG. As placas foram mantidas em estufa à 37°C por 18 horas, com observação final, do crescimento de colônias brancas e azuis.

Para a extração do DNA plasmidial, foram selecionadas três colônias brancas de cada amostra, contendo as células transformadas que foram misturadas a um inóculo de 1 mL de meio Circlegrow® contendo 100 μ g/mL de ampicilina, em placas de 96 poços de fundo U. Os inóculos foram incubados a 37°C por 21 horas sob agitação de 200 rpm. Após o crescimento das culturas, as células foram coletadas por centrifugação à 4.000 rpm por 6 minutos à 20°C. A purificação do DNA plasmidial, através das células sedimentadas, foi realizada através do método de lise alcalina (Sambrock et al., 1989). Posteriormente, as células foram lavadas com 240 μ L de tampão GET (glucose 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8,0) e ressuspensas em 83 μ L de GET com RNase (0,4 μ g/ μ L). Foram adicionadas 80 μ L de solução de lise alcalina (NaOH 0,2 N e SDS 1%) e as placas foram homogeneizadas 30 vezes por inversão, incubadas a 80°C por 40 minutos e resfriadas em gelo por 12 minutos. Após uma centrifugação a 4.000rpm por 9 minutos, o sobrenadante foi transferido e purificado em placas *AcroPrep™ 96 Filter Plates* (Pall do Brasil LTDA, São Paulo – SP, Brasil). Para finalizar, o DNA foi precipitado em isopropanol 100%, lavado em etanol 70% e ressuspensado em 33 μ L de água ultrapura estéril.

O DNA purificado foi quantificado em NanoDrop 1000 Spectrophotometer® (Thermo Fisher Scientific) e sequenciado com o kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* no equipamento ABI3730 DNA analyzer junto a Plataforma de Genômica - Sequenciamento de DNA/PDTIS-FIOCRUZ. As reações de sequenciamento foram realizadas a partir de 250 ng de cada plasmídeo purificado e 3.2 pmoles dos iniciadores M13 F (5' GTA AAA CGA CGG CCAG 3') e M13 R (5' CAG GAA ACA GCT ATG AC 3') (Invitrogen, São Paulo, Brasil).

Da mesma maneira ao realizado para a amostras de isolados de tripanosomatídeos, as sequências foram editadas e alinhadas manualmente com o programa BioEdit. A identificação das espécies foi feita por análise de similaridade

obtida através do algoritmo *BLAST* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/>) contra sequências de referência obtidas junto ao *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

4.6 Desenvolvimento da PCR Multiplex

4.6.1 Desenho dos iniciadores e análise *in silico*

Considerando os tamanhos já estabelecidos na literatura para os iniciadores para kDNA de *Leishmania* spp. (~120 pb), optou-se por desenhar iniciadores para uma região conservada do gene *GAPDH* (~212 pb), capazes de se alinharem ao DNA de hospedeiros mamíferos, domésticos, silvestres e o homem (Anexo 4).

Os genomas representativos de mamíferos para as sequências de *gapdh* (*Homo sapiens* - NM_001289745.1; *Pan troglodytes* - XM_508955.6; *Mus musculus* - NM_001289726.1; *Rattus norvegicus* - NM_017008.4; *Monodelphis domestica* - XM_007503905.1; *Equus caballus* - NM_001163856.1; *Felis catus* - NM_001009307.1; *Bos taurus* - NM_001034034,2; *Myotis lucifugus* - XM_006084148,2); e *Leishmania* spp. (*L. donovani* - 13388249, *L. infantum* - 5073932 e *L. mexicana* - 13448275), assim como genes com as sequências de proteínas glicosomais identificadas em várias espécies de *Leishmania* (*L. major* - 5653844; *L. braziliensis* - 5417820; *L. tarentolae* - DQ092549; *L. panamensis* -22577345; *L. infantum* - KF041811; e *L. lainsoni* - KP197180) foram retirados da base de banco de dados do GenBank e utilizados no formato FASTA para identificar as respectivas regiões de sequencias conservadas (Anexo 5). As sequências foram alinhadas utilizando o software CLC Workbench v.6 (Qiagen, Valencia, CA, EUA). O par de iniciadores para o gene *GAPDH* foi projetado com o software Primer3.

A relação filogenética das sequencias de *gapdh* dos mamíferos e de *Leishmania* spp. foi inferida através de árvores de *Neighbour Joining* (NJ) com 1.000 repetições construídas com base na medida de distância Kimura 80 utilizando o software CLC-Main Workbench 6.9.1. Para inferir a similaridade e minimizar a amplificação inespecífica, os iniciadores foram comparados com as sequencias do gene *gapdh* disponíveis no banco de dados através da ferramenta *BLAST*. Para avaliar a especificidade dos iniciadores desenhados, bem como a possível detecção de dímeros, foi realizada uma análise *in silico*, conduzida pelo software de análise de

iniciadores múltiplos, disponível online no endereço (www.thermoscientific.com/webtools/multipleprimer).

4.6.2 Amostras de DNA controle

Amostras de DNA para controle positivo foram obtidas de fragmentos de baço e fígado de roedores infectados experimentalmente com *L. braziliensis* (Cássia-Pires et al., 2014). Amostras de DNA de *L. tropica* de cultivo (MHOM/AZ/1958/STRAINOD) e *L. tarentolae* (LEXSinduce4 Expression Kit, Jena Bioscience, Jena, Alemanha) também foram utilizadas como controles positivos. Todos os parasitos utilizados nesta etapa do trabalho foram derivados da Coleção de *Leishmania* (CLIOC) e Coleção de Protozoários (COLPROT) do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ. Os controles negativos foram obtidos de fígado e baço de roedores não infectados, enquanto o DNA humano foi obtido de sangue e unha de indivíduo saudável. As amostras de sangue e de unha foram extraídas através de kit QIAamp DNA Mini (Qiagen, Valência, CA, EUA). Os fragmentos de tecidos e as formas promastigotas de *Leishmania* foram extraídos com Kit de Purificação de DNA Genômico Wizard (Promega, Madison, EUA). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante.

4.6.3 Padronização da PCR Multiplex

Todas as etapas da padronização da PCR Multiplex foram realizadas com as amostras de DNA controle. As reações foram preparadas em volume final de 25 µL, incluindo 2 µL DNA controle (~ 100 ng) e submetidas no termociclador *Nexus Thermal Cycler* (Eppendorf™, Hamburgo, Alemanha). A padronização da técnica teve início através de uma PCR *touchdown* para verificar as condições ideais de amplificação a partir dos iniciadores para *GAPDH* (Korbie & Mattick, 2008). Em um segundo momento, foi realizado uma PCR gradiente utilizando os dois conjuntos de iniciadores (kDNA e *GAPDH*), com temperaturas variando entre 57°C a 61°C. A solução de reação foi preparada com tampão de enzima 1X, 0,4 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂1,25 unidades de Taq DNA polimerase Applied Biological Materials Inc, ABM®) e 10 µM de cada par de iniciadores.

Com a temperatura de anelamento determinada em 61°C e as condições de reagentes inalteradas (exceto as concentrações de iniciadores), foram testadas as concentrações ótimas para cada iniciador, variando de 5 a 25 µM. As reações obedeceram a seguinte ciclagem térmica: uma etapa a 95°C por 1 minuto, seguida de 40 ciclos de amplificação a 95°C por 30 segundos, 61°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e uma extensão final a 72°C por um minuto. Estes testes foram também realizados com e sem a adição de 5% de sulfóxido de dimetilo (DMSO).

Com as concentrações ótimas estabelecidas para os iniciadores de kDNA e GAPDH, 15 e 5 µM respectivamente, a eficiência de amplificação foi comparada utilizando as enzimas Taq DNA polimerase (ABM®) e FideliTaq PCR Master Mix (Affymetrix, USB). Em ambos os testes, o número de ciclos foi reduzido de 40 para 30 sem alterar as demais condições pré-definidas. Finalmente, foi comparado o sucesso de amplificação do sistema PCR Multiplex empregando os kits comerciais *PCR pureTaq Beads* (ilustra PuReTaq Ready-To-Go PCR Beads®, GE Healthcare) e o FideliTaq PCR Master Mix (Affymetrix, USB).

4.6.4 Teste de sensibilidade

A sensibilidade da detecção de DNA através da PCR multiplex foi definida utilizando-se uma mistura constante de DNA humano (100 ng) e diferentes concentrações de DNA de *Leishmania tropica* (100, 50, 10, 5, 1 e 0,1 ng). Como controle da especificidade do gene *GAPDH* para mamíferos, foi utilizado o DNA de *L. tarentolae* ajustado para 100 ng.

4.6.5 Reações de PCR Multiplex em mamíferos silvestres

Após a padronização com amostras de DNA controle, sua eficiência e reprodutibilidade foram testadas em amostras de tecidos obtidas de 106 mamíferos silvestres de quatro diferentes ordens. Todas essas amostras haviam sido testadas previamente para o kDNA de *Leishmania* em PCR singleplex (Cássia-Pires et al., 2014 e outros trabalhos ainda não publicados) sendo 51 amostras positivas para este marcador e 55 negativas (Tabela 3).

Tabela 3. Identificação das amostras de mamíferos silvestres utilizadas para validar o sistema de PCR multiplex.

Ordem	Estado	Fragmento de tecido	kDNA singleplex (+)	kDNA singleplex (-)
Chiroptera	Paraíba	Fig (7); Pele (9); Baço (16)	Fig (7); Pele (7); Baço (14)	Pele (2); Baço (2)
	Rio de Janeiro	Baço (2)	Baço (1)	Baço (1)
	Santa Catarina	Baço (2)	0	Baço (2)
Didelphimorphia	Bahia	Baço (1)	Baço (1)	0
	Goiás	Fig (8); Pele (4)	Fig (1)	Fig (7); Pele (4)
	Paraíba	Fig (1); Pele (1); Baço (18)	0	Fig (1); Pele (1); Baço (18)
	Rio de Janeiro	Baço (1)	0	Baço (1)
Lagomorpha	Paraíba	Fig (1); Pele (1)	Fig (1); Pele (1)	0
Rodentia	Bahia	Baço (2)	Baço (2)	0
	Goiás	Fig (6); Pele (8)	Fig (1)	Fig (5); Pele (8)
	Mato Grosso do Sul	Baço (10)	Baço (8)	Baço (2)
	Paraíba	Fig (1)	0	Fig (1)
	Piauí	Baço (7)	Baço (7)	0
TOTAL		n = 106	n = 51	n = 55

Fig = fígado

Os produtos amplificados em todas as etapas deste trabalho, foram visualizados após eletroforese em gel de poliacrilamida 8% submetido a coloração com prata através de kit comercial (DNA Silver Staining, GE Healthcare). As imagens foram documentadas em um Densitômetro Calibrado GS-800TM (Bio-Rad, CA, EUA).

5. RESULTADOS

5.1 Diagnóstico Molecular de *Leishmania* spp. em amostras de baços

Amostras de baços de 138 morcegos foram submetidas a PCR direcionada à região conservada do kDNA de *Leishmania*. Trinta e duas amostras (23,2% - 32/138) foram consideradas positivas após a visualização da banda de interesse com aproximadamente 120 pb. Entre os animais positivos, foi observada uma diversidade de 11 espécies distintas capturadas em todas as localidades amostradas (Figura 4).

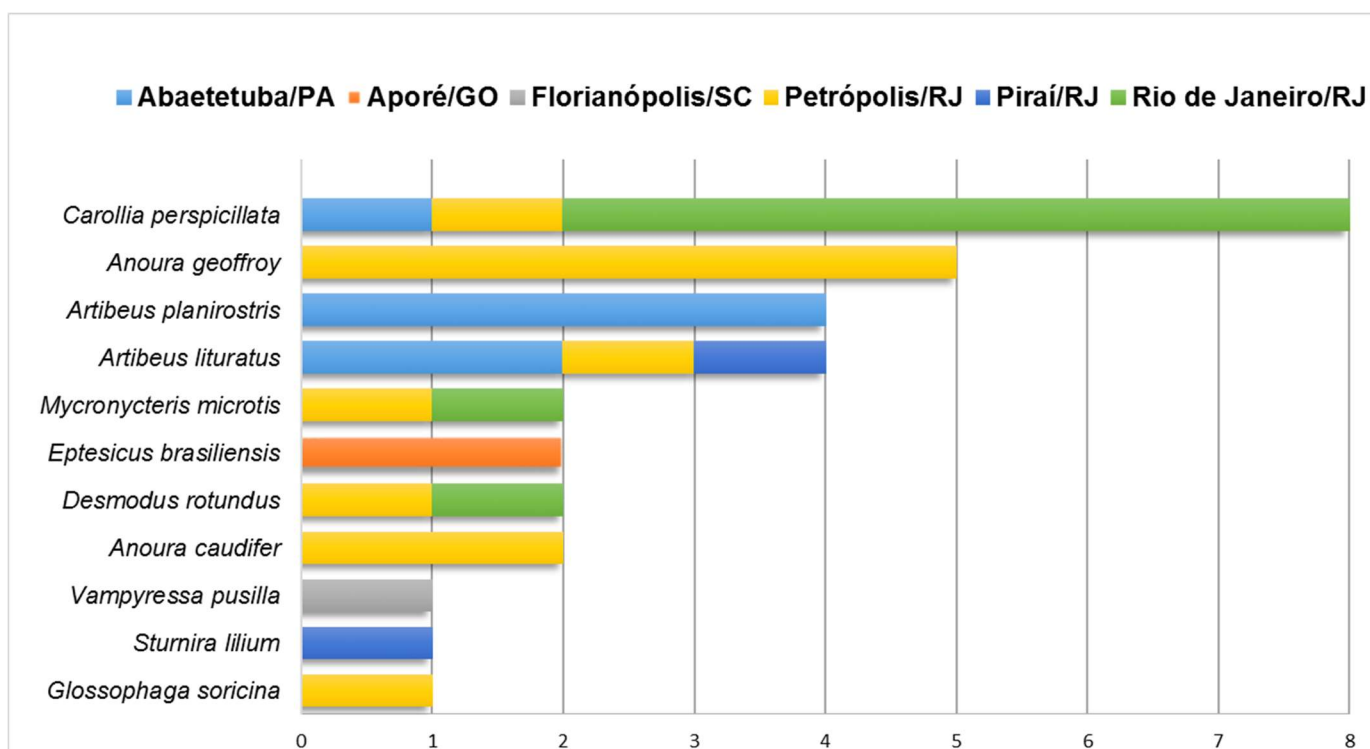


Figura 4. Espécies de morcegos positivas para o kDNA de *Leishmania* spp., capturados em seis localidades brasileiras.

Dessas 32 amostras kDNA positivas, 12 foram testadas para o marcador HSP70(234) com detecção da banda de interesse em nove amostras (75%), após a reamplificação da PCR. Amostras de oito animais foram submetidas ao sequenciamento, entretanto não geraram sequências consenso de qualidade e passíveis de serem identificadas. Entre essas oito amostras, três delas foram submetidas ao processo de clonagem gênica, com formação de colônias

recombinantes em todas. Foram selecionados três clones de cada amostra (total de 9 clones), mas nenhuma amostra foi passível de ser identificada. Outras três amostras previamente positivas pelo marcador HSP70(234) também foram submetidas a ensaios de PCR para os marcadores ITS1, V7V8 e 18S SSU, mas sem sucesso de amplificação para nenhuma amostra em todos iniciadores testados (Tabela 4).

Tabela 4. Amostras kDNA positivas (Baçoteka) submetidas ao processo de caracterização de espécies

CÓDIGO/ AMOSTRA	ESPÉCIE	PCR PARA HSP70(234)	SEQUENCIAMENTO HSP70(234)	CLONAGEM	PCR (OUTROS) *
EM 388	<i>Vampyressa pusilla</i>	Positiva	R	R	NR
RM 448	<i>Desmodus rotundus</i>	Positiva	R	NR	NR
LBCE 13158	<i>Anoura geoffroy</i>	Positiva	R	R	NR
LBCE 13167	<i>A. geoffroy</i>	Positiva	R	R	NR
LBCE 14745	<i>A. caudifer</i>	Positiva	NR	NR	NR
LBCE 11601	<i>Artibeus lituratus</i>	Positiva	R	NR	NR
LBCE 11838	<i>A. lituratus</i>	Positiva	R	NR	R
LBCE 11827	<i>A. planirostris</i>	Positiva	R	NR	R
LBCE 11835	<i>A. planirostris</i>	Negativa	-	-	-
LBCE 11854	<i>A. planirostris</i>	Positiva	R	NR	R
LBCE 11883	<i>A. planirostris</i>	Negativa	-	-	-
LBCE 13169	<i>Micronycteris microtis</i>	Negativa	-	-	-
	n = 12	n (neg) = 3	n (NR) = 1	n (NR) = 5	n (NR) = 6
		n (pos) = 9	n (R) = 8	n (R) = 3	n (R) = 3

* PCR direcionada aos marcadores ITS1, V7V8 e 18S SSU

R – Procedimento Realizado

NR – Procedimento Não Realizado

5.2 Rebio Guaribas

5.2.1 Quiropterofauna

O total de espécies capturadas, após as duas expedições realizadas no segundo trimestre dos anos 2014 e 2015, foi de (n=354) indivíduos com riqueza (S) de 14 espécies (Figura 5).

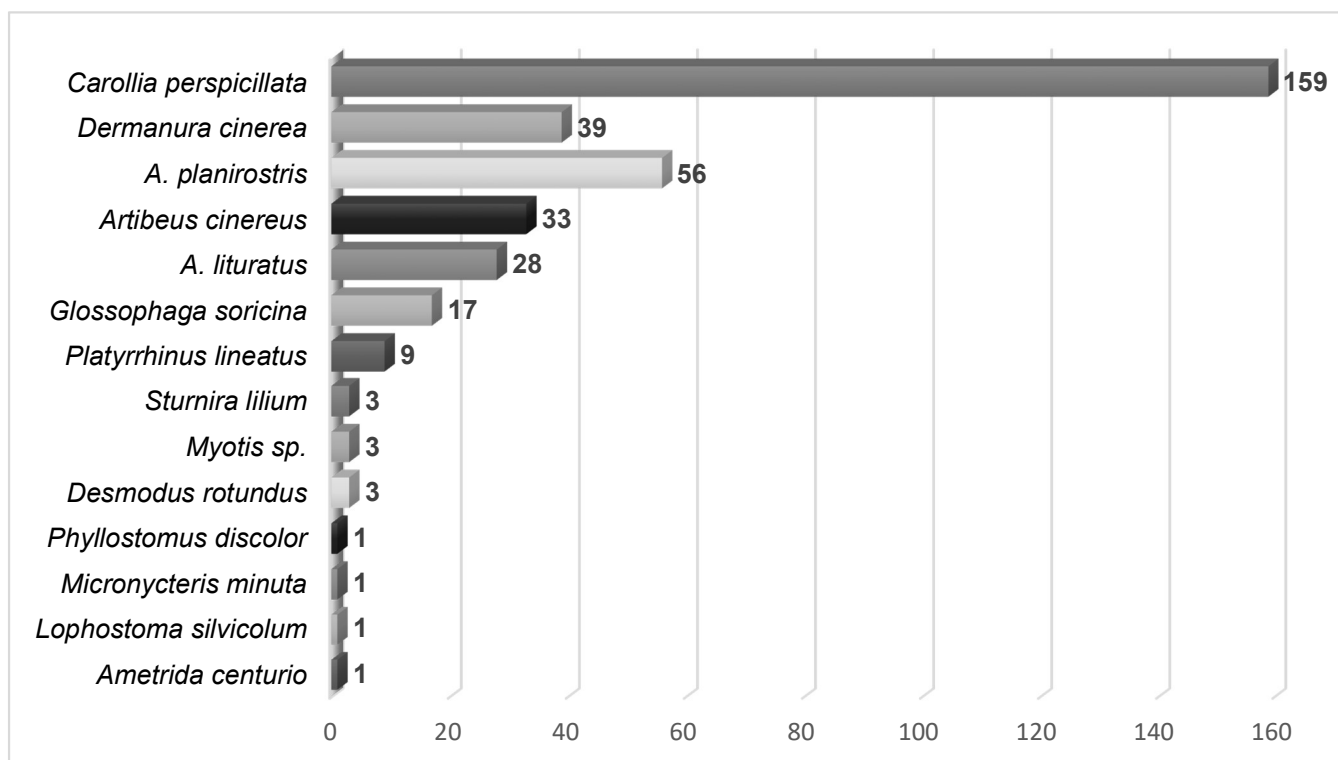


Figura 5. Riqueza de espécies de morcegos capturados na Rebio Guaribas, Mamanguape/PB.

Do total de 354 indivíduos (181 fêmeas e 173 machos), amostras de 183 animais foram selecionadas para a análise e coleta de material biológico. Entre estes animais, 85 foram capturados em 2014, sendo 49 fêmeas e 36 machos; e 98 capturados em 2015, com 30 fêmeas e 68 machos (Tabela 5).

Tabela 5. Proporção entre fêmeas e machos de indivíduos capturados, analisados e liberados na Rebio Guaribas.

Indivíduos capturados	Indivíduos analisados		Indivíduos liberados (Fêmeas/Machos)
	2014 (Fêmeas/Machos)	2015 (Fêmeas/Machos)	
<i>Ametrida centurio</i> (0/1)	0/1	0/0	0/0
<i>Artibeus cinereus</i> (21/12)	15/6	0/0	6/6
<i>A. lituratus</i> (14/14)	4/2	5/12	5/0
<i>A. planirostris</i> (20/36)	10/9	3/19	7/8
<i>Carollia perspicillata</i> (86/73)	10/14	4/17	72/42
<i>Dermanura cinerea</i> (13/26)	0/0	4/15	9/11
<i>Desmodus rotundus</i> (1/2)	0/1	1/1	0/0
<i>Glossophaga soricina</i> (11/6)	2/2	8/3	1/1
<i>Lophostoma silvicolum</i> (1/0)	1/0	0/0	0/0
<i>Micronycteris minuta</i> (1/0)	1/0	0/0	0/0
<i>Myotis</i> sp. (2/1)	0/0	2/1	0/0
<i>Phyllostomus discolor</i> (1/0)	1/0	0/0	0/0
<i>Platyrrhinus lineatus</i> (7/2)	2/1	3/0	2/1
<i>Sturnira lilium</i> (3/0)	3/0	0/0	0/0
	n = 85 (49/36)	n = 98 (30/68)	102/69
N = 354 (181/173)	n (analisados) = 183		n (liberados) = 171

Com exceção de três indivíduos do gênero *Myotis*, capturados em 2015 e pertencentes à família Vespertilionidae, todos os demais morcegos capturados pertencem a uma mesma família: Phyllostomidae. Embora o total de espécies, entre os animais analisados, tenha sido superior em 2015 (n=98), a riqueza de espécies (S=8) foi menor quando comparado ao ano anterior de coleta, 2014, (n=85; S=12), (Figura 6).

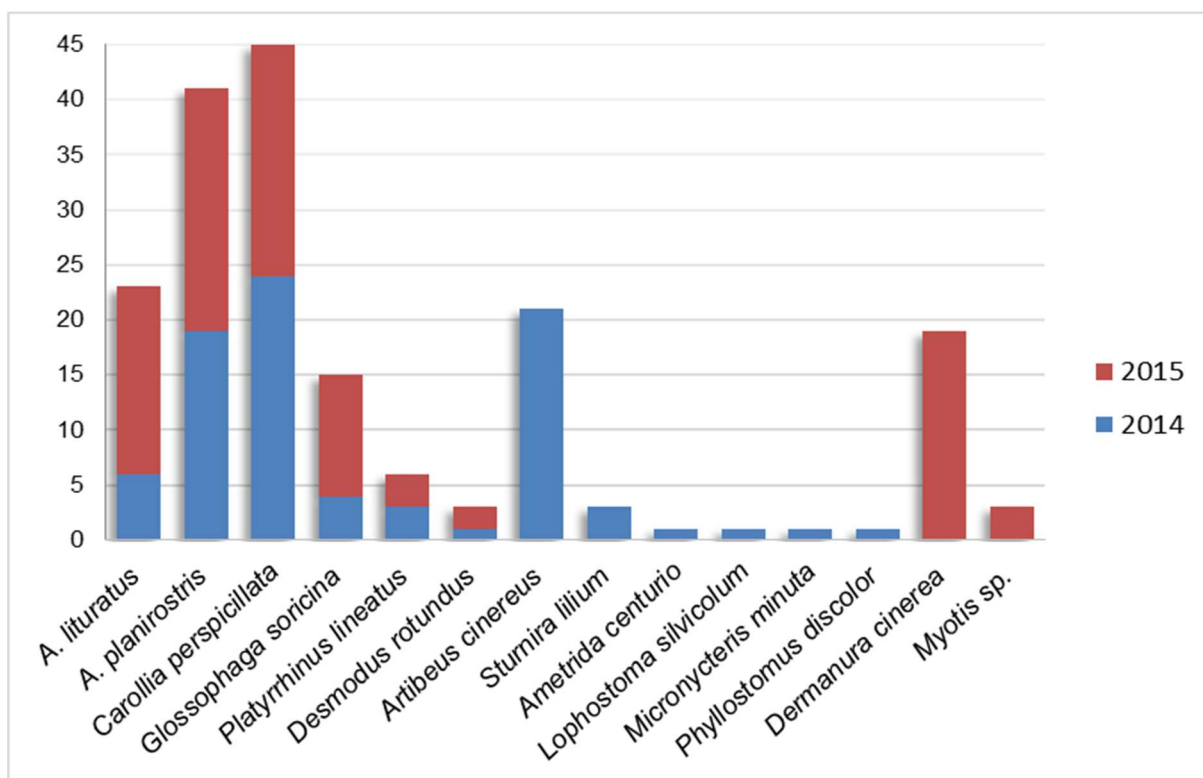


Figura 6. Total de morcegos e riqueza de espécies capturadas nas expedições de 2014 e 2015 na Reserva Biológica Guaribas.

O gênero *Artibeus* foi o mais abundante entre os dois anos de coleta, com 46 indivíduos em 2014, das seguintes espécies: *A. cinereus* (n=21); *A. planirostris* (n=19); *A. lituratus* (n=6), e 39 indivíduos capturados em 2015, das espécies *A. planirostris* (n=22) e *A. lituratus* (n=17). A espécie *C. perspicillata* foi capturada nos dois anos de coleta, sendo a mais abundante em 2014 (24/85 – 28,2%), seguida de *A. cinereus* (21/85 – 24,7%) e *A. planirostris* (19/85 – 22,3%). Em 2015, além de *C. perspicillata* (21/98 – 21,5%), as demais espécies mais frequentes foram *A. planirostris* (22/98 – 22,5%), *D. cinerea* (19/98 – 19,4%) e *G. soricina* (11/98 – 11,2%). A única espécie hematófaga capturada foi *D. rotundus*, sem variação de abundância entre os dois anos de coleta: (n=1; 2014) e (n=2; 2015). Algumas espécies foram capturadas somente em um determinado ano: *A. cinereus*, *Lophostoma silvicolum*, *Micronycteris minuta*, *Phyllostomus discolor* e *Sturnira lillium* foram capturadas somente na expedição de 2014, enquanto que *D. cinerea* e *Myotis sp.* foram capturados apenas na expedição de 2015. Além das espécies já mencionadas, em 2014, foi capturado pela primeira vez no bioma Mata Atlântica, a espécie *Ametrida centurio* (Vilar et al., 2015).

5.2.2 Diagnóstico Parasitológico e Molecular

Embora nenhum parasito tenha sido observado no exame à fresco, quatro amostras (04/183 – 2,2%) foram positivas para tripanosomatídeos sanguíneos, durante o acompanhamento das hemoculturas realizadas no Laboratório, após o fim de cada expedição. Essas quatro amostras amplificaram para os ensaios de PCR direcionados aos iniciadores 18S Nested PCR e gGAPDH e foram sequenciadas para estes mesmos marcadores (Tabela 6). Em relação às culturas realizadas com fragmentos de pele, baço e fígado dos morcegos, nenhuma amostra, dentre as 549 analisadas, foi positiva.

Tabela 6. Identificação por sequenciamento gênico de hemoflagelados isolados na Rebio Guaribas.

Código Id	Local/Ano	Espécie	Caracterização	Identificação por sequenciamento (% Identidade)*
EM 38	Cabeça de Boi/2014	<i>Artibeus planirostris</i>	18S <i>Nested</i> PCR	<i>T. cruzi</i> I (100%)
			gGAPDH	<i>T. cruzi</i> I (100%)
EM 74	Poste de Cimento/2014	<i>Phyllostomus discolor</i>	18S <i>Nested</i> PCR	<i>T. cruzi</i> I (100%)
			gGAPDH	<i>T. cruzi</i> I (100%)
EM 84	Poste de Cimento/2014	<i>Micronycteris minuta</i>	18S <i>Nested</i> PCR	<i>T. marinkellei</i> (100%)
			gGAPDH	<i>T. marinkellei</i> (100%)
EM 703	Unhão/2015	<i>Carollia per piscillata</i>	18S <i>Nested</i> PCR	<i>T. dionisii</i> (99%)
			gGAPDH	<i>T. dionisii</i> (99%)

*Valores de E-value = 0 e cobertura de 100%

5.2.3 Análise molecular da infecção por *Leishmania* spp.

Amostras de 69 morcegos (37,7% - 69/183) foram consideradas positivas, com visualização de uma banda de tamanho aproximado de 120 pb quando testadas frente a infecção por *Leishmania* spp. através da detecção por PCR kDNA (Figura 7).

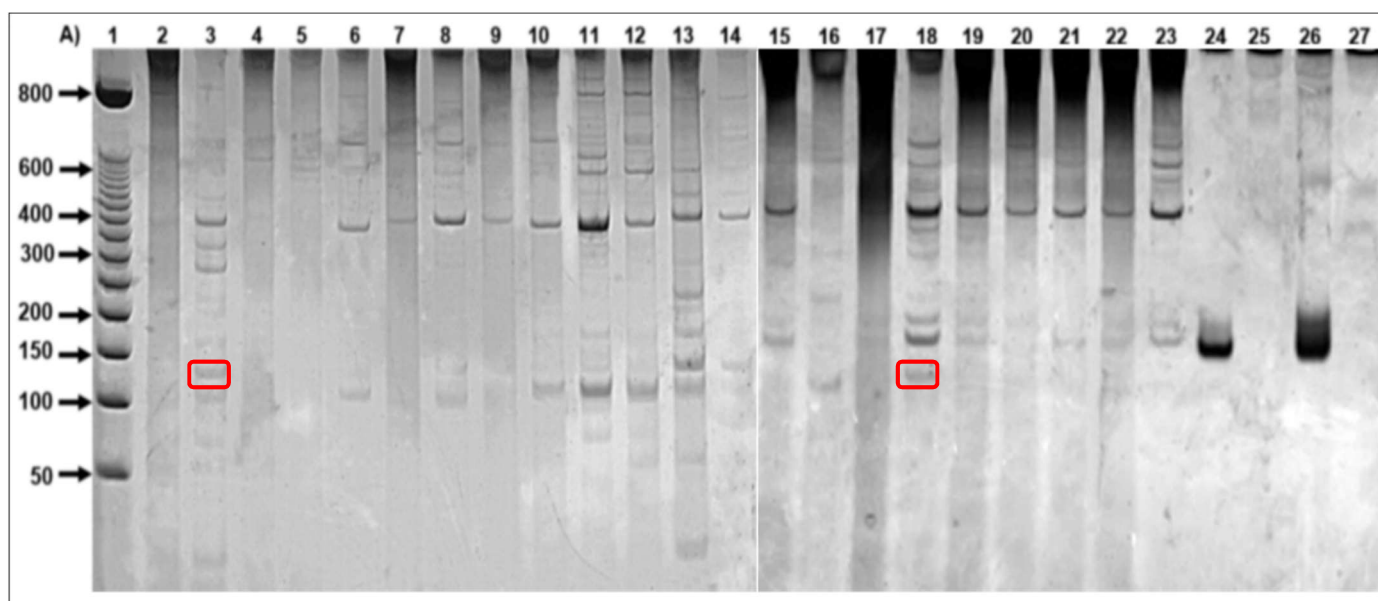


Figura 7. Esquema ilustrativo de gel de poliacrilamida 8% corado por prata para amostras de morcegos analisadas com os iniciadores direcionados ao kDNA de *Leishmania* spp. 1. Peso Molecular (50pb), 2-23*. Amostras de morcegos silvestres testados para o marcador kDNA, 24. Roedor experimentalmente infectado com *Leishmania* spp., 25. Controle negativo da extração, 26. DNA de *L. tropica* (promastigota), 27. Controle negativo da PCR. *Amostras positivas, marcadas em vermelho, com ~120pb: 3, 18*; >120 pb (~150 pb): 13*, 14, 18*, 19, 21, 22, 23, 24, 26; <120pb (~100 pb): 6, 8, 10, 11, 12, 13*, 16. Amostras negativas: 2, 4, 5, 7, 9, 15, 17, 20. (*) Amostras 13 e 18 se enquadraram em mais de um perfil de amplificação.

Entre esses indivíduos, 24 animais perante os 85 analisados (28,2%), pertencentes a quatro espécies, foram considerados positivos em 2014. Em 2015, 45 animais entre 98 analisados (45,9%), pertencentes a sete diferentes espécies foram consideradas positivos frente a infecção por *Leishmania* spp. (Figura 8).

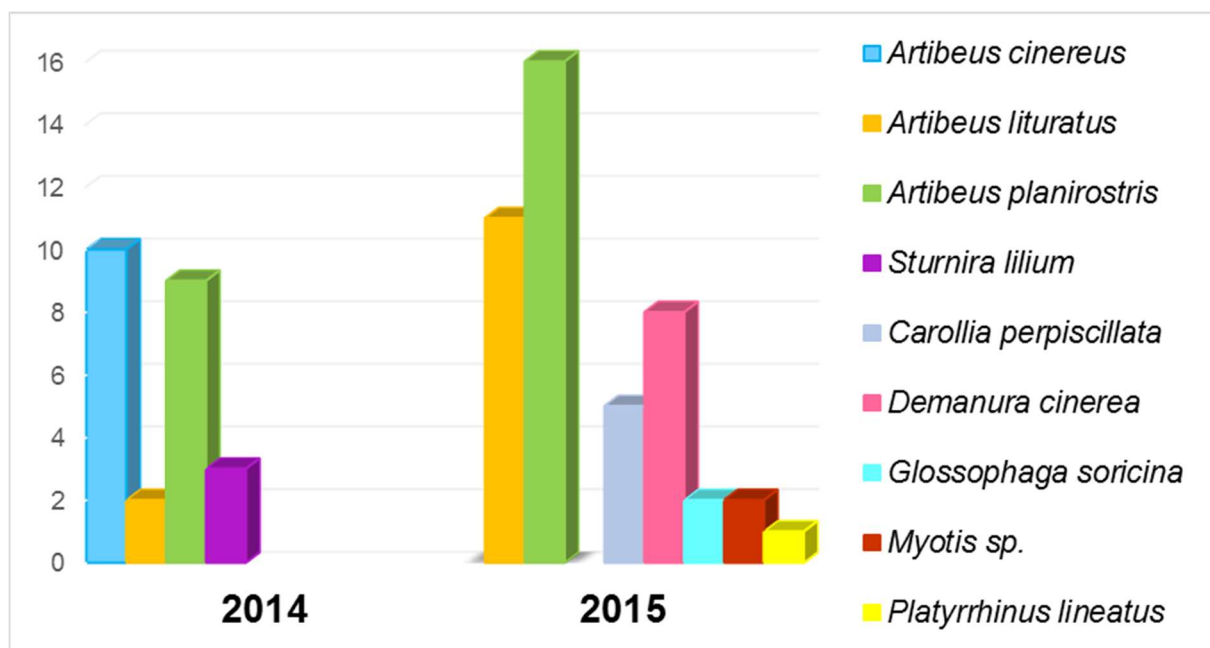


Figura 8. Riqueza de espécies capturadas na Rebio Guaribas positivas para o kDNA de *Leishmania* spp.

Entre os 69 animais positivos, amostras de 23 indivíduos (23/69 – 33,3%) foram positivas em mais de um tecido: (i) dois animais (2/69 – 2,9%) foram positivos na pele e no baço; (ii) oito foram positivos na pele e no fígado (8/69 -11,6%); (iii) dez foram positivos em baço e fígado (10/69 – 14,5%); e (iv) três animais (3/69 – 4,3%) foram positivos para todos os tecidos analisados (Tabela 7). Foi observado maior índice de tecidos positivos nos fragmentos de baço (38/183 – 20,8%), seguidos de fragmentos de fígado (33/183 – 18,0%) e fragmentos de pele (24/183 – 13,1%).

Tabela 7. Amostras positivas para o kDNA de *Leishmania* de acordo com o tecido infectado.

Espécie	Pele	Baço	Fígado	Pele/Baço	Pele/Fígado	Baço/Fígado	Todos os tecidos
<i>Artibeus cinereus</i>	0	11	0	0	0	0	0
<i>Artibeus lituratus</i>	8	6	9	1	5	3	1
<i>Artibeus planirostris</i>	5	14	15	1	1	3	2
<i>Carollia perpscillata</i>	4	1	1	0	1	0	0
<i>Demanura cinerea</i>	3	5	4	0	0	4	0
<i>Glossophaga soricina</i>	1	1	0	0	0	0	0
<i>Myotis sp.</i>	2	0	1	0	1	0	0
<i>Platyrrhinus lineatus</i>	1	0	0	0	0	0	0
<i>Sturnira lilium</i>	0	0	3	0	0	0	0
	n=24	n=38	n=33	n=2	n=8	n=10	n=3

De 69 indivíduos positivos para o kDNA de *Leishmania* spp., amostras de 51 indivíduos foram submetidas a ensaios de PCR direcionados para o marcador HSP70(234), sendo confirmada a positividade frente a este marcador em 40 (78,4%) amostras (Figura 9). Dentre as amostras da figura 9A, estão incluídos os indivíduos EM 44 (*A. planirostris*) e EM 48 (*A. (D). cinerea*) nos poços 5 e 8, os mesmos positivos para o kDNA de *Leishmania*, visualizados na figura 7, poços 3 e 18, respectivamente.

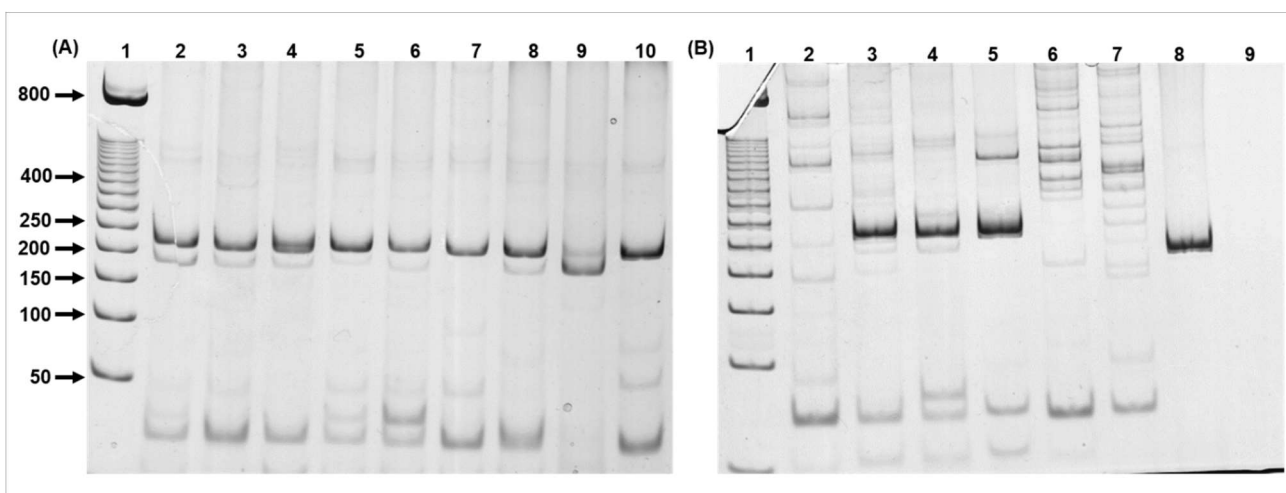


Figura 9. Gel de poliacrilamida 8% corado com prata obtido a partir da reamplificação da PCR direcionada ao iniciador HSP70(234). (A) 1. Peso Molecular (50 pb), 2-10 Amostras de morcegos previamente positivas para o iniciador kDNA e que geraram o produto esperado de 234 pb para o alvo HSP70. (B) 1. Peso Molecular (50 pb), 2. Amostra de *S. liliium* (EM 150) positiva no marcador kDNA e considerada negativa para HSP70(234), 3-5 Amostras de morcegos previamente positivas para o kDNA, 6-7 Amostras de *A. planirostris* e *A. lituratus* (EM 718, 719) positivas no marcador kDNA e negativas para HSP70(234), 8. Roedor experimentalmente infectado, 9. Controle negativo da PCR com todos os reagentes utilizados na reação com excessão do DNA.

Todas essas amostras foram purificadas e 29 foram (29/40) submetidas ao sequenciamento, porém nenhuma das sequências geradas obteve qualidade suficiente para serem analisadas (Figura 10, A e B). Entre essas 29 amostras enviadas para o sequenciamento, 24 foram selecionadas e submetidas à clonagem gênica com formação de colônias recombinantes em todas. Foram selecionados três clones de cada amostra, gerando 72 reações de sequenciamento, entretanto, não foi possível realizar a análise das sequências dos insertos de hsp70(234), mesmo tendo sido observada a sequência dos plasmídeos das amostras clonadas (Figura 10, C e D).

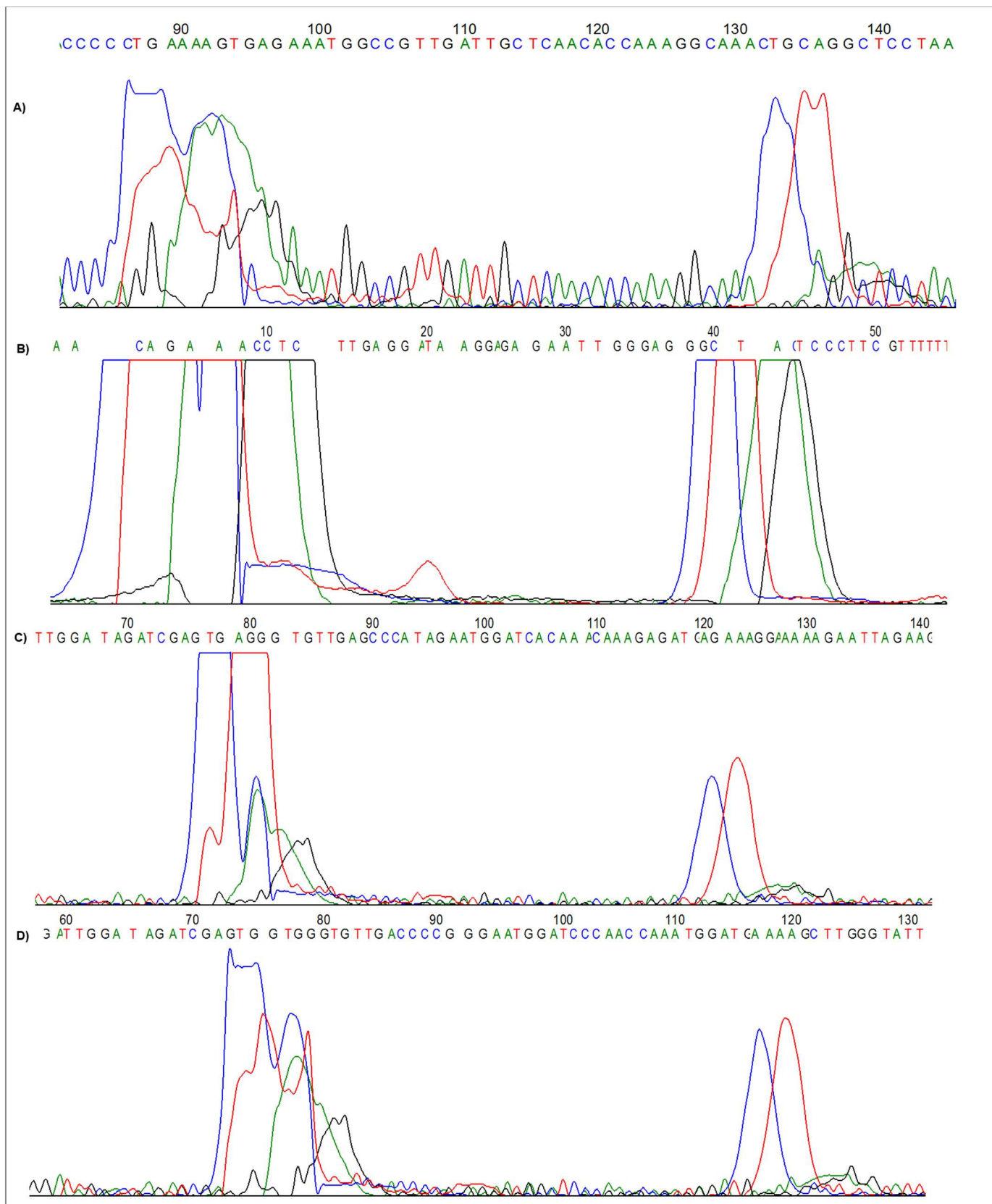


Figura 10. Eletroferogramas obtidos a partir do sequenciamento do gene hsp70(234) em amostras de morcegos kDNA positivas. Em (A) e (B), amostras sequenciadas diretamente de produtos amplificados, tendo em (B) ocorrido purificação decorrente da excisão de bandas em gel de agarose. Em (C) e (D), amostras sequenciadas após o processo de clonagem gênica.

Amostras de 17 indivíduos, dentre os 40 positivos para o marcador HSP70(234) foram submetidas aos marcadores ITS1, V7V8 e 18S SSU, mas sem sucesso de amplificação para nenhuma amostra em todos os três iniciadores testados (Tabela 8). Essas mesmas amostras também foram submetidas ao sequenciamento direto para o marcador kDNA de *Leishmania* sp., mas as seqüências obtidas não foram possíveis de serem identificadas (dados não mostrados).

Tabela 8. Amostras kDNA positivas (Rebio) submetidas ao processo de caracterização de espécies.

Amostra/Tecido	Espécie	PCR para HSP70(234)	Sequenciamento HSP70(234)	Clonagem	PCR (outros)*
EM 38/Baço	<i>Artibeus planirostris</i>	Positiva	R	R	R
EM 40/Baço	<i>A. planirostris</i>	Positiva	R	R	NR
EM 41/Baço	<i>A. planirostris</i>	Positiva	R	R	NR
EM 43/Baço	<i>A. planirostris</i>	Positiva	R	R	NR
EM 44/Baço	<i>A. planirostris</i>	Positiva	R	R	NR
EM 45/Baço	<i>A. planirostris</i>	Positiva	R	R	NR
EM 46/Baço	<i>A. planirostris</i>	Positiva	R	R	NR
EM 47/Baço	<i>A. (Dermanura) cinereus</i>	Positiva	R	R	NR
EM 48/Baço	<i>A. (D) cinereus</i>	Positiva	R	R	NR
EM 51/Baço	<i>A. planirostris</i>	Positiva	R	R	R
EM 52/Baço	<i>A. (D) cinereus</i>	Positiva	R	R	R
EM 56/Baço	<i>A. (D) cinereus</i>	Positiva	R	R	R
EM 59/Baço	<i>A. planirostris</i>	Positiva	R	R	R
EM 60/Baço	<i>A. lituratus</i>	Positiva	R	R	R
EM 61/Baço	<i>A. (D) cinereus</i>	Positiva	R	R	R
Em 71/Fígado	<i>Carollia perspicillata</i>	Negativa	-	-	-
EM 83/Fígado	<i>C. perspicillata</i>	Negativa	-	-	-
EM 84/Fígado	<i>Micronycteris minuta</i>	Negativa	-	-	-
EM 89/Fígado	<i>A. (D) cinereus</i>	Negativa	-	-	-
EM 122/Baço	<i>Platyrrhinus lineatus</i>	Positiva	R	R	R
EM 127/Baço	<i>A. (D) cinereus</i>	Positiva	R	R	NR
EM 128/Baço	<i>A. (D) cinereus</i>	Positiva	R	R	NR
EM 131/Baço	<i>A. (D) cinereus</i>	Positiva	R	R	R
EM 133/Pele	<i>Sturnira lilium</i>	Positiva	R	R	NR
EM 134/Baço	<i>A. (D) cinereus</i>	Positiva	R	R	NR
EM 137/Baço	<i>A. (Dermanura) cinereus</i>	Positiva	NR	NR	NR
EM 138/Baço	<i>A. (D) cinereus</i>	Positiva	R	R	R
EM 150/Pele	<i>Sturnira lilium</i>	Negativa	-	-	-
EM 152/Baço	<i>A. lituratus</i>	Positiva	R	R	NR

Tabela 8. (Continuação). Amostras kDNA positivas (Rebio) submetidas ao processo de caracterização de espécies.

Amostra/Tecido	Espécie	PCR para HSP70 (234)	Sequenciamento HSP70 (234)	Clonagem	PCR (outros)*
EM 154/Fígado	<i>Sturnira lilium</i>	Positiva	R	R	NR
EM 693/Fígado	<i>C. perspicillata</i>	Negativa	-	-	-
EM 718/Baço	<i>A. planirostris</i>	Negativa	-	-	-
EM 719/Pele	<i>A. lituratus</i>	Negativa	-	-	-
EM 720/Pele	<i>Myotis sp.</i>	Positiva	NR	NR	NR
EM 722/Baço	<i>C. perspicillata</i>	Positiva	R	NR	R
EM 726/Baço	<i>A. planirostris</i>	Negativa	-	-	-
EM 727/Pele	<i>Glossophaga soricina</i>	Positiva	NR	NR	R
EM 729/Pele	<i>A. lituratus</i>	Positiva	NR	NR	NR
EM 732/Pele	<i>C. perspicillata</i>	Positiva	NR	NR	R
EM 734/Baço	<i>A. (D) cinereus</i>	Positiva	R	NR	R
EM 741/Baço	<i>A. (D) cinereus</i>	Positiva	R	NR	R
EM 744/Baço	<i>A. lituratus</i>	Positiva	NR	NR	NR
EM 746/Baço	<i>A. (D) cinereus</i>	Positiva	NR	NR	NR
EM 747/Baço	<i>A. (D) cinereus</i>	Positiva	NR	NR	NR
EM 748/Baço	<i>A. lituratus</i>	Positiva	NR	NR	NR
EM 749/Baço	<i>A. lituratus</i>	Positiva	NR	NR	NR
EM 750/Baço	<i>A. lituratus</i>	Positiva	R	NR	R
EM 761/Pele	<i>A. (D) cinereus</i>	Negativa	-	-	-
EM 767/Pele	<i>P. lineatus</i>	Negativa	-	-	-
EM 770/Baço	<i>A. lituratus</i>	Positiva	R	NR	R
EM 775/Baço	<i>A. planirostris</i>	Positiva	NR	NR	NR
n = 51		n (neg) = 11	n (NR) = 11	n (NR) = 16	n (NR) = 23
		n (pos) = 40	n (R) = 29	n (R) = 24	n (sim) = 17

*** PCR realizado para os marcadores ITS1, V7V8, 18S SSU e kDNA**

R – Procedimento Realizado

NR – Procedimento não realizado

5.3 Estabelecimento da PCR Multiplex contendo um alvo para *Leishmania* spp. (kDNA) e um alvo para hospedeiros mamíferos (GAPDH)

O alinhamento da região catalítica do gene *GAPDH* (212 pb), utilizada para o desenho dos iniciadores neste estudo, mostrou uma conservação entre 122 (57%) nucleotídeos no painel de todas as espécies avaliadas, enquanto 167 (79%) nucleotídeos se mostraram conservados entre as diferentes espécies de mamíferos (barra com variação de altura – Figura 11A). Embora 57% dos nucleotídeos tenham apresentado conservação entre as diferentes espécies analisadas, a sequência alvo para o gene *GAPDH* foi capaz de divergir as espécies de *Leishmania* e hospedeiros mamíferos em dois ramos claramente separados na árvore filogenética (Figura 11B).

A análise *in silico* revelou identidade acima de 90% entre os iniciadores de *gapdh* e as sequências representativas deste gene para as amostras analisadas (Anexo 5). A reduzida capacidade de hibridização desses iniciadores com amostras de *Leishmania* spp. foi sugerida através da comparação dos resultados de cobertura (*coverage*), *total score* e *e-value* utilizados para as sequências de *gapdh* nos hospedeiros mamíferos e em *Leishmania* spp. (Anexo 5). Foi observado *in silico*, o potencial de associação de ambos os alvos (*gapdh* e kDNA) em um ensaio de PCR Multiplex, visto que nenhuma especificidade foi perdida durante o alinhamento dos dois pares de iniciadores com suas sequências correspondentes, além da ausência da formação de dímeros entre eles. Com a análise *in silico* concluída para os iniciadores direcionados ao *gapdh*, iniciou-se os testes para a padronização da reação do sistema de PCR Multiplex.

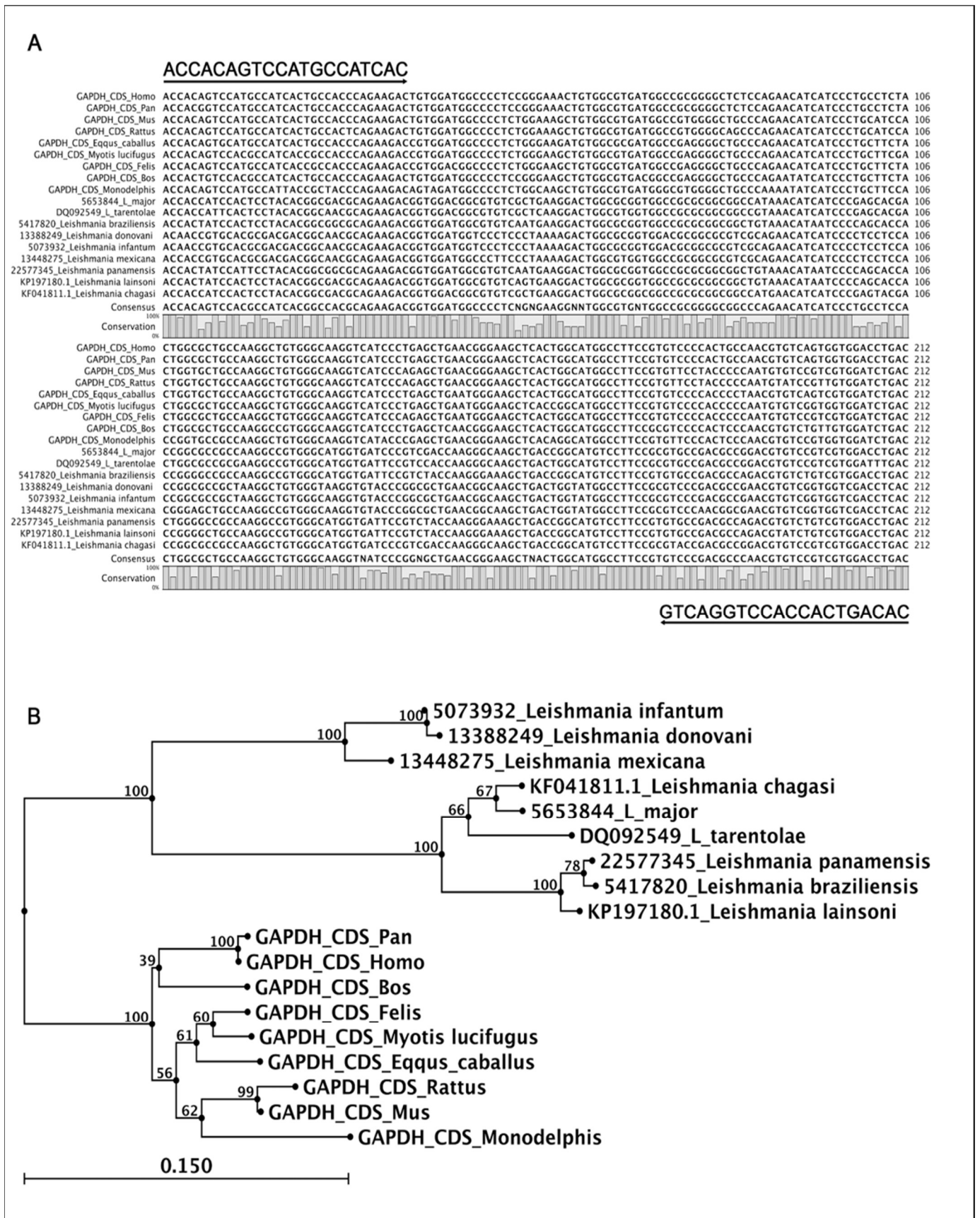


Figura 11. Alinhamento e árvore filogenética das sequências de gapdh entre espécies de *Leishmania* e mamíferos. (A) Alinhamento múltiplo das sequências do fragmento de 212 pb das espécies de *Leishmania* e hospedeiros mamíferos. (B). Árvore filogenética da sequência de 212 pb de *Leishmania* spp. e mamíferos baseada no método *Neighbor Joining*. Setas: Localização e orientação de cada iniciador no alinhamento; barra de altura: Conservação dos nucleotídeos; Consensus: Sequência gerada com os nucleotídeos mais conservados entre as sequências alinhadas. A árvore foi construída com 1000 replicatas e baseada no método Kimura com distância de 80 usando o software CLC Main Worbench (6.9.1).

A temperatura de anelamento foi o primeiro aspecto da padronização da técnica, cujos resultados, mostraram que a temperatura de 61°C foi a mais eficaz para o anelamento de ambos os pares de iniciadores com suas respectivas sequências. Entretanto, as condições estabelecidas através da PCR *Touchdown*, com 40 ciclos e temperatura de 61°C, resultaram na amplificação de algumas bandas inespecíficas (400 pb). A redução de 10 repetições nas condições de ciclagem, de 40 para 30 ciclos, além da adição de DMSO 5%, foi capaz de eliminar praticamente todas as amplificações inespecíficas.

Após testar diferentes concentrações de cada par de iniciador, as condições ótimas para a amplificação de ambos os alvos foram determinadas em 5 e 15 µM para o kDNA e GAPDH, respectivamente. As reações obtiveram sucesso com as duas enzimas Taq polimerases empregadas, de fabricantes distintos. Entretanto, com o uso da enzima Taq DNA polimerase (ABM®), foi observado a amplificação de fragmentos inespecíficos de DNA que não foram identificados durante a utilização do kit comercial FidelityTaq PCR Master Mix (Affymetrix, USB) (Figura 12).

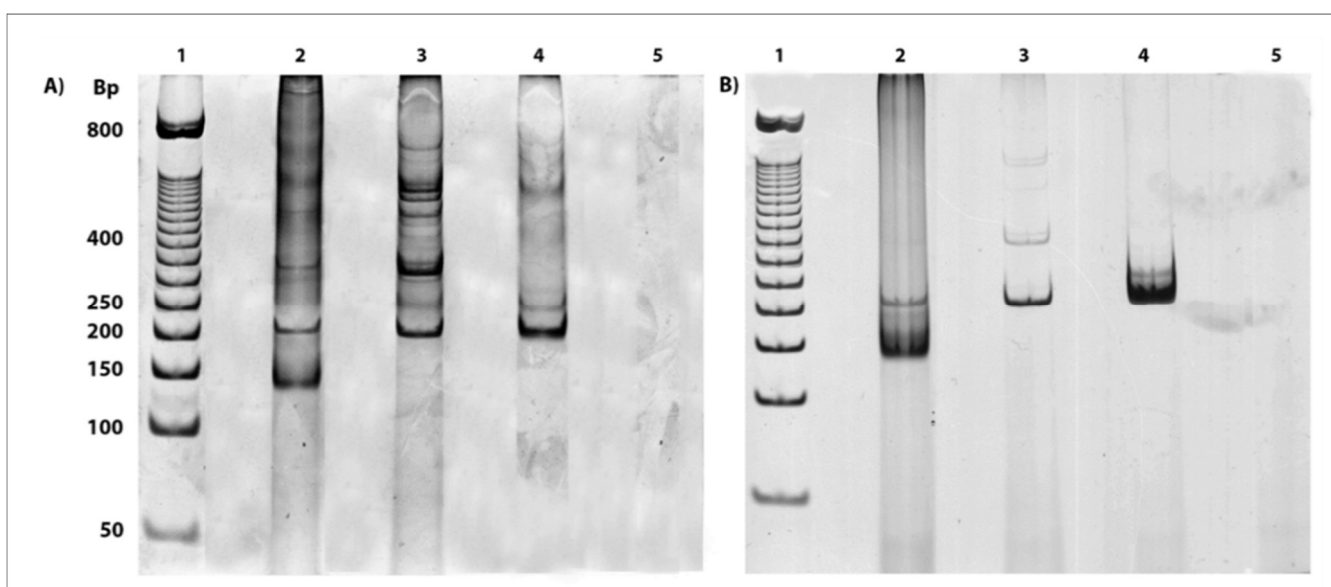


Figura 12. Gel de poliacrilamida 8% corado com prata obtido a partir da amplificação no sistema de PCR Multiplex dos marcadores GAPDH e kDNA. (A) Produtos amplificados usando a enzima Taq DNA polimerase (ABM®) na presença de DMSO 5%. (B) Produtos amplificados usando a enzima FidelityTaq Master Mix (Affymetrix, USB). Em ambas as figuras, 1. Peso Molecular (50 pb), 2. Roedor experimentalmente infectado, 3. Roedor não infectado, 4. DNA humano não infectado, 5. Controle negativo da PCR com todos os reagentes e sem adição de DNA.

A partir do estabelecimento das condições de ciclagem térmica: desnaturação inicial à 95°C por um minuto, seguida por 30 ciclos a 95°C por 30 segundos, pareamento dos iniciadores à 61°C por 30 segundos, extensão à 72°C por 30 segundos e extensão final 72°C por 1 minuto, as reações de PCR multiplex foram ensaiadas com o kit comercial *PCR pureTaq Beads* (ilustra PuReTaq Ready-To-Go PCR Beads®, GE Healthcare) e as amostras controles apresentaram resultados semelhantes aos observados com a FidelityTaq PCR Master Mix (Affymetrix, USB). O teste de sensibilidade foi capaz de detectar até 0,1 ng de DNA de *L. tropica* diluído em 100 ng de DNA de mamífero. As amostras de humano amplificaram apenas para os iniciadores *gapdh*, enquanto as de *Leishmania* (*L. tropica* e *L. tarentolae*) amplificaram apenas para o kDNA (Figura 13).

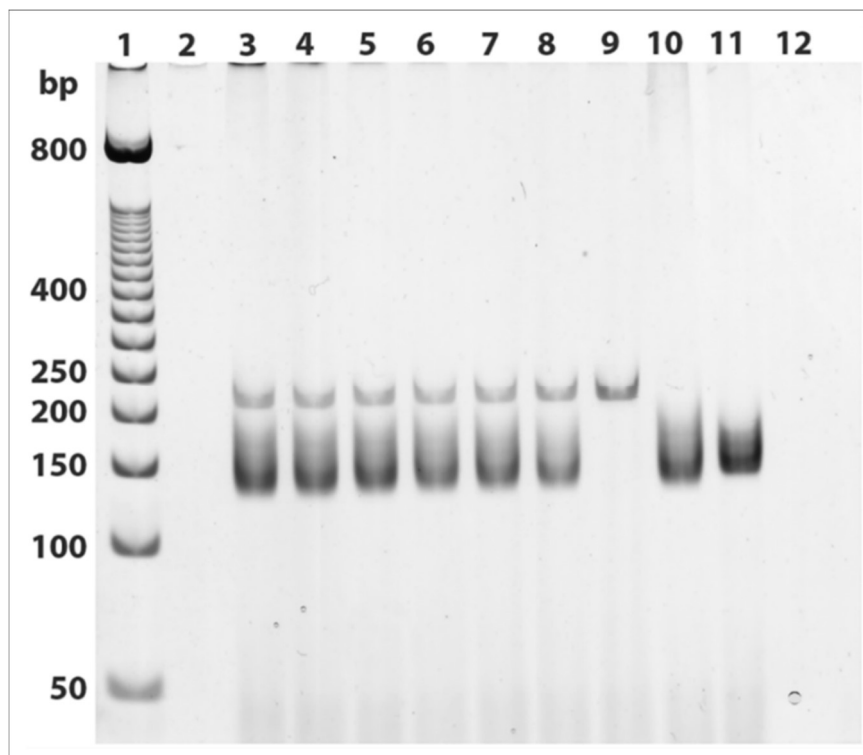


Figura 13. Gel de poliacrilamida 8% corado com prata indicando os resultados do teste de sensibilidade para detecção do DNA de *Leishmania* spp. em uma mistura constante de 100 ng de DNA humano variando as concentrações de DNA de *Leishmania*. 1. Peso Molecular (50 pb), 2. Vazio, 3–8. Mistura de DNA humano e 100 (3), 50 (4), 10 (5), 5 (6), 1 (7) e 0,1 ng (8) de DNA de *L. tropica*; 9. Roedor não infectado, 10. DNA de *Leishmania tropica* (~ 100 ng), 11. DNA de *Leishmania tarentolae* (~ 100 ng), 12. Controle negativo da PCR com todos os reagentes e sem adição de DNA.

Com a escolha das beads (*PCR pureTaq Beads* (ilustra PuReTaq Ready-To-Go PCR Beads®, GE Healthcare) como método padrão e as condições de ciclagem estabelecidas em: 95°C durante 1 min seguido por 30 ciclos de 95°C durante 30s, 61°C durante 30s, e 72°C durante 30s, e uma extensão final a 72°C durante 1 min, amostras de 106 mamíferos silvestres foram submetidas ao diagnóstico através do sistema de PCR Multiplex. Entre as 51 amostras de animais silvestres previamente positivas para o kDNA de *Leishmania* spp., 45 (88,2%) amplificaram para os dois conjuntos de iniciadores. Duas amostras de fígado (um marsupial e um roedor) foram positivas apenas para o iniciador direcionado ao kDNA. As outras quatro amostras (três derivadas de pele de morcego e uma obtida de baço de roedor) foram negativas para os dois conjuntos de iniciadores. Entre as 55 amostras previamente negativas para o kDNA de *Leishmania* spp., 38 delas (69,1%) amplificaram apenas para o marcador constitutivo gapdh. As outras 17 amostras (30,9%) permaneceram negativas para o kDNA de *Leishmania*, mas também não amplificaram para o iniciador direcionado ao gapdh do hospedeiro mamífero. Estas 21 amostras que foram negativas para ambos os iniciadores foram novamente testadas em uma PCR singleplex apenas para o kDNA de *Leishmania* spp. e permaneceram negativas.

6. DISCUSSÃO

A capacidade de vôo verdadeiro dos morcegos, característica única entre os demais mamíferos, reflete em sua elevada capacidade de dispersão e consequentemente em sua alta taxa de infecção por parasitos (Fowler & Miller, 2008). Estudos de infecção natural por *Leishmania* spp. em mamíferos silvestres normalmente não ultrapassa os 10% de taxa de infecção entre os animais analisados (Quintal et al., 2011; Cássia-Pires et al., 2014; Metzdorf et al., 2017). Ao contrário, a taxa de infecção encontrada em nosso trabalho, durante a análise apenas em fragmentos de baços, foi superior a 20% com trinta e duas amostras positivas entre 138 analisadas (23,2%). A exploração de uma ampla gama de ambientes e abrigos permite que esses animais sejam encontrados em diferentes tipos de refúgios que variam entre cavernas em ambientes de matas, minas, locas em pedras e/ou buracos em árvores, folhagens, além de construções antrópicas como telhados e forros de residências que utilizam para abrigo e reprodução (Reis, 2007). Esta diversidade de ambientes permite também o contato destes morcegos com outras populações de mamíferos que podem albergar e amplificar a manutenção de *Leishmania* sp. na natureza assim como favorecer o contato com flebotomíneos adaptados a diferentes ambientes e assim, se infectarem.

Dentre as 11 espécies de morcegos encontradas infectadas por *Leishmania* sp., em cinco: *Anoura caudifer*, *A. geoffroyi*, *E. brasiliensis*, *Micronycteris microtis* e *Vampyressa pusilla*, foi observado o primeiro relato da infecção por *Leishmania* spp. no Brasil. A taxa de infecção entre essas espécies positivas variou entre 10 e 100%. As espécies *E. brasiliensis* (Aporé/Goiás) e *M. microtis* (Petrópolis e Pirai/Rio de Janeiro) foram os animais mais infectados, com 100% de positividade/cada, porém, apenas duas amostras de cada uma dessas espécies foram analisadas. Embora a taxa de infecção por si só, não seja o único indicador da importância de um animal como reservatório, o resultado encontrado demonstra que estes animais estão inseridos no ciclo silvestre de *Leishmania* spp. nas regiões onde foram coletados, mesmo que para a definição de seu real papel como reservatório, sejam necessários mais coletas direcionadas a essas espécies, além da análise de outros tecidos e

inclusão de outras metodologias de diagnóstico. Os estados de Goiás e Rio de Janeiro são considerados endêmicos tanto para Leishmaniose Tegumentar (LT) quanto LV, com relatos da infecção por *Leishmania* sp. em mamíferos silvestres e domésticos, insetos vetores, além de casos humanos (Azevedo et al., 2008; Cássia-Pires et al., 2014; Sangenis et al., 2014; Pires et al., 2015; Lyra et al., 2015). Entretanto, até o momento, não foram registrados casos de infecção natural em morcegos por parasitos deste gênero nestes dois estados.

Com exceção de *E. brasiliensis* (Chiroptera: Vespertilionidae), todos os demais morcegos positivos pertencem à família Phyllostomidae. As espécies *A. caudifer* e *A. geoffroyi* (Phyllostomidae: Glossophaginae) possuem ampla distribuição geográfica, sendo *A. caudifer* já relatado na região norte da América do Sul, noroeste da Argentina e com registros de captura em todas as regiões do Brasil, com exceção, até então, da região Nordeste (Oliveira et al., 2003; Gardner, 2007; Oprea et al., 2009; Barros et al., 2013). Já *A. geoffroyi* é simpátrica ao *A. caudifer* e também encontrado na América Central, principalmente nos países do México, Costa Rica e Panamá e nas ilhas de Trinidad e Tobago (Mantilla & Baker, 2006; Ortega & Alarcón, 2008). São espécies comumente encontradas em ambientes de floresta tropical e áreas de altitude, normalmente acima de 1.500 m (Eisenberg & Redford, 1999). Amostras de sete indivíduos deste gênero (7/13 – 53,8%) foram positivas para o kDNA de *Leishmania* sp. (duas *A. caudifer* e cinco *A. geoffroyi*), sendo todas capturadas no município de Petrópolis/RJ, cuja altitude varia entre 800 e 2.000 metros. Embora sejam animais mais relacionados à ambientes preservados, como florestas primárias e secundárias, podem ser encontrados também em áreas de pastos bem como abrigos urbanos (Reis & Peracchi 1987; Brosset et al. 1996). A presença desses animais, diagnosticados como hospedeiros de *Leishmania* sp., nos ambientes doméstico e sinantrópico pode aumentar a exposição destes morcegos aos vetores que frequentam estes ambientes. A dieta de ambas as espécies é primariamente nectarívora com preferência de flores pequenas por *A. caudifer* e flores maiores por *A. geoffroyi*, entretanto, esses animais se alimentam também de pólen, frutas e insetos, principalmente das ordens Thysanoptera, Hymenoptera, Coleoptera e Lepidoptera (Sazima, 1976; Nowak, 1991; Willig et al., 1993; Teixeira & Peracchi, 1996; Zortéa, 2003). Embora ainda pouco explorado, acreditamos na possibilidade da infecção oral por *Leishmania* spp. durante a ingestão de seus insetos vetores, além da forma tradicional da infecção, através da picada desses insetos durante o repasto sanguíneo.

Indivíduos de *G. soricina* (Phyllostomidae: Glossophaginae) apresentam ampla distribuição geográfica, sendo encontrados do norte do México ao Paraguai, norte da Argentina, Jamaica e Bahamas (Nowak, 1991). No Brasil, essa espécie é encontrada em todos os biomas, entretanto, ainda não foi capturada nos estados de Alagoas (AL), Rio Grande do Norte (RN) e Tocantins (TO) (Marinho-Filho & Sazima, 1998; Nogueira et al. 2007, Peracchi et al. 2011). Seus indivíduos ocupam uma grande diversidade de habitats, como florestas áridas subtropicais, florestas úmidas tropicais e savanas (Nogueira et al. 2007), com relatos de captura no Brasil, em diversas cidades urbanizadas (Bredt & Uieda, 1996). Apesar de sua dieta incluir insetos, frutos e partes florais, *G. soricina* é considerada preponderantemente nectarívora (Gardner, 1977). A sua diversidade alimentar reflete na variedade de locais onde *G. soricina* já foi relatado, especialmente em ambientes fragmentados (Aguiar & Marinho-Filho, 2004). Silva e colaboradores (1996), verificaram a presença de colônias de *Glossophaga* sp. em forros e construções vazias em áreas urbanas, inclusive no ambiente doméstico onde são atraídos pelo néctar em bebedouros de beija-flor (Silva & Peracchi, 1999). A presença dessas espécies nestes ambientes antropizados constitui um fator de risco para a infecção por *Leishmania* spp. em ambientes urbanos. De fato, todos os trabalhos de infecção natural por *Leishmania* spp. em áreas urbanas no Brasil, relatam a presença de *G. soricina* como importantes animais mantenedores do ciclo de transmissão deste parasito. Espécies dos subgêneros *Viannia* e *Leishmania* já foram relatadas em amostras de fígado, pele e sangue desses animais, todos capturados no ambiente urbano das cidades de São Paulo/SP e Campo Grande/MS (Savani et al., 2010; Oliveira et al., 2015).

O gênero *Artibeus* (Phyllostomidae: Stenodermatinae) já foi relacionado a infecções por *Leishmania* spp. no Brasil, com relato da infecção nas duas espécies positivas encontradas neste trabalho: *A. lituratus* e *A. planirostris*. Savani e colaboradores (2010) utilizaram morcegos já coletados pelo Centro de Zoonoses de São Paulo e diagnosticaram a infecção por *Leishmania amazonensis* em cinco indivíduos de *A. lituratus*. Também em São Paulo, porém em áreas urbanas, Oliveira e colaboradores (2015), encontraram a infecção por *L. amazonensis* em fragmentos de baço e pele de *A. lituratus* e *A. planirostris*. *Artibeus lituratus* ocorre do México ao norte da Argentina e *A. planirostris* já foi registrado na Venezuela, Argentina e Paraguai (Koopman, 1993; Barquez et al., 1999; Eisenberg & Redford, 1999). Em nosso trabalho, quatro indivíduos de *A. planirostris* (4/12 – 33,4%), todos capturados

no município de Abaetetuba/PA, estavam positivos para o kDNA de *Leishmania*. A região norte do Brasil é considerada uma área de transmissão antiga de *Leishmania* spp. com relatos da infecção em todos os estados (Quinnel et al., 1992; de Souza et al., 2016; Lima et al., 2017). No Estado do Pará a ocorrência dessa parasitose vem revelando índices crescentes nos últimos anos, sendo o município de Abaetetuba classificado como área de transmissão intensa para LV (Secretaria de Estado de Saúde Pública – SESPA). Entre os quatro *A. lituratus* positivos, (4/11 – 36,4%), dois indivíduos também foram capturados no município de Abaetetuba, e dois, no estado do Rio de Janeiro, um em Barra do Piraí e outro em Petrópolis, ambos com registros de infecção por *Leishmania* spp. (Secretaria de Estado de Saúde do Rio de Janeiro, 2002). Este gênero é composto por espécies frugívoras, mas sua dieta ainda pode incluir néctar, insetos e folhas (Gardner 1977; Emmons & Feer, 1997). Seus principais abrigos incluem ocos de árvores, galhos, folhagens, cavernas e raramente utilizam abrigos urbanos como forros de casas (Emmons & Feer 1997). Em ambientes urbanos, tanto *A. lituratus* quanto *A. planirostris* são observados agrupados em pequenas colônias localizadas na parte inferior da folhagem de árvores comumente encontradas em parques e arborizações residenciais como Amendoeira, Jamelão, Ficus e Embaúba (Sazima et al., 1994; Bredt & Uieda 1996, Perini et al., 2003, Silva et al., 2005, Aguiar, 2007; Uieda & Chaves 2005; Teixeira et al., 2009). A presença desses animais nestas áreas sinantrópicas e o contato com flebotômíneos, cada vez mais frequente nas áreas urbanas (Peterson & Shaw, 2003; Oliveira et al., 2016; Rosario et al., 2016) reforçam a importância em potencial destes animais na epidemiologia das leishmanioses em áreas urbanas.

Outra espécie dessa mesma subfamília, encontrada positiva para o kDNA de *Leishmania*, foi *V. pusilla* (1/3 – 33,3%), capturada em Florianópolis, SC. Neste trabalho, apresentamos o primeiro relato da infecção natural por parasitos desse gênero em *V. pusilla*, que é uma espécie endêmica do sul do Brasil, Paraguai e norte da Argentina (Myers et al., 1983; Lewis & Wilson, 1987; Koopman, 1993; Pedro et al., 1997, 2001; Barquez et al., 1999; Lim et al., 2003; Bianconi et al., 2004). São animais restritos a áreas florestais e encontrados desde o nível do mar a altitude de 1300m (Esbérard & Bergallo, 2010). De fato, as coletas em Santa Catarina foram realizadas dentro da Reserva Biológica do Tabuleiro, uma área de preservação de Mata Atlântica, localizada nos municípios que fazem fronteira com Florianópolis (Cherem, et al., 2011). Apesar da infecção por *Leishmania* sp. já ter sido descrita em humanos

e animais, o estado de Santa Catarina ainda não é considerado como endêmico. Assim como os demais stenodermatinos, *V. pusilla* são predominantemente frugívoros e considerados como um grupo com alimentação específica para árvores do gênero *Ficus* (Gardner, 1977; Lewis & Wilson, 1987; Pedro et al., 1997; Giannini & Kalko, 2005). Ao contrário das demais espécies listadas até o momento, *V. pusilla* normalmente não se alimentam de insetos, e dessa maneira, a provável infecção por *Leishmania* spp. nestes animais foi a inoculativa, durante o repasto sanguíneo de seus insetos vetores. Estudos recentes mostram a presença dos vetores *Nyssomia neivai*, *Lu. fischeri*, e *Lu. ayroza* infectados por *L. braziliensis*, assim como a confirmação desta espécie em isolados provenientes de humanos (Marcondes et al., 2005, 2009; Marlow et al., 2012).

Entre 26 indivíduos de *C. perspicillata* analisados, oito foram positivos frente a infecção por *Leishmania* sp. (8/26 – 30,8%), sete capturados no Rio de Janeiro/RJ e um no estado do Pará. Também pertencente à família Phyllostomidae, subfamília Carollinae, *C. perspicillata* apresenta ampla distribuição geográfica, ocorrendo do México ao norte da Argentina com registros de captura na Amazônia peruana, sul da Bolívia, Paraguai e Brasil (Cloutier & Thomas, 1992). É encontrada em florestas úmidas e decíduas, sendo mais comum em matas secundárias. No Brasil ocorre nos biomas da Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal (Marinho-Filho & Sazima, 1998). É uma espécie gregária e generalista em relação ao abrigo, podendo ser encontrada em grupos de 10 até 100 indivíduos em cavernas, ocos de árvores, túneis, folhagens e construções (Coelho, 2006; Gallardo & Lizcano, 2014). Dos 7 indivíduos encontrados no estado do Rio de Janeiro, seis foram capturados no município do Rio de Janeiro, na Estação Biológica Fiocruz/Campus Mata Atlântica (EFMA). Localizada na região de Jacarepaguá, zona oeste da cidade, a EFMA é considerada uma área endêmica para LT com registros de casos em humanos, cães e insetos vetores, além de raros casos de LV em humanos e cães (Souza, et al., 2015; Marzochi, 2016). *Carollia perspicillata*, é um dos morcegos mais comuns em toda a América Latina, e apresenta um importante papel em florestas tropicais, sendo muito encontrado em ambientes degradados que estão em processo de regeneração. Embora esteja inserida em uma grande área remanescente de florestas da Mata Atlântica, a EFMA está localizada em umas das regiões de maior crescimento e ocupação humana do Rio de Janeiro. Como consequência de toda esta atividade antrópica, a composição faunística da região, conforme observado por Pontes (2015)

é característica de ambientes com diminuição de habitat natural, neste caso decorrente de habitações e ocupações humanas desordenadas, que, propiciam o processo de degradação do ambiente e aproxima o ambiente silvestre do domiciliar. A elevada taxa de infecção (6/7 – 85,7%) observada em *C. perspicillata* capturada nesta localidade, aliado a estudos anteriores de nosso grupo com relatos da infecção em pequenos mamíferos (Pontes, 2015) e outras espécies de morcegos (Rangel, 2017), corroboram a existência de um ciclo silvestre e sinantrópico de manutenção de *Leishmania* na área que pode constituir um risco para infecções humanas tendo a vista a forma de ocupação da região.

Dois indivíduos (2/14 – 14,3%) de *D. rotundus* (Phyllostomidae: Desmodontinae), ambos capturados no estado do Rio de Janeiro, foram positivos para o kDNA de *Leishmania* spp. São morcegos hematófagos obrigatórios que se alimentam de sangue de aves e uma diversidade de espécies de mamíferos (Gardner, 1977; Greenhall & Schmidt, 1988). Em uma escala regional, sua abundância é superior em ambientes sinantrópicos, como fazendas e pequenas vilas, quando comparada com ambientes mais preservados como florestas primárias e secundárias (Delpietro et al., 1992; Bernard 2001; Bobrowiec et al., 2012, 2014). A proximidade cada vez maior entre o ambiente sinantrópico e o urbano, e a modificação antrópica causada pela presença do homem, favoreceu o estabelecimento de *D. rotundus* também no ambiente urbano, sendo, inclusive, classificado como um indicador de ambientes perturbados. Oliveira e colaboradores (2015) relataram pela primeira vez no Brasil, a presença de *L. amazonensis* e *L. infantum* em *D. rotundus* provenientes de regiões urbanizadas e consideradas endêmicas para LV no estado de São Paulo. A capacidade de vôo destes animais que varia entre 8 e 20 km/noite (Crespo et al., 1961; Greenhall & Schmidt, 1988; Medina et al., 2007), além da diversidade de abrigos que utilizam, podem constituir um importante fator de risco para a manutenção de *Leishmania* spp. entre a comunidade de mamíferos onde eles foram capturados.

Dois indivíduos de *M. microtis* (2/2 – 100%) foram positivos para *Leishmania* spp. A espécie *M. microtis* (Phyllostomidae: Phyllostominae), está amplamente distribuída na América do Sul com registros de captura na Amazônia, Cerrado e Mata Atlântica brasileiros (Simmons, 1996; Moras et al., 2015). Indivíduos dessa subfamília normalmente são considerados como indicadores de qualidade de habitat, sendo mais sensíveis aos ambientes modificados (Fenton et al. 1992; Medellín et al. 2000). De fato, um indivíduo positivo de *M. microtis* foi capturado no município de Petrópolis que

ainda apresenta grandes áreas de Mata Atlântica preservada devido à presença do Parque Nacional da Serra dos Órgãos (PARNASO, Plano de Manejo). O outro animal positivo foi capturado na EFMA, que embora ainda apresente algumas ilhas de mata preservada, sua área vem sendo cada vez mais impactada com redução da biodiversidade local, devido às modificações causadas pela atividade antrópica. O encontro deste animal nesta região demonstra que ainda existe certo grau de preservação, principalmente nas localidades mais afastadas das construções humanas e próxima dos remanescentes de florestas da Mata Atlântica, no Maciço da Pedra Branca, onde a EFMA está inserida. De hábito predominantemente insetívoro, *M. microtis*, se alimenta principalmente de dípteros e lepidópteros (Giannini & Kalko, 2005). Essa espécie normalmente vive em colônias em ocos de árvores e cavernas onde podem servir como fonte de infecção para os insetos vetores de *Leishmania* spp. que utilizam os mesmos tipos de abrigos e até o momento, este trabalho apresenta, o primeiro relato da infecção por parasitos do gênero *Leishmania* em *M. microtis*.

Indivíduos da espécie *S. liliium* (Phyllostomidae: Stenodermatinae) são relatados desde o sul do México e em toda América Latina (Eisenberg & Redford, 1999). São comumente capturados em áreas de florestas úmidas e ambientes abertos, incluindo bordas de florestas, clareiras e vegetação secundária (Giannini, 1999). Embora mais associados ao ambiente silvestre, *S. liliium* podem se abrigar em uma variedade de ambientes, naturais ou feitos pelo homem como cavernas, construções e árvores ocas. Com hábito predominantemente frugívoro, esses animais podem se alimentar eventualmente de insetos e pólen (Gannon et al., 1989) e também podem ser encontrados nos ambientes com perturbação antrópica (Tavoloni, 2005). No Brasil, até o momento, foi registrada a infecção de *S. liliium* por *L. amazonensis* em uma área urbana da cidade de São Paulo (Savani et al., 2010).

Por fim, *E. brasiliensis* (Vespertilionidae: Vespertilioninae), é encontrado desde o México até o Uruguai (Eisenberg & Redford, 1999), estando amplamente distribuído no Brasil, com relatos de ocorrência em todos os biomas (Marinho-Filho & Sazima, 1998). São insetívoros, com elevada capacidade de vôo e bem adaptados aos ambientes naturais e urbanos. Podem ser encontrados agrupados em grandes colônias em telhados e forros de casas, folhagem e cavernas (Miranda et al., 2006; Pacheco et al., 2010). Embora apenas dois indivíduos tenham sido analisados, a taxa de infecção para o kDNA de *Leishmania* spp. foi de 100%, sendo apresentado neste

trabalho, o primeiro relato da infecção natural por parasitos do gênero *Leishmania* em *E. brasiliensis*.

Abrigando 15% da diversidade mundial de Chiroptera (Bernard et al., 2011), o Brasil ocupa o terceiro lugar no ranking dos países com a maior riqueza destes organismos (Mantilla-Meluk et al., 2009; Rodrigues-Posada & Cárdenas-González, 2011; Bernard et al., 2011). Apesar dessa destacada posição, o conhecimento sobre a ocorrência e distribuição de morcegos no país ainda é bastante heterogêneo e fragmentado, com a maior parte dos registros realizados no Bioma Mata Atlântica, entretanto, concentrados nas regiões sul e sudeste (Esbérad, 2003; Bernard et al., 2011; Leal et al., 2013; Pires & Fábian, 2013). O estado da Paraíba figurava, até recentemente, entre aqueles com a menor riqueza de morcegos já descritas na região nordeste (Feijó et al., 2010; Fracasso et al., 2010; Beltrão et al., 2011; Feijó & Langguth, 2011). Entretanto em uma revisão recente, realizada apenas na Rebio Guaribas, Feijó e colaboradores (2016) observaram que de um total de 70 espécies de mamíferos que havia sido coletado na Rebio nos últimos 35 anos, 34 espécies (45,4%) pertenciam a ordem Chiroptera.

Ao fim das duas expedições científicas realizadas pelo nosso grupo na Rebio Guaribas, foi capturado um total de 354 morcegos de 14 espécies pertencentes a apenas duas famílias: Phyllostomidae e Vespertilionidae. A família Vespertilionidae possui a maior diversidade e distribuição geográfica da ordem Chiroptera, com mais de 40 gêneros e 400 espécies descritas nas regiões tropicais e temperadas (Nowak, 1991; Simmons, 2005). No Brasil, são encontradas cerca de 20 espécies de vespertilionídeos pertencentes a cinco gêneros, das quais todas se alimentam de insetos (Laval & Fitch, 1977; Barclay & Brigham, 1991). A família Phyllostomidae é a mais diversa entre os morcegos Neotropicais com aproximadamente 150 espécies, sendo mais de 90 já descritas no Brasil (Nowak, 1991, Reis, 2007; Nogueira et al. 2012; Paglia et al. 2012; Dias et al. 2013). É a família de morcegos que apresenta o maior número de hábitos alimentares, que incluem a frugivoria, além de insetos, pequenos vertebrados e sangue (Gardner 1977; Peracchi et al. 2011). A predominância de espécies da família Phyllostomidae corresponde ao padrão já encontrado em outros estudos em morcegos no Brasil e pode ser devido ao método de captura adotado (Passos & Passamani, 2003; Faria & Baumgarten, 2007; Andrade et al., 2010; Rocha et al., 2010; Brito & Bocchiglieri, 2012). O uso de redes de neblina mostra-se bastante funcional para espécies da família Phyllostomidae que forrageiam

no sub-bosque, porém, tende a sub-amostrar espécies das famílias Emballonuridae, Molossidae, Thyropteridae e Vespertilionidae que voam em extratos arbóreos mais elevados (Voss & Emons, 1996; Simons & Voss, 1998, Esbérard & Bergallo, 2008). Dessa maneira, torna-se importante ressaltar a necessidade de se realizar coletas em dossel ou a busca ativa de abrigos para aumentar a riqueza. Durante as expedições científicas para a realização deste trabalho, e utilizando as redes colocadas no dossel, foi possível a captura de um exemplar de *Ametrida centurio*, espécie ainda não descrita na Mata Atlântica (Vilar et al., 2015). Outras descobertas recentes, também na Rebio Guaribas foram obtidas através da disposição das redes de neblina no dossel florestal (Ferreira et al., 2013; Nunes et al., 2013).

Em relação a captura de indivíduos machos e fêmeas, foi observada uma variação baixa entre os gêneros, tendo sido capturados 181 fêmeas (181/354 – 51,1%) e 173 machos (173/354 – 48,9%). Após a coleta e identificação taxonômica, 183 animais foram eutanasiados para a coleta de material para diagnóstico. Os demais (n=171) foram soltos no mesmo local da coleta seguindo a normativa estabelecida na licença de coleta. Entre esses 183 animais selecionados, a diversidade de 14 espécies foi mantida, entretanto a proporção de machos (104/183 – 56,8 %) foi superior à de fêmeas (79/183 – 43,2%). Dentre o total de fêmeas soltas (102/171), mais de 70% correspondiam à espécie *C. perspicillata*, (72/102 – 70,6%), seguidas de *D. cinerea* (9/102 – 8,8%) e *A. planirostris* (7/102 – 6,9%). As capturas na Rebio ocorreram no período chuvoso, entre os meses de março e junho. Embora se acredite que o ciclo reprodutivo de morcegos tropicais seja contínuo, parece haver padrões intermediários, sugerindo que a pluviosidade possa ser o fator climático preponderante no ciclo reprodutivo de algumas espécies (Fleming et al., 1972; Wilson, 1979). A estação chuvosa no estado da Paraíba é normalmente dividida em dois regimes distintos, um denominado estação pré chuvosa com duração média de três meses, entre fevereiro e abril, e o período da quadra chuvosa, propriamente dita, que se inicia em abril com duração até o fim de agosto (Silva, 2007; Pereira, 2014). O período reprodutivo da maioria das espécies frugívoras está associado a maior disponibilidade de frutos durante meses chuvosos (Fleming et al., 1972; Willig, 1985). A grande quantidade de fêmeas lactantes de *C. perspicillata*, nos meses de maio e junho, principalmente na coleta de 2015, pode estar relacionada ao período de amamentação dos indivíduos jovens.

Embora não tenha sido possível observar nenhum hemoflagelado durante o exame a fresco, o isolamento e a posterior caracterização molecular em quatro animais reflete uma parasitemia elevada, suficientemente detectável e capaz de infectar um inseto vetor, visto que o volume de sangue injetado nos tubos para a hemocultura (~ 0,2 – 0,3 mL) busca refletir o volume aproximado que seria ingerido por um triatomíneo durante o repasto sanguíneo (Sant’Anna et al., 2017). O isolamento de um parasito no sangue demonstra que há um claro potencial destes hospedeiros em servir como fonte de infecção aos vetores.

Um indivíduo de *A. planirostris* e outro de *P. discolor* tiveram a infecção caracterizada como *T. cruzi*, DTU Tcl. Ambas as espécies de morcegos já foram relatadas albergando *T. cruzi* em diversas regiões do mundo, inclusive no Brasil (Marinkelle 1966; Ubelaker et al. 1977; Marcili et al., 2009; Ramírez et al., 2014). A diversidade de ambientes frequentados e de hábitos alimentares permite que estes animais possam se infectar tanto no ambiente silvestre quanto nos ambientes sinantrópicos, onde podem atuar como fonte de infecção aos vetores e constituir um fator de risco para as demais populações de hospedeiros mamíferos (Barreto et al. 1974; Funayama & Barreto, 1970, 1973; Fabián 1991; Lisboa et al. 2008; Maia da Silva et al. 2009; Añez et al. 2009). Tanto *Artibeus* spp. quanto *Phyllostomus* spp. podem utilizar ocos de árvores, cavernas, árvores, forros e telhados como abrigos, onde podem compartilhar esses espaços com as principais espécies de triatomíneos e atuarem como fonte alimentar desses vetores (Podtiaguin 1944; Felton, 1956; Goodwin e Greenhall, 1961; Linares, 1968; Emmons & Feer 1997). *Artibeus planirostris* e *P. discolor* são espécies predominantemente frugívoras, mas que podem se alimentar de pequenos insetos, os quais podem estar infectados com *T. cruzi*, podendo assim se infectarem pela via oral (Marinkelle, 1976; Thomas et al., 2007).

A espécie *T. marinkellei* é um parasito comumente encontrado em morcegos do Velho e do Novo mundo, com registros da infecção em pelo menos 11 espécies de morcegos, todas, pertencentes até então, à família Phyllostomidae (Cottontail et al., 2009, 2014; Cavazzana et al., 2010; García et al., 2012; Marcili et al., 2013). Aparentemente, a transmissão de *T. marinkellei* era restrita aos triatomíneos do gênero *Cavernicola*, porém, trabalhos recentes vêm sugerindo a participação de outras espécies, especialmente, *Triatoma dispar*, como potenciais vetores (Cavazzana et al., 2010; Pinto et al., 2015). Embora não tenha sido registrada a ocorrência de *Cavernicola* spp. no estado da Paraíba, outras espécies de hemípteros

são reportados no estado participando da manutenção dos ciclos silvestres de *Trypanosoma* spp. (Lucena-Filho, 2015). Neste trabalho, é apresentado o primeiro relato de *T. marinkellei* infectando *M. minuta* (Phyllostomidae; Phyllostominae). *Micronycteris minuta* é uma espécie amplamente distribuída, ocorrendo de Honduras até o sul do Brasil, com relatos de sua captura em todos os biomas brasileiros e normalmente mais encontrada em ocos de árvores e cavernas (Goodwin & Greenhall, 1961; Graham, 1988; Marinho-Filho & Sazima, 1998; Simmons, 2005). A dieta dessa espécie é primariamente composta por insetos, incluindo coleópteros, hemípteros e lepidópteros, e de acordo com Marinkelle (1976), a maioria dos morcegos infectados por *Trypanosoma* sp. são insetívoros, devendo a infecção ocorrer principalmente por via oral com a ingestão dos vetores infectados (Whitaker & Findley, 1980; Teixeira & Peracchi, 1996).

Embora *T. dionisii* seja comumente descrito como um parasito exclusivo de morcegos, essa espécie pode ser considerada como eclética quanto a diversidade de espécies que é capaz de infectar. Morcegos de cinco famílias, com uma ampla diversidade de hábitos alimentares, já foram relatados albergando esse parasito (Lourenço, 2016). No Brasil, seus hospedeiros já descritos incluem as espécies *C. perspicillata*, *S. liliium* e *D. rotundus*, além de espécies das famílias Noctilionidae, Vespertilionidae e Molossidae (Marcili et al., 2009; Cavazzana et al., 2010). Embora majoritariamente associado com as infecções em morcegos, *T. dionisii* não se multiplica em triatomíneos e até então foi descrito sendo transmitido apenas pelas fezes ou ingestão de percevejos do gênero *Cimex* (Molyneaux, 1991; Gardner & Molyneaux, 1988a). Recentemente, no entanto, *T. dionisii* foi encontrado parasitando um tecido cardíaco humano (Dario et al., 2016). Sabe-se que essa espécie de tripanosomatídeo, assim como *T. cruzi*, é capaz de invadir as células não fagocíticas de mamíferos, formando ninhos de amastigotas e sendo encontrado em pseudocistos (Oliveira et al., 2009). *T. dionisii* também alterna seu ciclo de vida entre as formas epimastigota e tripomastigota metacíclica no hospedeiro invertebrado e formas tripomastigota sanguínea e amastigotas no mamífero, compartilhando com *T. cruzi* alguns epítomos em suas formas epimastigotas (Oliveira et al., 2013). Estas espécies, no entanto, diferem no perfil de moléculas de superfície, ativam vias de sinalização intracelular distintas, e *T. dionisii* não usa o aminoácido Prolina para a produção de ATP, por exemplo (Maeda et al., 2012). Essas características refletem uma especificidade não restrita à apenas uma ordem de mamíferos, e assim como *T. cruzi*,

que é um parasito eclético quanto às ordens de mamíferos que pode infectar, o encontro de *T. dionisii* em um novo hospedeiro, sugere uma potencialidade deste parasito em infectar outras espécies de mamíferos.

De maneira similar ao estudo da infecção por *Leishmania* spp. em fragmentos de baço de morcegos (32/138 – 23,2%), a taxa de infecção natural nos animais capturados na Rebio Guaribas (69/183 – 37,7%), foi superior a normalmente encontrada na literatura para outros grupos de mamíferos. Entre os 183 animais submetidos ao diagnóstico molecular, 69 indivíduos foram considerados positivos, em pelo menos um tecido analisado, para o kDNA de *Leishmania* spp. Em 2014, 24 animais (24/85 – 28,2%) foram considerados positivos enquanto que em 2015, a taxa de infecção foi superior, com 45 animais (45/98 - 45,9%) positivos para *Leishmania* spp.

A espécie *A. cinereus* foi capturada apenas na expedição de 2014 e apresentou 10 indivíduos positivos entre os 21 analisados (47,6%) na PCR direcionada ao kDNA de *Leishmania* spp. Apesar do total de *S. lillium* ter sido baixo e ocorrido apenas em 2014 (n=3), todos esses animais foram positivos frente a infecção por *Leishmania* spp., já tendo sido relatado infectado por *L. amazonensis* em São Paulo, além da identificação do gênero *Leishmania* por nosso grupo (dados apresentados neste trabalho) em fragmentos de baço no município de Piraí/RJ. Embora *C. perspicillata* tenha sido a espécie mais frequente nas duas expedições científicas, (2014, n=69) e (2015, n=90), nenhum indivíduo entre os 24 analisados de 2014 e apenas cinco entre os 21 analisados de 2015, foram positivos para *Leishmania* spp. Mesmo que sua participação na manutenção do ciclo silvestre não tenha sido observada entre os indivíduos coletados em 2014, os cinco indivíduos positivos no ano seguinte, corresponderam a 11,1% (5/45) dos animais infectados em 2015. A infecção em *A. planirostris* se manteve elevada nos dois anos de captura, em 2014, nove entre 19 indivíduos analisados (47,4%) foram considerados positivos, enquanto que em 2015, foram 16 positivos entre os 22 analisados (72,7%). Essa espécie já foi relatada em outros estudos como hospedeiro de *Leishmania* no Brasil (Savani et al., 2010; Oliveira et al., 2015), além de também ter sido diagnosticada por nosso grupo em fragmentos de baço no município de Abaetetuba/PA. Um indivíduo de *A. planirostris* (EM 38, Rebio/2014), estava co-infectado por *T. cruzi* DTU TcI (isolado e já depositado na COLTRYP) e por *Leishmania* spp. em fragmento de baço. De maneira semelhante ao ocorrido para *S. lillium* em 2014, apenas três indivíduos de gênero *Myotis* foram

capturados em 2015, e dois desses animais (66,6%) foram positivos frente a infecção por *Leishmania* spp. Outro grupo de morcegos, capturados apenas em 2015, foi *A. (Dermanura) cinereus*, que apresentou oito entre 19 indivíduos positivos para o kDNA de *Leishmania* spp. (42,1%). Achados como esse reforçam a importância do estudo sistemático e constante do ciclo de transmissão de um dado parasito, onde o papel de uma espécie como reservatório é dinâmico e variável no espaço e no tempo, podendo estar atuando com maior ou menor importância na cadeia de transmissão em um determinado recorte de tempo.

Um resultado PCR positivo demonstra a presença do parasito, mas não nos permite atestar a viabilidade desse parasito, assim como definir se a carga parasitária detectada seria suficiente para garantir sua transmissibilidade (Silva et al., 2005; Britto, 2009; Roque & Jansen, 2014). A taxa de infecção observada nos órgãos internos (baço: 39/183 – 21,3% e fígado: 33/183 – 18,0%) um pouco superior a encontrada nos fragmentos de pele (24/183 – 13,1%) pode implicar em uma provável infecção já bem estabelecida, com tempo suficiente para os parasitos penetrarem na pele e se estabelecerem nos órgãos internos. Estes resultados demonstram que estas espécies são hospedeiras do parasito e que alguma(s) desta(s) espécie(s) podem atuar como reservatórios de *Leishmania* spp., considerando que sua participação como reservatório é dinâmica, passível de ser modificada e depende de uma diversidade de fatores (Silva et al., 2005; Roque & Jansen, 2014).

A taxa de infecção superior observada nos órgãos internos (baço e fígado) pode ser decorrente do processo de hemocaterese, no qual ocorre o recrutamento e a destruição das células sanguíneas, incluindo macrófagos que podem conter o DNA de *Leishmania* spp (Tryphomas et al. 1977; Keenan et al. 1984; Solcá et al. 2012). Entretanto, o encontro do DNA nesses órgãos sugere um potencial de transmissibilidade menor devido a ausência de contato entre os insetos vetores e os parasitos durante o repasto sanguíneo. Já a positividade em fragmentos de pele, pode refletir uma infecção mais recente e uma competência mais elevada desses animais em infectarem seus insetos vetores decorrente da probabilidade do contato entre o parasito e o inseto vetor ser maior durante o repasto sanguíneo. A quantidade mais baixa de amostras de pele positivas frente a infecção por *Leishmania* spp. pode ser decorrente do tamanho do fragmento de tecido escolhido, além da possibilidade de degradação de DNA da pele ser superior a observada em outros tecidos. Vale ressaltar que esses parasitos se distribuem de forma descontínua nos tecidos e

agrupados em ninhos de amastigotas, com variação da localização desses ninhos, inclusive em fragmentos distintos de um mesmo tecido (Roque et al., 2010) que podem influenciar na diferença das taxas de infecção entre os diferentes tecidos.

O encontro do DNA de *Leishmania* em todos os tecidos analisados de três indivíduos, inclusive na pele, permite inferir que esses animais possam ter um potencial um pouco mais elevado de transmissão aos vetores, perante o encontro apenas nos órgãos internos. Mesmo que a detecção do DNA de um parasito não permita inferir sobre a sua transmissibilidade, o resultado encontrado indica que esses animais são hospedeiros de *Leishmania* spp. e que esta infecção estava disseminada em diferentes tecidos dos morcegos. A positividade superior nos órgãos internos, aliada aos resultados negativos obtidos nas culturas, permitem sugerir que esses morcegos não estavam, naquele momento, sendo potenciais transmissores aos insetos vetores. Entretanto, sabendo da longevidade desses animais e do fato que nenhum mamífero é capaz de eliminar completamente a infecção por *Leishmania* spp., alguma modificação no ambiente ou na capacidade destes animais controlarem a infecção, como a presença de infecções concomitantes, possibilidade muito comum no ambiente silvestre, pode modificar o perfil da infecção assim como o papel desses animais na manutenção do ciclo silvestre de *Leishmania* spp.

Nove espécies de morcegos foram positivas frente a infecção por *Leishmania* spp. na Rebio Guaribas. Cinco delas: *A. lituratus*, *A. planirostris*, *C. perspicillata*, *G. soricina* e *S. liliium* também foram encontradas infectadas durante a análise da infecção em fragmentos de baço de animais previamente capturados. As outras quatro espécies incluem duas que correspondem ao primeiro relato da infecção no Brasil (*A. cinereus* e *A. (Dermanura) cinerea*), além de *Myotis* sp. e *P. lineatus*. Indivíduos desses dois últimos gêneros (*P. lineatus* e *M. nigricans*) foram previamente relatados como hospedeiros de *Leishmania* spp. no Brasil (Savani et al., 2010; Lourenço, 2016; de Rezende et al., 2017). O gênero *Myotis* é considerado um dos mais complexos entre os morcegos neotropicais, devido a inconsistência dos caracteres utilizados para a distinção de suas espécies (Barquez et al., 1999). Embora não tenha sido possível a identificação a nível específico do *Myotis* encontrado positivo, relatos recentes mostram que alguns indivíduos de *M. nigricans* capturados na região Nordeste do Brasil, correspondem a outra espécie, denominada *M. lavalii* ou *M. riparius* (Mares et al. 1981; Willig 1983, 1985, 1986; Willig & Moulton 1989; Gregorin et al. 2011; Moratelli & Wilson, 2013). Embora possa haver *M. nigricans* no Nordeste (Bornholdt et al.,

2008), a confirmação específica do indivíduo positivo pode significar a descrição de uma nova espécie do gênero *Myotis* como hospedeiro de *Leishmania* no Brasil.

Embora *A. cinereus* e *A. (D.) cinerea* sejam pertencentes à mesma subfamília (Pyllostomidae: Stenodermatinae), alguns autores sugerem que o gênero *Artibeus* pode ser dividido em três táxons: (i) *Artibeus* que inclui as maiores espécies do grupo; (ii) *Dermanura* para as espécies menores e outros gêneros monoespecíficos; e (iii) *Koopmania* para *A. (Dermanura) concolor* (Owen, 1987, 1991). A filogenia molecular baseada no gene CytB demonstra suporte inconsistente para o grupo *Koopmania* e inclui *Artibeus* e *Dermanura* como grupos irmãos (Van den Bussche et al., 1998). Apesar de diferenças morfológicas e cariotípicas entre esses dois grupos, o reconhecimento de dois gêneros distintos é controverso, não sendo amplamente reconhecido e, assim, a maioria dos trabalhos incluem *Dermaura* como um subgênero de *Artibeus* (Baker, 1973; Smith, 1976; Van den Bussche et al., 1993; Simmons, 2005; Redondo et al., 2008). Devido às dificuldades de identificação entre esses dois grupos, a correta distribuição dessas duas espécies não é muito bem conhecida. Indivíduos de *D. cinerea* foram relatados em fragmentos de floresta primária e em remanescentes da Mata Atlântica brasileira (Bernard & Fenton, 2002; Gardner, 2008). Tanto *A. cinereus* quanto *A. (D.) cinerea* são morcegos frugívoros que se alimentam de pequenos frutos podendo incluir insetos em sua dieta e embora capturados em locais mais preservados, são relativamente tolerantes à perturbação do ambiente (Gardner, 1977; Kunz & Pierson, 1994; Esbérard et al., 2006; Dias & Peracchi 2008; Sampaio et al., 2016). De acordo com a nova classificação taxonômica, *A. (D.) cinerea* já foi relatado na Reserva Biológica Guaribas, mas é a primeira vez que esta espécie é descrita infectada por *Leishmania* spp. (Feijó et al., 2016).

Desde o primeiro ensaio de PCR para o diagnóstico de *Leishmania* feito por Rodgers e colaboradores (1990), e diante da diversidade e similaridade genética entre as espécies deste grupo, vários outros marcadores vêm sendo desenvolvidos para a caracterização em nível específico (Cupolillo et al., 1995; Victoir et al., 1998; Marfurt et al., 2003; Quispe-Tintaya et al., 2005; Mauricio et al., 2006; Rotureau et al., 2006). A identificação da espécie de *Leishmania* envolvida em uma infecção é fundamental para a proposição de medidas de controle e combate em uma determinada localidade. No Brasil, isso se torna ainda mais relevante devido à diversidade de espécies e sua sobreposição em um mesmo foco de transmissão. Apesar do algoritmo molecular proposto previamente pelo nosso grupo (Cássia-Pires et al., 2014), ter sido eficaz na

identificação de espécies de *Leishmania* em roedores silvestres, sua utilização em morcegos não foi eficaz. O diagnóstico inicial, ainda pelo kDNA em morcegos positivos já apresentava outras bandas de amplificação, além da banda de interesse de 120 pb. Achados como esse, também foram observados na identificação de *Leishmania* spp. para as amostras de morcegos provenientes da Baçoteca.

Cerca de 90% do material genético do kDNA é composto por moléculas de minicírculos, sendo observado grande heterogeneidade entre suas sequências na maioria dos tripanosomatídeos. Uma das principais funções dessas moléculas consiste em gerar pequenas moléculas de gRna (RNA guia) que direcionam a transcrição das moléculas de RNA dos maxicírculos. A heterogeneidade nas sequências dos minicírculos parece refletir a variabilidade de gRNAs necessários para a edição dos transcritos de maxicírculos. De fato, a sequência dos minicírculos é heterogênea e composta por regiões de DNA conservado e intercalada por sequências de DNA variável. O número de regiões conservadas por molécula de minicírculo pode diferir entre as diversas espécies de tripanosomatídeos (Sturm & Simpson, 1991). Em *T. brucei* já foram relatadas cerca de 250 diferentes classes de minicírculos, 17 em *L. tarentole*, enquanto que mais de 90% dos minicírculos de *C. fasciculata* possuem a mesma sequência (Simpson, 1986, 1987; Sturm & Simpson, 1991; Shapiro & Englund, 1995). Cada molécula de minicírculo é composta por uma região conservada e outra variável, e o número destas regiões pode variar em função da espécie. A região conservada possui aproximadamente 100 a 200 pb, entretanto pode apresentar um certo grau de polimorfismo entre as espécies. Na região conservada de todos os tripanosomatídeos, estão presentes três blocos de sequências altamente conservadas: CSB1 (GGGCGT), CSB2 (CCCCGTTC) e CSB3 (GGGGTTGGTGTA) (Yurchenko et al., 1999). Embora o gênero *Leishmania* apresente uma região conservada de aproximadamente 200 pb contendo os três blocos de sequências conservadas (Fu & Kolesnikov, 1994), a diferença de classes de minicírculos pode refletir na amplificação de fragmentos com pequenas variações de tamanho, principalmente entre 120 e 140 pb, frente a marcadores direcionados para o kDNA (Sturm & Simpson, 1991). As diferentes classes de minicírculos, podem favorecer um perfil de amplificação semelhante ao observado neste trabalho. Os iniciadores utilizados para a detecção do kDNA no presente trabalho, são considerados degenerados, os quais podem se anelar a mais de um nucleotídeo em uma determinada posição, e por isso podem ter amplificado outras bandas além da

banda de interesse de 120 pb. Embora raro, a amplificação de fragmentos de 140 pb do kDNA de *Leishmania* spp., já foi observada em roedores, no qual o sequenciamento através do algoritmo molecular proposto pelo grupo (Cássia-Pires et al., 2014) confirmou a infecção por *L. shawi*.

Entre os marcadores menos sensíveis, porém mais específicos para a caracterização de *Leishmania*, aqueles direcionados aos espaçadores transcritos internos (ITS1) estão entre os mais usados para o diagnóstico e identificação de espécies de *Leishmania*, principalmente no Velho Mundo. Em relação a caracterização das espécies do Novo Mundo, ensaios de PCR RFLP direcionados ao ITS1 e seguidos de digestão pela enzima *HaeIII*, possuem uma boa capacidade discriminatória, com excessão de algumas espécies muito próximas, como *L. braziliensis* e *L. guyanensis*, que são diferenciadas apenas por sequenciamento gênico (Schönian et al., 2003). Araújo e colaboradores (2013) utilizaram esses iniciadores para o diagnóstico da infecção natural por *Leishmania* em *Tamadua tetradactyla* no Brasil, mas também notaram algumas amplificações inespecíficas de DNA, além da banda de interesse. O sequenciamento gênico, no entanto, confirmou a infecção por *L. infantum*. Entre os iniciadores nucleares, Simpson e colaboradores (2004), através do gene de cópia única *hsp*, obtiveram uma separação razoável e consistente dos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*, enquanto que Fraga e colaboradores (2010) observaram que as regiões codificantes para as proteínas de choque térmico: *hsp20* e *hsp70*, quando utilizadas de forma simultânea, eram capazes da diferenciação interespecífica dentro do subgênero *Leishmania*. Tschoeke e colaboradores (2014) analisaram juntamente com o gene *hsp*, outros 30 genes ortólogos e observaram que as espécies deste gênero estão intimamente relacionadas, principalmente entre o subgênero *Viannia*, e conseguiram a separação clara entre *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. amazonensis*. No Brasil, Silva e colaboradores (2010), embora tenham observado um grau pequeno de polimorfismo para a região codificante da proteína *hsp70*, com apenas 52 sítios polimórficos dentre os 1278 analisados, conseguiram separar claramente as seguintes espécies do subgênero *Viannia*: *L. braziliensis*, *L. naifli*, *L. guyanensis*, *L. shawi* e *L. lainsoni*. Já Graça e colaboradores (2012), conseguiram detectar a região de 234 pb do gene *HSP70* como a que melhor se aplica ao diagnóstico molecular de *Leishmania* spp., com a definição clara da espécie associada a infecção, principalmente entre o subgênero *Viannia*.

A presença das múltiplas bandas observadas no diagnóstico através do kDNA não inviabilizou o prosseguimento dos testes sugeridos pelo algoritmo molecular, para a confirmação da infecção e a caracterização por espécie, através dos iniciadores direcionados a região polimórfica de 234 pb do gene *HSP70*. Tendo em vista a baixa sensibilidade deste gene quando comparada ao kDNA, a reamplificação dos produtos obtidos no primeiro ensaio de PCR para estes iniciadores se mostrou eficaz em aumentar a capacidade de detecção de DNA do parasito, entretanto foi observado novamente a presença de ampliações inespecíficas de DNA, além do fragmento de interesse. Nas amostras positivas para este marcador, foi notada a amplificação de fragmentos de DNA com peso molecular abaixo de 50 pb, além, em algumas amostras, de fragmentos com tamanhos entre 250 e 300 pb. Embora ainda controverso sobre a quantidade de cópias do gene *hsp*, alguns trabalhos vêm mostrando que seu número de cópias possa ser variável de acordo com a espécie do parasito (Zurita et al., 2003; Folgueira & Requena, 2007; Folgueira et al., 2007; Ramírez et al., 2011), refletindo na amplificação de bandas inespecíficas e aquelas de tamanhos semelhantes ao fragmento de interesse. Para as amostras que amplificaram com esse perfil de bandas, foi realizada a excisão da banda de interesse para posterior purificação, que talvez possa ter acarretado na perda de DNA e, conseqüentemente, na baixa qualidade das sequências obtidas. Entretanto, as sequências permaneceram ruins, e sem o mínimo de condições para análise, mesmo para as amostras que amplificaram com banda única.

Do total de amostras analisadas frente a infecção por *Leishmania* spp., 101 (101/321 – 31,5%) foram positivas para o kDNA e destas, 63 (63/101 – 62,3%) foram submetidas a confirmação da infecção através do HSP70(234) com amplificação em 49 amostras (49/63 – 77,7%). Destas 49 amostras, 27 foram selecionadas para o processo de clonagem gênica, com a conseqüente formação de colônias brancas em todas elas. Entretanto, as sequências decorrentes dos clones mostraram apenas a sequência dos plasmídeos, sem o DNA do inserto. Diante das falhas na obtenção das sequências, tanto através da clonagem quanto pelo sequenciamento direto, e na tentativa de confirmar se os mamíferos positivos poderiam estar infectados por outros tripanosomatídeos, um conjunto de amostras foi selecionado para ser submetido aos ensaios de PCR direcionados aos iniciadores V7V8, 18S Nested e ITS1. Porém, todos os resultados foram negativos com amplificação apenas do roedor experimentalmente infectado (amostra controle) através do iniciador ITS1 (dados não mostrados). Embora

os iniciadores direcionados a subunidade menor do rRNA sejam bastante utilizados para estudos de diversidade e filogenia entre os tripanosomatídeos, inclusive com a região V7V8 sendo escolhida como marcador do tipo *barcoding* para este grupo, não há ainda um consenso sobre um marcador *barcoding* para o gênero *Leishmania* (Noyes et al., 1999, Stevens et al., 1999, Maia da Silva et al., 2004; Cortez et al., 2006; Ferreira et al., 2007; Marcili et al., 2009; Teixeira et al., 2011, Lima et al., 2012; Borghesan et al., 2013). A taxa de evolução entre as espécies do gênero *Leishmania* é menor quando comparada a outros tripanosomatídeos (Stevens & Rambaut, 2001). De fato, Marcili e colaboradores (2014) propuseram utilizar esses marcadores *barcoding* para estudos filogenéticos de *Leishmania*, entretanto seus resultados não foram tão robustos quanto são para os demais tripanosomatídeos.

Em *Leishmania* spp, o gene *HSP70* é apresentado em cópia única, ou no máximo em poucas cópias para algumas espécies, e já observado sua organização *in tandem* em *L. braziliensis* (Tschoeke et al., 2014). As poucas variações observadas neste gene, o torna facilmente comparável entre todas as espécies do gênero e capaz de discriminar as espécies mais relevantes para a saúde pública, dos subgêneros *Viannia* e *Leishmania* (der Auwera et al., 2013). A alternância das formas evolutivas deste parasito após o repasto sanguíneo, no qual as formas promastigotas extracelulares observadas no inseto vetor são transferidas para um hospedeiro mamífero, requer mecanismos celulares, ainda não totalmente compreendidos, decorrentes, entre outros fatores, da necessidade do parasito de sobreviver e se adaptar às alterações de temperatura e pH (Garlapati et al., 1999; Zilberstein e Shapira, 1994). A resposta ao dano térmico que estes parasitos sofrem ao realizarem essa alternância de formas tem uma importância vital na diferenciação celular e, conseqüentemente no estabelecimento da infecção em um hospedeiro mamífero (Folgueira et al., 2006). Dessa maneira, os genes da família hsp, que codificam para as proteínas de choque térmico (HSPs) em *Leishmania*, têm sido extensivamente estudados, não apenas pela sua importância no processo de diferenciação celular, mas também como modelos para estudos de expressão gênica nestes parasitos (Lee et al., 1988, Quijada et al., 1997, Clos & Krobitch, 1999, Zilka et al., 2001).

Sabendo da expressão contínua do gene *HSP70*, de sua importância no metabolismo celular destes parasitos e da sua capacidade discriminatória entre a maioria de suas espécies, sendo inclusive já sugerido como método *barcoding* para a identificação de espécies, os resultados obtidos neste trabalho, somados ao

diagnóstico prévio para o kDNA, nos leva a afirmar que, ao menos, as 51 amostras (dentre as 66 testadas para o iniciador HSP70(234)) são pertencentes ao gênero *Leishmania* mesmo com a não identificação em nível específico. Resultados como estes sugerem que os morcegos estão implicados na manutenção de *Leishmania* spp. na natureza. Além disso, é possível que infecções concomitantes (incluindo aquelas por outros tripanosomatídeos), cenário muito provável no ambiente silvestre, possam ter influenciado o sequenciamento gênico. A diversidade tanto dos morcegos quanto das espécies de *Leishmania* pode nos mostrar que estamos diante de um cenário até então desconhecido que necessita de mais estudos para seu melhor entendimento.

Como já mencionado neste trabalho, as ferramentas de biologia molecular estão cada vez mais presentes e utilizadas rotineiramente para o diagnóstico de *Leishmania* spp. em amostras de humanos, insetos vetores e mamíferos, silvestres e domésticos (Degraeve et al., 1994; Belli et al., 1998; Pita-Pereira et al., 2005; de Assis et al., 2010; Cássia-Pires et al., 2014). Mesmo com a elevada sensibilidade dos marcadores direcionados ao kDNA (Simpson, 1973), os resultados falso negativos podem estar relacionados a outros fatores como extração e/ou armazenamento inadequado do DNA da amostra, assim como a presença de inibidores da enzima DNA polimerase nas amostras-teste. Baseado nesta elevada sensibilidade do kDNA, decorrente das cópias de minicírculo que estão presentes entre 10/20 milhares de cópias em cada célula, padronizamos um teste diagnóstico que mantivesse a sensibilidade para a detecção do gênero *Leishmania* e que, ao mesmo tempo, pudesse avaliar a integridade da amostra com a amplificação de um gene constitutivo presente em todos os mamíferos, como controle interno da reação.

Diversos genes constitutivos vêm sendo utilizados como controle interno das reações de PCR para inferir na qualidade do DNA em ensaios moleculares (Stephens et al., 2011; Shi et al., 2016). O gene *GAPDH*, por ser conservado, expresso de forma contínua e presente em todas as espécies que utilizam glicose, figura entre aqueles comumente utilizados como controle interno de PCRs convencionais e agente normalizador na PCR em tempo real (Stephens et al., 2011; Hashemi et al., 2016; Shi et al., 2016). Os iniciadores propostos neste trabalho foram capazes de amplificar fragmentos menores de *GAPDH*, que puderam ser combinados com os iniciadores, já bastante utilizados na literatura, direcionados ao kDNA de *Leishmania*, sem afetar as condições de detecção deste parasito nas reações singleplex. A análise da similaridade genética entre os genes *GAPDH* das espécies selecionadas para este

estudo enfatizam a importância do segmento codificante do domínio catalítico deste gene. Dessa maneira, foram desenhados iniciadores que se anelam à região de 212 pb e apresentam um grau de especificidade que permite a sua aplicação a diferentes amostras de mamíferos, com mais de 90% de identidade entre sequências da base de dados GenBank, além de não ter apresentado nenhuma reação cruzada com o DNA de *Leishmania*.

Apesar da excelente sensibilidade da enzima Fidelity Taq®, a sua utilização durante a padronização do sistema de PCR multiplex não mostrou diferenças significativas entre essa enzima e a Taq convencional. A escolha pelo uso das *beads* permitiu maior reprodutibilidade do ensaio devido ao maior controle sobre as concentrações de cada componente da reação, além de reduzir a possibilidade de contaminação decorrente do manuseio excessivo de reagentes. Os resultados obtidos com as *beads* foram similares aos obtidos com a Taq HiFidelity e, por isso, decidimos propor o seu uso como metodologia desse sistema, já que o principal objetivo do desenvolvimento do sistema multiplex foi adicionar um controle interno para os ensaios de PCR já bem estabelecidos para a detecção de *Leishmania* spp., podendo assim ser implementado para o diagnóstico da infecção em mamíferos silvestres (Roque et al., 2010; Cássia-Pires et al., 2014).

As diluições seriadas de DNA de *L. tropica* em DNA humano, mostraram que esse sistema foi capaz de detectar, de forma eficiente, até 0,1 ng de DNA de *Leishmania* diluído em 100 ng de DNA humano. O limite de detecção para o teste de sensibilidade, aliado aos resultados obtidos durante a padronização com amostras controle e aqueles gerados com amostras de mamíferos silvestres, mostram que o sistema proposto pode ser universalmente empregado para o diagnóstico da infecção por *Leishmania* spp. em fragmentos de tecidos de hospedeiros mamíferos, sem qualquer redução de sua eficiência. O sistema de PCR multiplex desenvolvido neste trabalho é capaz de detectar qualquer espécie do gênero *Leishmania* diretamente de amostras de tecidos, independente de região geográfica e características epidemiológicas locais, sintomas ou suspeita de infecção por determinada espécie do parasito.

A reprodutibilidade do sistema de PCR multiplex foi testada com 106 amostras de 27 espécies pertencentes a quatro diferentes ordens de mamíferos, apresentando aplicabilidade para a detecção do parasito independente do fragmento de tecido e/ou espécie de hospedeiro analisados. Quatro amostras que foram previamente positivas

na PCR singleplex para o kDNA não amplificaram para os dois conjuntos de iniciadores quando submetidas à PCR multiplex, assim como foram negativas em uma nova PCR singleplex direcionada apenas ao kDNA. Outras 17 amostras, previamente negativas nas PCRs singleplex para o kDNA, não amplificaram para o marcador GAPDH e continuaram negativas para o kDNA, podendo este resultado ser decorrente de uma extração de DNA ineficiente ou da degradação após a extração, assim como pela presença de inibidores da reação nestas amostras. Esses resultados deveriam ter sido assumidos como resultados falso negativos (sem amplificação do controle interno) e excluídos dos cálculos das taxas de infecção em uma determinada localidade. Entre as amostras que foram negativas para ambos os iniciadores, 52,4% (11/21) foram derivadas da pele. Normalmente, uma quantidade menor de DNA é extraída desses tecidos em comparação com as amostras de baço e fígado. Amostras de fígado de dois animais (um roedor – *Calomys expulsus* e um marsupial – *Gracililanus agilis*), quando submetidas ao sistema de PCR multiplex amplificaram apenas para o kDNA. Provavelmente essas amostras continham uma grande quantidade de DNA de *Leishmania*, e a competição entre os iniciadores, resultou na amplificação apenas do DNA do parasito devido às condições do sistema desenvolvido, no qual a concentração do iniciador para o kDNA é superior a concentração dos iniciadores direcionados para o GAPDH, favorecendo assim a amplificação do DNA de *Leishmania* em detrimento do gene *gapdh*. A ocorrência de competição entre marcadores moleculares é comum em sistemas de PCR Multiplex, como também observado por Gonçalves-Albuquerque (2014). A não amplificação do fragmento direcionado ao *gapdh* nessas duas amostras (1,9%), não interfere com o objetivo principal do sistema de PCR multiplex proposto, que foi o de detectar o gene constitutivo *gapdh* nas amostras negativas para o marcador direcionado ao kDNA. A amplificação, mesmo que só do kDNA de *Leishmania*, foi capaz de confirmar a viabilidade dessas duas amostras.

O sistema de PCR multiplex aqui proposto permitiu a detecção simultânea de um gene constitutivo de mamífero (*gapdh*) e da região conservada do kDNA de *Leishmania* spp. em amostras de tecido derivadas de uma diversidade de espécies de mamíferos silvestres. Devido ao elevado número de cópias dos minicírculos de kDNA, este marcador é um dos mais utilizados na detecção de *Leishmania* spp. e a nossa proposta, para manter essa elevada sensibilidade, foi inserir a detecção do gene *gapdh* nas condições previamente estabelecidas e reproduzidas para o

diagnóstico de *Leishmania* spp. (Sturm & Simpson, 1991; Degraeve et al., 1994; Volpini et al., 2004; Roque et al., 2010; Cássia-Pires et al., 2014). Nosso sistema de PCR multiplex constitui um método de triagem para a identificação da infecção por *Leishmania*, pois confirma a veracidade dos resultados negativos para infecção e possibilita, em um segundo momento, a caracterização das espécies de *Leishmania*, positivas no ensaio, com o uso de outros marcadores moleculares, mais específicos, porém menos sensíveis e mais adequados para esse propósito (Castilho et al., 2003; da Graça et al., 2012; Cássia-Pires et al., 2014). O sistema de PCR multiplex desenvolvido neste trabalho, foi capaz de confirmar a viabilidade do DNA nas amostras testadas, e detectar a infecção pelo gênero *Leishmania* em amostras de humanos, roedores experimentalmente infectados e em mais de 20 espécies de mamíferos silvestres naturalmente infectados e dessa maneira, pode ser incorporado a rotina do diagnóstico molecular de *Leishmania* spp. em amostras de mamíferos.

7. CONCLUSÕES

- ✓ A elevada taxa de infecção por *Leishmania* spp. observada entre os morcegos analisados mostra que este táxon está envolvido nos ciclos de transmissão de *Leishmania* spp. na natureza;
- ✓ Morcegos estão expostos à infecção por *Leishmania* spp. em diferentes habitats e biomas como demonstrado pelas 15 espécies diferentes encontradas em todas as localidades amostradas;
- ✓ O isolamento e identificação: de *Trypanosoma cruzi* TcI, *T. c. marinkellei* e *T. dionisii* em morcegos mostra que este táxon pode ser considerado como reservatório de Trypanosomatidae;
- ✓ O perfil epizootico da infecção por *Leishmania* sofre variações temporais como demonstrado, pelas taxas de infecção, distintas na Reserva Guaribas, entre os dois anos de coleta;
- ✓ O espectro de espécies de Chiroptera infectado por *Leishmania* spp. é mais amplo do que considerado até o momento, como fica evidenciado pelo encontro de sete espécies de morcegos como novos hospedeiros destes parasito;
- ✓ Aparentemente morcegos são expostos à infecção por *T. cruzi* e *Leishmania* spp. em ambientes distintos uma vez que apenas um indivíduo apresentou coinfeção por *Leishmania* e *T. cruzi*;
- ✓ Em Chiroptera o diagnóstico molecular ainda representa um desafio a ser superado uma vez que mesmo com a amplificação para iniciadores específicos para *Leishmania* spp., não foi possível a caracterização em nível específico;

- ✓ A PCR Multiplex se mostrou capaz de detectar simultaneamente o gene constitutivo do hospedeiro além da infecção por *Leishmania* spp.;
- ✓ A proposta da PCR Multiplex pode ser universalmente aplicada em diferentes amostras, podendo ser incorporada a rotina do diagnóstico molecular de *Leishmania* spp. em mamíferos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acardi SA, Rago MV, Liotta DJ, Fernandez-Duque E, et al. 2012. *Leishmania (Viannia)* DNA detection by PCR-RFLP and sequencing in free-ranging owl monkeys (*Aotus azarai azarai*) from Formosa, Argentina. *Vet Parasitol.* Dec 20.
- Acosta ICL, da Cosra AP, Gennari SM, Marcili A. 2014. Survey of *Trypanosoma* and *Leishmania* in wild and domestic animals in an Atlantic rainforest fragment and surroundings in the state of Espírito Santo, Brazil. *J Med Entomol.* 51(3):686–93.
- AESA. 2004. Agência Executiva de Gestão das Águas do Estado da Paraíba). Conselho Estadual de Recursos Hídricos do Estado da Paraíba. AESA, 78 p.
- Aguiar LMS. J. 2004. Activity patterns of nine phyllostomid bat species in a fragment of the Atlantic Forest in southeastern Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia.* (2):1-14.
- Aguiar LMS. 2007. Subfamília Desmodontinae. In Morcegos do Brasil (N.R. Reis, A.L. Peracchi, W.A. Pedro & I.P. Lima, eds). Nelio R. dos Reis, Londrina, p.40-44.
- Albuquerque, Ana Cláudia Alexandre. 2016. Estudos helmintológicos em quirópteros no bioma Amazônia. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.
- Almeida MF, Favoretto SR, Amatuzzi E, Martorelli LFA; Trezza Neto J, et al. 2005. Rabies virus isolated from bat colony of insectivorous bats, *Eptesicus furinalis*, Virus characterization and epidemiological study. In: 16th International Meeting on Research Advances and Rabies Control in the Americas, Ottawa.p.46-7.
- Altringham J. 1996. Bats: Biology and Behaviour, Oxford: Oxford University Press.
- Amorim AF, Silva RA, Silva MM. 1970. Isolamento do vírus rábico de morcego insetívoro *Histiotus velatus*, capturado no Estado de Santa Catarina. *Pesq Agrop Bras.*5:433-5.
- Ampuero J, Rios AP, Carranza-Tamayo CO, Romero GA. 2009. Genus-specific kinetoplast-DNA PCR and parasite culture for the diagnosis of localised cutaneous leishmaniasis: applications for clinical trials under field conditions in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 104(7):992-7.
- Anderson S. 1997. Mammals of Bolivia, taxonomy and distribution. *Bulletin of the American Museum Natural History*, 231:1-652.
- Andrade LP, Melo RS, Silva RR, Oliveira PJA, Oliveira JCT. 2010. Quiropterofauna da Estação Ecológica de Caetés, Paulista, Pernambuco, Brasil: atualização do inventário 10 anos depois. *Chiropt. Neotrop. Supl.* 16(1):75-77.
- Añez N. 1982. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. IV. A reconsideration of its systematic position. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 77: 405-415.
- Argibay HD, Orozco MM, Cardinal MV, Rinas MA, Arnaiz M, et al. 2016. First finding of *Trypanosoma cruzi* II in vampire bats from a district free of domestic vector-borne transmission in Northeastern Argentina. *Parasitology.* 143(11):1358-68.
- Arisue N, Sanchez LB, Weiss LM, Muller M, Hashimoto T. 2002. Mitochondrial-type hsp70 genes of the amitochondriate protists, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and two microsporidians. *Parasitol.* 51:9–16.
- Arnone IS, Trajano E, Pulchério-Leite A, Passos FC. 2016. Long-distance movement by a great fruit-eating bat, *Artibeus lituratus* (Olfers, 1818), in southeastern Brazil (Chiroptera, Phyllostomidae): evidence for migration in Neotropical bats? *Biota Neotrop.* 16(1): e0026.

- Arnot DE, Barker. DE. 1981. Biochemical identification of cutaneous leishmania by analysis of kinetoplast DNA. Sequence homologies in *Leishmania* kDNA. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1:47-56.
- Asano KM, Hora AS, Scheffer KC, Fahl WO, Iamamoto K. 2016. Alphacoronavirus in urban Molossidae and Phyllostomidae bats, Brazil. *Virology Journal.* 13:124.
- Asato Y, Oshiro M, Myint CK, Yamamoto Y, Kato H, et al. 2009. Phylogenetic analysis of the genus *Leishmania* by cytochrome b gene sequencing. *Exp Parasitol.* 121:352–361.
- Ashford RW. 1997. What it takes to be a reservoir host. *Bel J Zool.* 127: 85-90.
- Austad SN, Fischer KE. 1991. Mammalian aging, metabolism, and ecology: evidence from the bats and marsupials. *J. Gerontol.* 46:B47–B53.
- Azevedo EM, Linhares GF, Duarte SC, Jayme VD, Oliveira HF, et al. 2008. Canine visceral leishmaniasis in dog from Caldas Novas, Goiás. *Rev Bras Parasitol Vet.* 1:339-41.
- Baker RJ. 1973. Comparative cytogenetics of the New World leaf-nosed bats (Phyllostomidae). *Period. Biol.* 75, 37–45.
- Barbosa TF, Medeiros DB, Travassos da Rosa ES, et al. 2008. Molecular epidemiology of rabies virus isolated from different sources during a bat-transmitted human outbreak occurring in Augusto Correa municipality, Brazilian Amazon. *Virology.* 370:228-36.
- Barclay RMR, Brigham RM. 1991. Prey detection, dietary niche breadth, and body size in bats: why are aerial insectivorous bats so small? *The American Naturalist.* Chicago, v. 137, p. 693-703, 1991.
- Barnabe C, Brisse S, Tibayrenc M. 2003. Phylogenetic diversity of bat trypanosomes of subgenus *Schizotrypanum* based on multilocus enzyme electrophoresis, random amplified polymorphic DNA, and cytochrome b nucleotide sequence analyses. *Infect Genet Evol.* 2(3):201-208.
- Barquez RM, Mares MA, Braun JK. 1999. *The bats of Argentina.* Texas: Museum Texas Tech University. p. 1-275. (Special Publications, 42).
- Barreto MP, Ribeiro RD, Filho FF. 1974. Wild reservoirs and vectors of *Trypanosoma cruzi*. LVII=Natural infection of *Phyllostomus hastatus hastatus* (Tallas, 1767) by *T. cruzi*. *Rev Bras Biol.* 1974;34(4):615-22.
- Barrett MP. 1997. The pentose phosphate pathway and parasitic protozoa. *Parasitol Today.* 13: 11–16.
- Barros MAS, Rui AM, Fábian MA. 2013. Seasonal Variation in the Diet of the Bat *Anoura caudifer* (Phyllostomidae: Glossophaginae) at the Southern Limit of its Geographic Range. *Acta Chiropterologica* 15(1):77-84.
- Brasil. Ministério da Saúde. Departamento de Informática do SUS – DATASUS. <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=02> (acessado em 06/Fev/2017).
- Belli A, Rodriguez B, Aviles H, Harris E. 1998. Simplified polymerase chain reaction detection of new world *Leishmania* in clinical specimens of cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 58(1):102-9.
- Beltrão GM, Zappelini CG, Brito JLS, Feijó JA, Lopez L, et al. 2011. Variação na abundância e riqueza de morcegos antes e depois das seis horas de coleta em uma área do agreste paraibano. *Chiroptera Neotropical.* 17 (1): 217-220.
- Bensoussan E, Nasereddin A, Jonas F, Schnur LF, Jaffe CL. 2006. Comparison of PCR Assays for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* 44(4): 1435–1439.
- Bermingham C, Chand MA, Brown CS, Aarons E, Tong C, et al. 2012. Severe respiratory illness caused by a novel coronavirus in a patient transferred to the United Kingdom from the Middle East. *Euro Surveill.* 17:1-5.

- Bernard E. 2001. Vertical stratification of bat communities in primary forests of Central Amazon, Brazil. *Journal of Tropical Ecology*. 17:115–126.
- Bernard E, Fenton MB. 2002. Species diversity of bats (Mammalia: Chiroptera) in forest fragments, primary forests, and savannas in central Amazonia, Brazil. *Canadian Journal of Zoology* 80: 1124-1140.
- Bernard E, Aguiar LMS, Machado RB. 2011. Discovering the Brazilian bat fauna: a task for two centuries? *Mammal Review*, 41(1), 23-39.
- Berzunza-Cruz M, Rodríguez-Moreno Á, Gutiérrez-Granados G, González-Salazar C, Stephens CR, et al. 2015. *Leishmania (L.) mexicana* infected bats in Mexico: novel potential reservoirs. *PLoS Negl Trop Dis*. 28;9(1):e0003438.
- Bessa TA, Spichler A, Chapola G, Husch AC, de Almeida MF. 2010. The contribution of bats to leptospirosis transmission in Sao Paulo City, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 82, 315–317.
- Bianconi GV, Mikich SB, Pedro WA. 2004. Diversidade de morcegos (Mammalia, Chiroptera) em remanescentes florestais do município de Fênix, noroeste do Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*. 21(4):943-954.
- Bobrowiec PED. 2012. A chiroptera preliminary survey in the middle Madeira River region of Central Amazonia, Brazil. *Mammalia*. 76:277–283.
- Bobrowiec PED, Rosa LS, Gazarini J, Haugaasen T. 2014. Phyllostomid bat assemblage structure in Amazonian flooded and unflooded forests. *Biotropica*. 463:312-321.
- Bordes F & Morand S. 2008. Helminth species diversity of mammals: parasite species richness is a host species attribute. *Parasitology*. 135:1701–1705.
- Borghesan TC, Ferreira RC, Takata CS, Campaner M, Borda CC, et al. 2013. Molecular phylogenetic redefinition of *Herpetomonas* (Kinetoplastea, Trypanosomatidae), a genus of insect parasites associated with flies. *Protist*. 164(1):129-152.
- Bornholdt R, Oliveira LR, Fabián ME. 2008. Size and shape variability in the skull of *Myotis nigricans* (Schinz, 1821) (Chiroptera: Vespertilionidae) from two geographic areas in Brazil. *Braz. J. Biol.* 68(3):1-9.
- Botero A, Cooper C, Thompson CK, Clode PL, Rose K, et al. 2016. Morphological and Phylogenetic Description of *Trypanosoma noyesi* sp. nov.: An Australian Wildlife Trypanosome within the *T. cruzi* Clade. *Protist*. 167(5):425-439.
- Bouliere F. 1958. The comparative biology of aging. *J. Gerontol.* 13:16-24.
- Bower SM, Woo PTK. 1981. Two new species of trypanosomes (subgenus *Schizotrypanum*) in bats from southern Ontario. *Canadian Journal of Zoology*. 59(3): 530-545.
- Brandão-Filho SP, Donalisio MR, da Silva FJ, Valença HF, Costa PL, et al. 2011. Spatial and temporal patterns of occurrence of *Lutzomyia* sand fly species in an endemic area for cutaneous leishmaniasis in the Atlantic Forest region of northeast Brazil. *Journal of Vector Ecology*. 36:S71-S76.
- Brandão PE, Scheffer K, Villarreal LY, Achkar S, Oliveira RN, Fahl WO, et al. 2008. A coronavirus detected in the vampire bat *Desmodus rotundus*. *Braz J Infect Dis*. 12(6):466–8.
- Bredt A, Uieda W. 1996. Bats from urban and rural environments of the Distrito Federal, mid-western Brazil. *Chiroptera Neotropica*. 2: 54-57.
- Britto CC. 2009. Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: value and limitations. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 104 Suppl 1: 122-35.
- Brito DV, Bocchiglieri A. 2012. Comunidade de morcegos (Mammalia, Chiroptera) no Refúgio de Vida Silvestre Mata do Junco, Sergipe, nordeste do Brasil. *Biota Neotropica* 12(3): <http://www.biotaneotropica.org.br/v12n3/pt/abstract?inventory+bn02112032012>

- Brisse S, Verhoef J, Tibayrenc M. 2001. Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *International Journal for Parasitology*. 31, 1218–1226.
- Brosset AP, Charles-Dominique A, Cockle JF, Masson D. 1996. Bat communities and deforestation in French Guiana. *Canadian Journal of Zoology*. 74: 1974-1982.
- Bukau B, Horwich AL. The Hsp70 and Hsp60 Chaperone Machines. *Cell*. 92, 351–366.
- Busse I, Preisfeld A. 2003. Discovery of a group I intron in the SSU rDNA of *Ploetia costata* (Euglenozoa). *Protist* 154: 57–69.
- Camargo EP. 1999. *Phytomonas* and other trypanosomatid parasites of plants and fruit. *Advan parasitol*. 42:29–112.
- Cano MI, Gruber A, Vazquez M, Cortes A, Levin MJ, et al. 1995. Molecular karyotype of clone CL Brener chosen for the *Trypanosoma cruzi* genome project. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 71, 273–278.
- Cardia DFF. 2012. Helminths de quirópteros da região Centro-Oeste do Estado de São Paulo. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal.
- Cardia DFF, Tebaldi JH, Nascimento AA, Hoppe LGE, Bresciani DS. 2015. Helminths of Brazilian bats. In: JENKINS, O. P. (8 Ed.) *Advances in Animal Science and Zoology*. Nova Science Publishers, Inc.: Nova York, p. 71-84.
- Carini A 1911. Sur une grande epizootic de rage. *Ann Inst Pasteur* (Paris) 25: 843-846.
- Carrieri ML, Canello FM, Kotait I. 2003. Rabies virus isolated from bats in north region of São Paulo state. In: 14th International Conference Rabies in the Americas, Philadelphia; p. 19-24.
- Carvalho BM, Maximo M, Costa WA, de Santana AL, da Costa SM, da Costa Rego TA, et al. Leishmaniasis transmission in an ecotourism area: potential vectors in Ilha Grande, Rio de Janeiro State, Brazil. *Parasit Vectors*. 2013; 6(1):325.
- Cássia-Pires R, Boité MC, D’Andrea PS, Herrera HM, Cupolillo E, et al. 2014. Distinct *Leishmania* species infecting wild caviomorph rodents (Rodentia: Hystricognathi) from Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 8(12):e3389.
- Castilho JG, Carnieli Jr P, Oliveira RN, 2010. A comparative study of rabies virus isolates from hematophagous bats in Brazil. *J Wildl Dis*. 46:1335-9.
- Castilho JG, Canello FM, Scheffer KC, Achkar SM, Carrieri ML, et al. 2008. Antigenic and genetic characterization of the first rabies virus isolated from the bat *Eumops perotis* in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 50:95-9.
- Castilho TM, Shaw JJ, Floeter-Winter LM, 2003. New PCR assay using glucose-6-phosphate dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. *J Clin Microbiol*. 41:540–546.
- Castilho TM, Camargo LMA, McMahon-Pratt D, Shaw JJ, Floeter-Winter LM. 2008. A Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for the Identification and Quantification of American *Leishmania* Species on the Basis of Glucose-6-Phosphate. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 78(1):122–132.
- Cavazzana Jr M, Marcili A, Lima L, Maia da Silva F, Junqueira ACV, et al. 2010. Phylogeographical, ecological and biological patterns shown by nuclear (ssrRNA and gGAPDH) and mitochondrial (Cyt b) genes of trypanosomes of the subgenus *Schizotrypanum* parasitic in Brazilian bats International. *J Parasitol*. 40: 345–355.
- Chamberlains JS, Gibbs RA, Ranier JE, Nguyen PN, Caskey CT. 1988. Deletion screening of the Duchene muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res*. 23:11141-11156.

- Chance ML. 1979. In: *Problems in the Identification of Parasites* (eds A E R Taylor and R Muller) Blackwell, Oxford.p.55.
- Chapman JR, Waldenström J. 2015. A Systematic Review of Endogenous Controls in Gene Expression Studies. *PLoS ONE*. 10(11): e0141853.
- Cherem JJ, Graipel ME, Tortato M, Althoff S, Brüggemann F. 2011. Mastofauna terrestre do Parque Estadual da Serra do Tabuleiro, Estado de Santa Catarina, sul do Brasil. *Biotemas*. 24 (3): 73-84
- Clos J, Krobitch S. 1999. Heat shock as a regular feature of the life cycle of *Leishmania* parasites. *American Zoologist*. 39, 848–856.
- Coelho DC. 2006. Ecologia e conservação da quiropterofauna no corredor Cerrado-Pantanal. Tese de doutorado, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília.
- Cloutier D & Thomas DW. 1992. *Carollia perspicillata*. Mammalian species, 417:1-9.
- Corman VM, Rasche A, Diallo TD, Cottontail VM, Stöcker A, et al. 2013. Highly diversified coronaviruses in neotropical bats. *J Gen Virol*. 94(9):1984–94.
- Cortez AP, Ventura RM, Rodrigues AC, Batista JS, Paiva F, et al. 2006. The taxonomic and phylogenetic relationships of *Trypanosoma vivax* from South America and Africa. *Parasitology*. 133, 159–169.
- Costa LJcd, Fernandes MEB. 2016. Rabies: Knowledge and Practices Regarding Rabies in Rural Communities of the Brazilian Amazon Basin. *PLoS Negl Trop Dis* 10(2): e0004474.
- Cottontail VM, Wellinghausen N, Kalko EKV. 2009. Habitat fragmentation and haemoparasites in the common fruit bat, *Artibeus jamaicensis* (Phyllostomidae) in a tropical lowland forest in Panamá. *Parasitology*. 136(10):1133–1145.
- Cottontail VK, Kalko EKV, Cottontail I, Wellinghausen N, Tschapka M, et al. 2014. High Local Diversity of *Trypanosoma cruzi* in a Common Bat Species, and Implications for the Biogeography and Taxonomy of the T. *cruzi* clade. *Plos One*. (9): 1-6.
- Coura JR, Marquez MHP, Guerra JADO, Zauza PL, Miguel JC, et al. 2013. A new survey of the serology of human *Trypanosoma cruzi* infection in the Rio Negro microregion, Brazilian Amazon: A critical analysis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 108:909–913.
- Crespo JA, Vanella JM, Blood BD, Carlo DE. 1961. Observaciones ecológicas del vampiro *Desmodus rotundus* en el norte de Córdoba. *Revista del Museum Argentino Ciências Naturales Bernardino Rivadavia*, vol. 4, no. 6, p. 131-160.
- Cunha EMS, Souza MCC, Achkar S, Silva MMS. 1998. Detection of rabies virus in non hematophagous bats from São José do Rio Preto, SP, Brazil. In: 9th International Meeting on Research Advances and Rabies Control in the Americas, Puerto Vallarta.p. 8-12.
- Cunha EMS, Lara MCCSH, Nassar AFC, Sodré MM, Amaral LFV. 2005. Isolation of rabies virus in *Artibeus fimbriatus* bat in the State of Sao Paulo, Brazil. *Rev Saúde Públ*. 39:683-4.
- Cunha EMS, Silva LHQ, Lara MCCSH, Nassar AFC, Albas A, et al. 2006. Bat rabies in the north-northwestern regions of the State of São Paulo, Brazil: 1997-2002. *Rev Saúde Públ*. 40:1082-6.
- Cupolillo E, Grimaldi Jr G, Momen H 1994. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg*. 50: 296-311.
- Cupolillo E, Grimaldi G, Momen H, Beverley SM. 1995. Intergenic Region Typing (Irt)-a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol*. 73:145-155.
- Cupolillo E, Grimaldi Jr G, Momen H. 1997. Genetic diversity among *Leishmania* (*Viannia*) parasites. *Ann Trop Med Parasitol*. 91: 617-626.

- Cupolillo E, Medina-Acosta E, Noyes H, Momen H, Grimaldi G Jr. 2000. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitol Today*. 16: 142-144.
- Multiplex Real-Time PCR Assay Using TaqMan Probes for the Identification of *Trypanosoma cruzi* DTUs in Biological and Clinical Samples. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015 May 19;9(5):e0003765. doi: 10.1371/journal.pntd.0003765. eCollection 2015.
- D'Auria SRN, Camargo MC, Pacheco RC, Savani ES, Dias MA, et al. 2010. Serologic survey for rickettsiosis in bats from São Paulo City, Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 10, 459–463.
- Cura CI, Duffy T, Lucero RH, Bisio M, Péneau J, et al. 2015. Multiplex Real-Time PCR Assay Using TaqMan Probes for the Identification of *Trypanosoma cruzi* DTUs in Biological and Clinical Samples. *PLoS Negl Trop Dis*. 19;9(5):e0003765.
- da Costa AP, Nunes PH, Leite BH, Ferreira JI, Tonhosolo R, et al. 2016. Diversity of bats trypanosomes in hydroelectric area of Belo Monte in Brazilian Amazonia. *Acta Trop*. 164:185-193.
- da Graça GC, Volpini AC, Romero GA, de Oliveira Neto MP, Hueb M, Porrozzini R, Boité MC, Cupolillo E. 2012. Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 107(5):664-74.
- da Rosa ES, Kotait I, Barbosa TF, et al. 2006. Bat-transmitted human rabies outbreaks, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis*. 12:1197-202.
- da Silva LA, de Sousa CS, da Graça GC, Porrozzini R, Cupolillo E. 2010. Sequence analysis and PCR-RFLP profiling of the hsp70 gene as a valuable tool for identifying *Leishmania* species associated with human leishmaniasis in Brazil. *Genetics and Evolution*. 10:77–83
- Dario MA, Rodrigues MS, Barros JH, Xavier SC, D'Andrea PS, et al. 2016. Ecological scenario and *Trypanosoma cruzi* DTU characterization of a fatal acute Chagas disease case transmitted orally (Espírito Santo state, Brazil). *Parasit Vectors*. 31;9:477.
- Darrault RO, Schlindwein C. 2002. Esfingídeos (Lepidoptera, Sphingidae) no Tabuleiro Paraibano, nordeste do Brasil: Abundância, riqueza e relação com plantas esfingófilas. *Revista Brasileira de Zoologia*, Curitiba, 19 (2): 429-443.
- Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD. 2001. Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. *Acta Tropica*. 78: 103-116.
- Daszak P, Epstein JH, Kilpatrick AM, Aguirre AA, Karesh WB, Cunningham AA. 2007. Collaborative research approaches to the role of wildlife in zoonotic disease emergence. *Curr Top Microbiol Immunol*. 315: 463-75.
- d'Avila-Levy CM, Boucinha C, Kostygov A, Morelli KA, Ieremenko AG et al. 2015. Exploring the environmental diversity of kinetoplastid flagellates in the high-throughput DNA sequencing era. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 110(8): 956-965.
- de Araujo VA, Boite MC, Cupolillo E, Jansen AM, Roque AL. 2013. Mixed infection in the anteater *Tamandua tetradactyla* (Mammalia: pilosa) from Para State, Brazil: *Trypanosoma cruzi*, *T. rangeli* and *Leishmania infantum*. *Parasitology* 140:455-460.
- de Assis J, de Queiroz NM, da Silveira R de C, Nunes CM, Oliveira TM, et al. 2010. Comparative study of diagnostic methods for visceral leishmaniasis in dogs from Ilha Solteira, SP. *Rev Bras Parasitol Vet*. 19(1):17-25.
- de Lima H, Rodriguez N, Barrios MA, Avila A, Canizales I, et al. 2008. Isolation and molecular identification of *Leishmania chagasi* from a bat (*Carollia perspicillata*) in northeastern Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 103(4): 412-414.

- de Oliveira FM, Costa LH, de Barros TL, Ito PK, Colombo FA, et al. 2015. First detection of *Leishmania* spp. DNA in Brazilian bats captured strictly in urban area. *Acta Trop.* 150:176-81.
- de Souza AKP, Maia IM, Hernández CFM. 2005. Riqueza, abundância e diversidade de Euglossina (Hymenoptera, Apidae) em três áreas da Reserva Biológica Guaribas, Paraíba, Brasil. *Rev. Bras. Zool.* 22(2):1-6.
- de Souza AA, Dos Santos TV, Jennings YL, Ishikawa EA, Barata Ida R, et al. 2016. Natural *Leishmania* (*Viannia*) spp. infections in phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from the Brazilian Amazon region reveal new putative transmission cycles of American cutaneous leishmaniasis. *Parasite.* 23:22. doi: 10.1051/parasite/2016022. Epub 2016 May 27.
- de Rezende MB, Herrera HM, Carvalho CM, Carvalho Anjos EA, Ramos CA, et al. 2017. Detection of *Leishmania* spp. in Bats from an Area of Brazil Endemic for Visceral Leishmaniasis. *Transbound Emerg Dis.* doi: 10.1111/tbed.12597.
- Deane LM. 1961. Tripanosomídeos de mamíferos da região Amazônica. I. Alguns flagelados encontrados no sangue de mamíferos silvestres do Estado do Pará. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 3:15-28, 1961.
- Deane LM, Sugay W. 1963. *Trypanosoma pessoai* n.sp., in vampire bats *Desmodus rotundus rotundus* from the state of São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 5:165.
- Deborggraeve S, Boelaert M, Rijal S, De Doncker S, Dujardin JC, et al. 2008 Diagnostic accuracy of a new *Leishmania* PCR for clinical visceral leishmaniasis in Nepal and its role in diagnosis of disease. *Trop Med Int Health.* 13(11):1378-83.
- Degrave W, Fernandes O, Campbell D, Bozza M, Lopes U. 1994. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* - a mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 89: 463-469.
- Delpietro HA, Marchevsky N, Simonetti E. 1992. Relative population densities and predation of the common vampire bat (*Desmodus rotundus*) in natural and cattle-raising areas in northeast Argentina. *Preventive Veterinary Medicine.* 14:13–20.
- Desquesnes M, Holzmüller P, Lai DH, Dargantes A, Lun ZR. 2013. *Trypanosoma evansi* and Surra: A Review and Perspectives on Origin, History, Distribution, Taxonomy, Morphology, Hosts, and Pathogenic Effects. *BioMed Research International.* 194176. doi: 10.1155/2013/194176.
- Deus GT, Becer M, Navarro IT. 2003. Diagnóstico de raiva em morcego não-hematófago na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Centro-oeste do Brasil: descrição de casos. *Cienc Agrar (Londrina).* 24:171-6.
- Dias D, Peracchi AL. 2008. Quirópteros da Reserva Biológica do Tinguá, estado do Rio de Janeiro, sudeste do Brasil (Mammalia: Chiroptera). *Revista Brasileira de Zoologia.* 25:333-369.
- Dias D, Esbérard CEL, Moratelli R. 2013. A new species of *Lonchophylla* from the Atlantic Forest of southeastern Brazil, with comments on *L. bokermanni*. *Zootaxa.* 3722: 347–360.
- Dietrich M, Muhldorfer K, Tortosa P, Markotter W. 2015. Leptospira and bats: story of an emerging friendship. *PLoS Pathog.* 11: e1005176.
- Dobson A, Foufopoulos J. 2001. Emerging infectious pathogens of wildlife. *Phil. Trans. Royal Soc. Lond. B* 356, 1001-1012.
- Dobson AP. 2005. What links bats to emerging infectious diseases? *Science.* 310:628–629.
- Dominguez SR, O’Shea TJ, Oko LM, Holmes KV. 2007. Detection of Group 1 Coronaviruses in Bats in North America. *Emerg Infect Dis.* 13:1295–300.

- Draper G, Mann P, Lewis JF: 1994. Hispaniola. Caribbean geology: an introduction. Edited by: Donovan S, Jackson TA. Kingston, Jamaica: The University of the West Indies Publishers' Association, 129-150.
- Drexler JF, Corman VM, Muller MA, Maganga GD, Vallo P, et al. 2012. Bats host major mammalian paramyxoviruses. *Nat Commun.* 3:796.
- Dujardin JC, Victoir K, De Doncker S, Guerbouj S, Arévalo J, et al. 2002. Molecular epidemiology and diagnosis of Leishmania: what have we learnt from genome structure, dynamics and function? *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 96(1):S81-86.
- Dunne RR, Harris NC, Colwell RK, Koh LP, Sodhi NS. 2009. The sixth mass coextinction: are most endangered species parasites and mutualists? *Proc. R. Soc. London. Sci.* 276:3037–3045.
- Edwards DR, Denhardt DT. 1985. A study of mitochondrial and nuclear transcription with cloned cDNA probes. Changes in the relative abundance of mitochondrial transcripts after stimulation of quiescent mouse fibroblasts. *Exp Cell Res.* 157: 127-143.
- Eisenberg JF, Redford KH. 1999. Mammals of the Neotropics: The Central Neotropics volume 3: Ecuador, Peru, Bolivia, Brazil. Chicago: The University of Chicago Press. 609 p
- Eisenberg E, Levanon EY. 2013. Human housekeeping genes, revisited. *Trends in Genetics.* 29(10):1-6.
- El Tai N, Osman F, El Far M, Presbefi W, Schönian G. 2000. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter papers as revealed by single-strand conformation polymorphisms (SSCP) and sequencing. *Trans R Soc Trop Hyg.* 94, 575–579.
- Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, Klapper PE. 2000. Multiplex PCR: Optimization and Application in Diagnostic Virology. *Clin Microbiol Rev.* 13(4):559-570.
- Emmons LH, Feer F. 1997. Neotropical Rainforest Mammals. A Field Guide. University of Chicago Press, Chicago.
- Esbérard CEL. 2003. Diversidade de morcegos em uma área de Mata Atlântica regenerada no sudeste do Brasil (Mammalia: Chiroptera). *Revista Brasileira de Zootecias.* 5(2):189-204.
- Esbérard CEL, Jordão-Nogueira T, Luz JL, Melo GGS, Mangolin R, et al. 2006. Morcegos da Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ, Sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Zootecias.* 8(2):147-153.
- Esbérard CEL, Bergallo HG. 2008. Influência do esforço amostral na riqueza de espécies de morcegos no sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia.* 25(1):67-73.
- Esbérard CEL, Bergallo HG. 2010. Biology of *Vampyressa pusilla* (Wagner) in Rio de Janeiro State, Southeastern Brazil (Mammalia, Chiroptera, Phyllostomidae). *Braz. J. Biol.* 70(2):367-371
- Esbérard CEL, Costa LM, Luz JL. 2013. Morcegos de Morro de São João, Estado do Rio de Janeiro, Sudeste do Brasil. *Bioscience Journal.* 29(2):449-457.
- Caballero-Espinosa Zdc. 2014. Origem, evolução e relações filogenéticas de homólogos de prolina racemase em espécies de *Trypanosoma*. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo.
- Evans NJ, Bown K, Timofte D, Simpson VR, Birtles RJ. 2009: Fatal borreliosis in bat caused by relapsing fever spirochete, United Kingdom. *Emerg. Infect. Dis.* 15:1331–1333.
- Ewers WH. 1974. *Trypanosoma aunawa* sp. n. from an Insectivorous Bat, *Miniopterus tristis*, in New Guinea, Which may be Transmitted by a Leech. *J. Parasitol.* 60:172–178.
- Fabián ME. 1991. Contribuição ao estudo da infecção de morcegos por hemoflagelados do gênero *Trypanosoma* Gruby, 1843. *Cadernos de Saúde Pública.* 7:69–81.

- Falla A, Herrera C, Fajardo A, Montilla M, Vallejo GA, et al. 2009. Haplotype identification within *Trypanosoma cruzi* I in Colombian isolates from several reservoirs, vectors and humans. *Acta Trop.* 110(1):15-21.
- Faria D, Baumgarten J. 2007. Shade cacao plantations (*Theobroma cacao*) and bat conservation in southern Bahia, Brazil. *Biodivers. Conserv.* 16:291-312.
- Favoretto SR, Carrieri ML, Cunha EMS, Aguiar EAC, Silva LHQ, et al. 2002. Antigenic typing of Brazilian rabies virus samples isolated from animals and humans, 1989-2000. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 44:91-5.
- Feijó JA, Araújo P, Fracasso MPA, Santos KRP. 2010. New records of three bat species of the state of Paraíba, northeastern Brazil. *Chiroptera Neotropical* 16 (2): 723-727.
- Feijó JA, & Langguth A. 2011. Lista dos quirópteros da Paraíba, com 25 novos registros. *Chiroptera Neotropical.* 17(2):1055-1062.
- Feijó JA, Nunes H, Langguth A. 2016. Mamíferos da Reserva Biológica Guaribas, Paraíba, Brasil. *Revista Nordestina de Biologia.* 24(1): 57-74.
- Fenton MB, Acharya L, Audet D. 1992. Phyllostomid bats (Chiroptera: Phyllostomidae) as indicators of habitat disruption in the Neotropics. *Biotropica* 24(3):440-446.
- Fenton MB, Ratcliffe JM. 2010. Quick guide: Bats. 20(24): R1060–R1062.
- Fermino BR, Viola LB, Paiva F, Garcia HA, de Paula CD, et al. 2013. The phylogeography of trypanosomes from South American alligatorids and African crocodilids is consistent with the geological history of South American river basins and the transoceanic dispersal of *Crocodylus* at the Miocene. *Parasit Vectors.* 29;6(1):313.
- Flegontov PN, Kolesnikov AA. 2006. Radically different maxicircle classes within the same kinetoplast: an artefact or a novel feature of the kinetoplast genome? *Kinetoplastid Biol Dis.* 18;5:5.
- Flegontov P, Votýpka J, Skalický T, Logacheva MD, Penin AA, et al. 2013. *Paratrypanosoma* Is a Novel Early-Branching Trypanosomatid. *Curr Biol.* 23(18):1787–1793.
- Fleming TH, Hooper ET, Wilson DE. 1972. Three Central American Bat Communities: Structure, Reproductive Cycles, and Movement Patterns. *Ecology.* 53: 556-569.
- Ferreira RC, Campaner M, Viola LB, Takata CS, Takeda GF, et al. 2007. Morphological and molecular diversity and phylogenetic relationships among anuran trypanosomes from the Amazonia, Atlantic Forest and Pantanal biomes in Brazil. *Parasitology.* 134, 1623–1638.
- Ferreira RC, De Souza AA, Freitas RA, Campaner M, Takata CS, et al. 2008. A phylogenetic lineage of closely related trypanosomes (Trypanosomatidae, Kinetoplastida) of anurans and sand flies (Psychodidae, Diptera) sharing the same ecotopes in Brazilian Amazonia. *J Euk Microbiol.* 55, 427–435.
- Ferreira AP, Melo DC, Loures-Ribeiro A. 2013. *Diclidurus albus* Wied-Neuwied, 1820 (Chiroptera: Emballonuridae): First Record of the species in the state of Paraíba, Brazil. *Check List* 9 (4): 793-796.
- Fernandes O, Murthy VK, Kurath U, Degraeve WM, Campbell DA. 1994. Mini-exon gene variation in human pathogenic *Leishmania* species. *Mol. Biochem. Parasitol.* 66:261–271.
- Folgueira C, Canavate C, Chicharro C, Requena JM. 2006. Genomic organization and expression of the HSP70 locus in New and Old World *Leishmania* species. *Parasitology.* 134(Pt 3):369–377.
- Folgueira C, Requena JM. 2007. A postgenomic view of the heat shock proteins in kinetoplastids. *FEMS Microbiol Rev.* 31(4):359–377.
- Fowler ME, Miller E. 2008. Zoo and Wild Animal Medicine Current Therapy, Volume 7. 688p.

- Fracasso MPA, Beltrão MG, Lopez LCS. 2010. Primeiro Registro de *Histiotus velatus* para o Estado da Paraíba, Brasil. *Chiroptera Neotropical*. 16 (1): 134-136.
- Fraga J, Montalvo AM, De Doncker S, Dujardin JC, Van der Auwera G. 2010. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. *Infect Genet Evol*. 10(2):238-45.
- Fu G, Kolesnikov AA. 1994. *Leishmania gymnodactyli* and *Leishmania infantum* minicircles contain the same guide RNA genes as do minicircles of *Leishmania tarentolae*. *Mol Biochem Parasitol*. 67:171–174.
- Funayama GK, Barretto MP. 1970. Estudos sobre reservatório e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XXXVIII. Infecção natural de morcego, *Desmodus rotundus rotundus* (Geoffroy, 1810) pelo *T. cruzi*. *Rev Bras Biol*. 30:13-19.
- Funayama GK, Barretto MP. 1973. Studies of wild reservoirs and vectors of *Trypanosoma cruzi*. LIV. Natural bat infection, *Epitesicus braziliensis braziliensis* (Desmarest, 1819) by *T. cruzi*. *Revista Brasileira de Biologia*. 33:439–444.
- Garlapati S, Dahan E, Shapira M. 1999. Effect of acidic pH on heat shock gene expression in *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 100, 95–101.
- Galindo-González J. 1998. Dispersion de semillas por murcielagos: su importancia en la conservacion y regeneracion del bosque tropical. *Acta Zool Mex*. 73:57-74.
- Gallardo AO, Lizcano DJ. 2014. Social Organization of a Colony of Bats *Carollia brevicauda* in Artificial Shelter, Bochalema, Norte de Santander, Colombia. *Acta biol.Colomb*. 19(2):1-10.
- Gannon MR, Wilig MR, Jones JK. 1989. *Sturnira lilium*. *Mamm Species* 333:1-5.
- García L, Kindt A, Bermudez H, Llanos-Cuentas A, De Doncker S, et al 2004. Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. *J Clin Microbiol*. 42(5):2294-7.
- García L, Ortíz S, Osorio G, Torrico MC, Torrico F, et al. 2012. Phylogenetic analysis of bolivian bat trypanosomes of the subgenus *Schizotrypanum* based on cytochrome b sequence and minicircle analyses. *Plos One*.7: e36578
- Gardner AL. 1977. Feeding habits. In Baker RJ, Knox Jones Jr, Carter DC. *Biology of bats of the New World family Phyllostomidae*. Texas: Museum Texas Tech University.
- Gardner AL. 2007. *Mammals of South America: Marsupials, Xenarthrans, Shrews, and Bats*. The University of Chicago Press, Chicago and London, 669 pp.
- Gardner AL. 2008. *Mammals of South America, Vol. 1: Marsupials, Xenarthrans, Shrews, and Bats*. Chicago: The University of Chicago Press. 669 p
- Gardner RA, Molyneaux DH. 1988(a). *Schizotrypanum* in British bats. 1988. *Parasitology*. 97:43–50.
- Gardner RA, Molyneaux DH: 1988(b). *Polychromophilus murinus*: a malarial parasite of bats: life- history and ultrastructural studies. *Parasitology*. 96: 591-605.
- Garnham PCC: 1973. The zoogeography of *Polychromophilus* and description of a new species of a gregarine (*Lankestria galliardi*). *Ann Parasitol Hum Comp*. 48: 231-242.
- Gianninni NP, Kalko EKV. 2004. Trophic structure in a large assemblage of phyllostomid bats in Panama. *Oikos*. 105(2):209-220.
- Gianninni NP, Kalko EKV. 2005. The guild structure of animalivorous leaf-nosed bats of Barro Colorado Island, Panama, revisited. *Acta Chiropterologica*. 7(1):131-146.
- Gibson DI, McCarthy TJ. 1987. Bats as hosts of acanthocephalan parasites. *Helminthological Abstracts, Series Animal and Human Helminthology*. 56(5): 159-162.
- Giltsbach R, Kouta M, Bönisch H, Brüss M. Comparison of in vitro and in vivo reference genes for internal standardization of real-time PCR data. *Biotechniques*. 2006; 40:173-177.

- Góes LG, Ruvacaba SG, Campos AA, Queiroz LH, Carvalho C, et al. 2013. Novel bat coronaviruses, Brazil and Mexico. *Emerg Infect Dis.* 19(10):1711–3.
- Gompper ME, Williams ES. 1998. Parasite conservation and the black-footed ferret recovery program. *Conserv. Biol.* 12:730–732.
- Gonçalves-de-Albuquerque SC, Régis-da-Silva CG, Brito MEF, Brandão-Filho SP, Paiva-Cavalcanti M. 2012. Application of the mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene for sample quality control in multiplex PCR for diagnosis of leishmaniasis. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 18: 188-197.
- Gonçalves-de-Albuquerque SC, Pessoa e Silva R, Morais RCS, Trajano-Silva LAM, Régis-da-Silva CG, et al. 2014. Tracking false-negative results in molecular diagnosis: proposal of a triplex-PCR based method for leishmaniasis diagnosis. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 20: 16.
- Goodwin GG, Greenhall AM. 1961. A review of the bats of Trinidad and Tobago. *B Am Mus Nat Hist.* 122:187-302.
- Graham GL. 1988. Interspecific associations among Peruvian bats at diurnal roosts and roost sites. *J. Mammal.* 69: 711–720
- Greenhall AM, Schmidt U. 1988. Natural history of vampire bats. Florida: Boca Raton, CRC Press. 247 p.
- Gregorin RE, Gonçalves E, Aires CC, Carmignoto P. 2011. Morcegos (Mammalia: Chiroptera) da Estação Ecológica Serra Geral do Tocantins: composição específica e considerações taxonômicas. *Biota Neotropica.* 11:299–311.
- Grisard EC, Sturm NR, Campbell DA. 2003. A new species of trypanosome, *Trypanosoma desterreensis* sp. n., isolated from South American bats. *Parasitology.* 127(Pt 3):265-271.
- Guerbouj S, Victoir K, Guizani I, Seridi N, Nuwayri-Salti N, et al. 2001. Gp63 gene polymorphism and population structure of *Leishmania donovani* complex: influence of the host selection pressure? *Parasitology.* 122(1):25-35.
- Guevara P, Alonso G, da Silveira JF, de Mello M, Scorza JV, et al. Identification of new world *Leishmania* using ribosomal gene spacer probes. *Mol Biochem Parasitol.* 56(1):15–26.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Department of Microbiology, North Carolina State University.
- Hamilton PB, Stevens JR, Gaunt MW, Gidley J, Gibson WC. 2004. Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphatedehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. *Int J Parasitol.* 34(12):1393-1404.
- Hamilton PB, Stevens JR, Gidley J, Holz P, Gibson WC. 2005. A new lineage of trypanosomes from Australian vertebrates and terrestrial bloodsucking leeches (Haemadipsidae). *Int J Parasitol.* 35(4):431-43.
- Hamilton PB, Adams ER, Malele II, Gibson WC. 2008. A novel, high-throughput technique for species identification reveals a new species of tsetse-transmitted trypanosome related to the *Trypanosoma brucei* subgenus, *Trypanozoon*. *Infect Genet Evol.* 8(1):26-33.
- Hamilton PB, Adams ER, Njiokou F, Gibson WC, Cuny G, et al. 2009. Phylogenetic analysis reveals the presence of the *Trypanosoma cruzi* clade in African terrestrial mammals. *Infect Genet Evol.* 9(1):81-86.
- Hamilton PB, Stevens JR. 2010. Classification and Phylogeny of *Trypanosoma cruzi*. In: American Trypanosomiasis: Chagas Disease One Hundred Years of Research. Exeter, UK: School of Biosciences, University of Exeter. p. 17.

- Hamilton PB, Cruickshank C, Stevens JR, Teixeira MM, Mathews F. 2012. Parasites reveal movement of bats between the New and Old Worlds. *Mol Phylogenet Evol.* 63(2): 521–526.
- Hannaert V, Opperdoes FR, Michels PA. 1998. Comparison and evolutionary analysis of the glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from different Kinetoplastida. *J Mol Evol.* 47(6):728-38.
- Haque R, Shantanu R, Siddique A, Utpal M, Rahman M, et al. 2006. Multiplex Real-Time PCR assay for detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* and *Cryptosporidium spp.* *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 76(4).
- Harris E, Kropp G, Belli A, Rodriguez B, Agabian N. 1998. Single-step multiplex PCR assay for characterization of New World Leishmania complexes. *J Clin Microbiol.* 36(7):1989-1995.
- Hashemi SH, Nematzadeh G, Ahmadian G, Yamchi A, Kuhlmann M. 2016. Identification and validation of *Aeluropus littoralis* reference genes for Quantitative Real-Time PCR Normalization. *J Biol Res (Thessalon).* 19;23:18.
- Hassan, M. Q., S. Das, and S. Adhya. 1992. Mini-exon derived RNA gene of Leishmania donovani: structure, organization, and expression. *J. Biosci.* 17:55–66.
- Haydon DT, Cleaveland S, Taylor LH, Laurenson MK. 2002. Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. *Emerg Infect Dis.* 8(12): 1468-1473.
- Henderson G W, Laird C, Dermott E, Rima BK., 1995. Characterization of Mapuera virus: structure, proteins and nucleotide sequence of the gene encoding the nucleocapsid protein. *J Gen Virol.* 76, 2509-2518.
- Hernández R, Rios P, Valdés AM, Piñero D. 1990. Primary structure of *Trypanosoma cruzi* small-subunit ribosomal RNA coding region: comparison with other trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol.* 41(2):207-12.
- Henriksson J, Porcel B, Rydaker M, Ruiz A, Sabaj V, et al. 1995. Chromosome specific markers reveal conserved linkage groups in spite of extensive chromosomal size variation in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 73: 63-74.
- Herrera C, BARGUES MD, Fajardo A, Montilla M, et al. 2007. Identifying four *Trypanosoma cruzi* I isolate haplotypes from different geographic regions in Colombia. *Infection, Genetics and Evolution.* 7, 535–539.
- Herrera HM, D'ávila AMR, Norek A, Abreu UG, Souza SS, et al. 2004. Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. *Veterinary Parasitology.* 125:263–275.
- Hoare CA. Morphological and taxonomic studies on mammalian trypanosomes X Revision of the systematic. *J Protozool.* 1964; 11: 200-207.
- Hoare CA, Wallace FG. 1966. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. *Nature.* 212:1385-1386.
- Hoare CA. 1972. The trypanosomes of mammals. A zoological monograph. Blackwell Scientific Publications, Oxford-Edinburgh, UK.
- Hodo CL, Goodwin Cupolillo E, Mayes BC, Mariscal JA, Waldrup KA, et al. 2016. Trypanosome species, including *Trypanosoma cruzi*, in sylvatic and peridomestic bats of Texas, USA. *Acta Trop.* 164:259-266.
- Holmes DJ, Austad SN. 1994. Fly now, die later: life-history correlates of gliding and flying in mammals. *J. Mammal.* 75:224–226.
- Hove RT, Schuurman T, Kooistra M, Möller L, Lieshout LV, Verweij JJ. 2007. Detection of diarrhoea-causing protozoa in general practice patients in The Netherlands by multiplex real-time PCR. *CMI.* 13(10):1001–1007.

- Hu XS, Yang WT, Lu HG, Yan HP, Cheng JP, et al. 2000. Sequencing a specific kinetoplast DNA fragment of *Leishmania donovani* for polymerase chain reaction amplification in diagnosis of leishmaniasis in bone marrow and blood samples. *J Parasitol.* 86(4):822-6.
- Hu W, Wu S, Yu X, Abullahi AY, Song M. 2015. A Multiplex PCR for Simultaneous Detection of Three Zoonotic Parasites *Ancylostoma ceylanicum*, *A. caninum*, and *Giardia lamblia* Assemblage A. *BioMed Research International*. Volume Article ID 406168. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/406168>.
- Ibama. 2003 - Plano de manejo, Fase 2, da Reserva Biológica Guaribas. Brasília, 520p.
- Ikonomopoulos J, Kokotas S, Gazouli M, Zavras A, Stoitsiou M, et al. 2003. Molecular diagnosis of leishmaniosis in dogs. Comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. *Vet Parasitol.* 113(2):99-113.
- Ito M, Arai YT, Ito UT, et al. 2001. Genetic characterization and geographic distribution of rabies virus isolates in Brazil: identification of two reservoirs, dogs and vampire bats. *Virology.* 284:214-22.
- Jackson AC, Wunner WH. 2007. Rabies. Academic Press, New York, New York, 493 pp. Jakes KA, O'Donoghue PJ, Adlard RD. 2001. Phylogenetic relationships of *Trypanosoma chelodina* and *Trypanosoma binneyi* from Australian tortoises and platypuses inferred from small subunit rRNA analyses. (Pt 5):483-487.
- Jones KE. 2002. Chiroptera (Bats). In: Encyclopedia of Life Sciences. Macmillan Publishers Ltd and Nature Publishing Group, Basingstoke, pp 1-5.
- Jones RN, Lynne Neale M, Beattie B, Westmoreland D, Fox JD. 2000. Development and Application of a PCR-Based Method Including an Internal Control for Diagnosis of Congenital Cytomegalovirus Infection. *J Clin Microbiol.* 38(1): 1–6.
- Junqueira AC, Degraive W, Brandão A. 2005. Minicircle organization and diversity in *Trypanosoma cruzi* populations. *Trends Parasitol.* 21(6):270-2.
- Kato H, Uezato H, Katakura K, Calvopiña M, Marco JD, et al. 2005. Detection and identification of *Leishmania* species within naturally infected sand flies in the Andean areas of Ecuador by a polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg.* 72(1):87-93.
- Kassahun A, Sadlova J, Benda P, Kostalova T, Warburgd A, et al. 2015. Natural Infection of Bats with *Leishmania* in Ethiopia. *Acta Trop.* 150, 166-170.
- Kendall G, Wilderspin AF, Ashall F, Miles MA, Kelly JM. 1990. *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase does not conform to the 'hotspot' topogenic signal model. *EMBO J.* (9):2751-8.
- Keen R, Hitchcock HB. 1980. Survival and longevity of the little brown bat (*Myotis lucifugus*) in southeastern Ontario. *J. Mammal.* 61:1-7.
- Keenan CM, Hendricks LD, Lightner L, Webster HK, Johnson AJ. 1984. Visceral leishmaniasis in the German shepherd dog. Infection, clinical disease, and clinical pathology. *Vet. Pathol.* 21:74-79.
- Kim GR, Lee YT, Park CH. 1994. A new natural reservoir of hantavirus: isolation of hantaviruses from lung tissues of bats. *Arch Virol.* 134(1-2):85-95.
- Klite PD. 1965. Isolation of *Salmonella* from a neotropical bat. *J. Bacteriol.* 90, 831.
- Kobayashi Y, Sato G, Shoji Y, Sato T, Itou T, et al. 2005. Molecular epidemiological analysis of bat rabies viruses in Brazil. *J Vet Med Sci.* 67:647-52.
- Koltas IS, Eroglu F, Uzun S, Alabaz D. 2016. A comparative analysis of different molecular targets using PCR for diagnosis of Old World Leishmaniasis, *Experimental Parasitology*. doi: 10.1016/j.exppara.2016.02.007.
- Köppen W. 1936. Das geographische System der Klimate, p. 1-44. In: KÖPPEN, W. e GEIGER, W. (Eds.), *Handbuch der Klimatologie*, vol. I, Tiel C. 394p.

- Koopman KF. 1993. Order Chiroptera, p. 137-241. In: D.L. Wilson & D.M. Reeder (Eds). *Mammal's species of the world. A taxonomic and geographic reference*. Washington, D.C, Smithsonian Institution Press, 2nd ed., 1206p.
- Kompalic-Cristo A, Frotta C, Suárez-Mutis M, Fernandes O, Britto C. 2007. Evaluation of a real-time PCR assay based on the repetitive B1 gene for the detection of *Toxoplasma gondii* in human peripheral blood. *Parasitol Res.* 101(3):619-25.
- Korbie DJ, Mattick JS. 2008. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity. *Nat Protoc.* 3:1452-1456.
- Kotait I, Nogueira Filho VS, Souza MCAM, Carrieri ML, Gomes MN, et al. 2010. Manual de controle da raiva dos herbívoros. 9ed. São Paulo/SP: Instituto Pasteur.
- Kostygov AY, Grybchuk-Ieremenko A, Malysheva MN, Frolov AO, Yurchenko V. 2014. Molecular revision of the genus *Wallaceina*. *Protist.* 165(5):594–604.
- Kostygov AY, Dobáková E, Grybchuk-Ieremenko A, Váhala D, Maslov DA, et al. 2016. Novel Trypanosomatid-Bacterium Association: Endosymbiosis in Action. *MBio.* 15;7(2):e01985.
- Kuhls K, Alam MZ, Cupolillo E, Ferreira GEM, Mauricio IL, et al. 2011. Comparative Microsatellite Typing of New World *Leishmania infantum* Reveals Low Heterogeneity among Populations and Its Recent Old World Origin. *PLoS Negl Trop Dis.* 5(6): e1155.
- Kunz TH, Pierson ED. 1994. Bats of the World: An introduction. Pp. 1-46. In: Walker's Bats of the World (by R.W. Nowak). Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Kuzmin IV, Bozick B, Guagliardo SA, Kunkel R, Shak JR, et al. 2011. Bats, emerging infectious diseases, and the rabies paradigm revisited. *Emerging Health Threats Journal.* 4:7159.
- Lainson R, Shaw JJ. 1987. Evolution classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R, editores. *The Leishmaniases in Biology and Medicine*. 1st ed. London: Academic Press, pp. 1-120.
- Lampo M, Feliciangeli MD, Márquez LM, Bastidas C, Lau P. 2000. A possible role of bats as a blood source for the *Leishmania vector Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Am J Trop Med Hyg.* 62(6):718-719.
- Langkjaer RB, Vigre H, Enemark HL, Maddox-Hyttel C. 2007. Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from pigs and cattle in Denmark. *Parasitology.* 134, 339–350.
- Langoni H, Lima K, Menozzi BD, Silva RC. 2005. Rabies in the big fruit-eating bat *Artibeus lituratus* from Botucatu, Southeastern Brazil. *J Venom Anim Toxins Trop Dis.* 11:84-7.
- Lau SK, Woo PC, Li KS, Huang Y, Tsoi HW, et al. 2005. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102:14040-14045.
- Laval RK, Fitch HS. 1977. Structure, movements and reproduction in three Costa Rican bats communities. *Occasional Papers of Museum of Natural History*. Lawrence, v.69, p.1-28, 1977.
- Leal ESB, Ramalho DF, Silva DQ, Miller BG, Carvalho PJB. 2013. Morcegos (Chiroptera) do Estado da Paraíba, nordeste do Brasil: distribuição e disponibilidade de material testemunho em coleções com base em trabalhos publicados e citações na chamada "literatura cinza". *Revista Brasileira de Zoociências* 15(1, 2, 3): 27-68.
- Lee MGS, Atkinson BL, Giannini SH, Van der Ploeg LHT. 1988. Structure and expression of the hsp70 gene family of *Leishmania major*. *Nucleic Acids Research.* 16, 9567–9585.
- Lee EJ, Kim EJ, Shin YK, Song JY. 2016. Design and testing of multiplex RT-PCR primers for the rapid detection of influenza A virus genomic segments: Application to equine influenza virus. *Journal of Virological Methods.* 228:114–122.

- Lei M, Dong D. 2016. Phylogenomic analyses of bat subordinal relationships based on transcriptome data. *Nature Publishing Group*. 1–8.
- Leite AC; Ambrozini ARP, Castilho M, Vieira PC; Fernandes JB. 2009. Screening of *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase enzyme inhibitors. *Rev. Bras. Farmacogn.* 19(1):1-6.
- Lent H, Wygodzinsky P. 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bull Am Mus Nat Hist.* 163: 123–520.
- Leroy EM, Kumulungui B, Pourrut X, Rouquet P, Hassanin A, et al. 2005. Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature.* 438: 575–576.
- Lewis SE, Wilson DE. 1987. *Vampyressa pusilla*. *Mammalian Species.* 292:1-5.
- Li W, Shi Z, Yu M, Ren W, Smith C, et al. 2005. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science.* 310: 676–679.
- Liarte DB, Murta SM, Steindel M, Romanha AJ. 2009. *Trypanosoma cruzi*: multiplex PCR to detect and classify strains according to groups I and II. *Exp Parasitol.* 123(4):283-91.
- Lim BK, Pedro WA, Passoa FC. 2003. Differentiation and species status of the Neotropical yellow-eared bats *Vampyressa pusilla* and *V. thyone* (Phyllostomidae) with a molecular phylogeny and review of the genus. *Acta Chiropterologica.* 5(1):15-29.
- Lima FE, Campos DS, Kunert Filho HC, Batista HB, Carnielli P, et al. 2013. Detection of Alphacoronavirus in velvety free-tailed bats (*Molossus molossus*) and Brazilian free-tailed bats (*Tadarida brasiliensis*) from urban area of Southern Brazil. *Virus Genes.* 47(1):164–7.
- Lima FE, Cibulski SP, Elesbao F, Carnieli Junior P, Batista HB, et al. 2013. First detection of adenovirus in the vampire bat (*Desmodus rotundus*) in Brazil. *Virus Genes.* 47(2):378-81.
- Lima L. 2011. Diversidade morfológica, biológica e genética, e relações filogenéticas de tripanossomas de morcegos do Brasil e Moçambique (África). Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.
- Lima L, Silva FM, Neves L, Attias M, Takata CS, et al. 2012. Evolutionary Insights from Bat Trypanosomes: Morphological, Developmental and Phylogenetic Evidence of a New Species, *Trypanosoma (Schizotrypanum) erneyi* sp. nov., in African Bats Closely Related to *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and Allied Species. *Protist.* 163(6):856-872.
- Lima L, Espinosa-Álvarez O, Hamilton PB, Neves L, Takata CS, et al. 2013. *Trypanosoma livingstonei*: a new species from African bats supports the bat seeding hypothesis for the *Trypanosoma cruzi* clade. *Parasit Vectors.* 6(1):221.
- Lima L, Espinosa-Álvarez O, Pinto CM, Cavazzana M Jr, Pavan AC, et al. 2015. New insights into the evolution of the *Trypanosoma cruzi* clade provided by a new trypanosome species tightly linked to Neotropical Pteronotus bats and related to an Australian lineage of trypanosomes. *Parasit Vectors.* 23;8:657.
- Lima JT, Gennari SM, Soares HS, Minervino AH, Malheiros AF, et al. 2017. Serodiagnosis of visceral and cutaneous leishmaniasis in human and canine populations living in Indigenous Reserves in the Brazilian Amazon Region. *Rev Soc Bras Med Trop.* 50(1):61-66.
- Linares OJ. 1968. Quirópteros subfósiles encontrados en las cuevas Venezolanas. Parte I. depósito de la cueva de quebrada honda (designación de catastro Ar-1) Boletín de la Sociedad Venezolana De Espeleología 1:119-145
- Lindquist S, Craig EA. 1988. The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet.* 22: 631–677.

- Lisboa CV, Pinho AN, Herrera HM, Gerhardt M, Cupolillo E, et al. 2008. *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) genotypes in neotropical bats in Brazil. *Veterinary parasitology*. 156:314-318.
- Lopes CMT. 2014. Nova espécie de *Trypanosoma* isolada de *Didelphis aurita* na Mata Atlântica do Rio de Janeiro: caracterização biológica e molecular. Dissertação de Mestrado, Instituto Oswaldo Cruz.
- Lopes EG, Geraldo Junior CA, Marcili A, Silva RD, Keid LB, et al. 2016. Performance of conventional PCRs based on primers directed to nuclear and mitochondrial genes for the detection and identification of *Leishmania* spp. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 58:41.
- Lopez M, Inga R, Cangalaya M, Echevarria J, Llanos-Cuentas A, et al. 1993. Diagnosis of *Leishmania* using the polymerase chain reaction: a simplified procedure for field work. *Am J Trop Med Hyg*. 49: 348-356.
- Lord JS, Parker S, Parker F, Brooks D. 2012. Gastrointestinal helminths of pipistrelle bats (*Pipistrellus pipistrellus/Pipistrellus pygmaeus*) (Chiroptera: Vespertilionidae) of England. *Parasitology*. 139:366–374
- Lourenço, JLM. 2016. Ocorrência de tripanosomatídeos em morcegos (Mammalia: Chiroptera) no Distrito Federal, Brasil. Dissertação de mestrado. Universidade de Brasília.
- Lucena-Filho ML. 2015. Ecoepidemiologia de *Triatoma brasiliensis* nos estados da Paraíba e Rio Grande do Norte: indicadores entomológicos e estruturas ecotípica e composicional etária. Dissertação de Mestrado, Centro de Ciências Aplicadas e Educação, Universidade Federal da Paraíba.
- Lukes J, Guilbride DL, Votýpka J, Zíková A, Benne R, Englund PT. 2002. Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure. *Eukaryot Cell*. 1(4):495-502.
- Lukes J, Maurício IL, Schonian G, Dujardin JC, Soteriadou K, et al. 2007. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 104(22):9375-80.
- Luyo-Acero GE, Uezato H, Oshiro M, Takei K, Kariya K, et al. 2004. Sequence variation of the cytochrome b gene of various human infecting members of the genus *Leishmania* and their phylogeny. *Parasitology*. 128:483–491.
- Lyra MR, Pimentel MIF, Madeira M de F, et al. 2015. First report of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in a urban area of Rio de Janeiro, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 57(5):451-454.
- Maeda MH, Knox MB, Gurgel-Gonçalves R. 2012. Occurrence of synanthropic triatomines (Hemiptera: Reduviidae) in the Federal District, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 45(1): 71-76.
- Maia da Silva F, Lima L, Cavazzana Jr M, Ortiz PA, Campaner M, et al. 2009. *Trypanosoma rangeli* isolates of bats from Central Brazil: Genotyping and phylogenetic analysis enable description of a new lineage using spliced-leader gene sequences. *Acta Tropica*. 109(3):199–207.
- Maia da Silva F, Marcili A, Ortiz PA, Epiphanyo S, Campaner M, et al. 2010. Phylogenetic, morphological and behavioural analyses support host switching of *Trypanosoma (Herpetosoma) lewisi* from domestic rats to primates. *Infect Genet Evol*. 10(4):522-9. doi: 10.1016/j.meegid.2010.02.005.
- Maia da Silva F, Noyes H, Campaner M, Junqueira ACV, Coura JR. 2004. Phylogeny, taxonomy and grouping of *Trypanosoma rangeli* isolates from man, triatomines and sylvatic mammals from widespread geographical origin based on SSU and ITS ribosomal sequences. *Parasitology*. 129, 549–561.

- Mantilla-Meluk H, Baker RJ. 2008. Systematics of small Anoura (Chiroptera: Phyllostomidae) from Colombia, with description of a new species. *Occasional Papers, Museum of Texas Tech* 261: 1-18.
- Mantilla-Meluk H; Jiménez-Ortega J, Baker RJ. 2009. Phyllostomid bats of Colombia: Annotated checklist, distribution, and biogeography. *Special Publications Museum of Texas Tech University* 56: 1-34.
- Marcondes CB, Conceição MB, Portes MG, Simão BP. 2005. Phlebotomine sandflies in a focus of dermal leishmaniasis in the eastern region of the Brazilian State of Santa Catarina: preliminary results (Diptera: Psychodidae). *Rev Soc Bras Med Trop.* 38(4): 353-355.
- Marcondes CB, Bittencourt IA, Stoco PH, Eger I, Grisard EC, et al. 2009. Natural infection of *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) by *Leishmania (Viannia)* spp. in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 103(11):1093-1097.
- Marcili A, Lima L, Cavazzana M, Junqueira AC, Veludo HH, et al. 2009. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. *Parasitology.* 136(6):641-655.
- Marcili A, da Costa AP, Soares HS, Acosta Ida C, de Lima JT, et al. 2013. Isolation and phylogenetic relationships of bat trypanosomes from different biomes in Mato Grosso, Brazil. *J Parasitol.* 99(6):1071-1076.
- Marcili A, Sperança M, da Costa AP, Madeira F, Soares HH. 2014. Phylogenetic relationships of *Leishmania* species based on trypanosomatid barcode (SSU rDNA) and gGAPDH genes: Taxonomic revision of *Leishmania (L.) infantum chagasi* in South America. *Infection, Genetics and Evolution.* 25:44–51.
- Mares MA, Willig MR, Streilein KE, Lacher TE. 1981. The mammals of northeastern Brazil: a preliminary assessment. *Annals of Carnegie Museum* 50:81–137.
- Maresca B, Carratu L. 1992. The biology of the heat shock response in parasites. *Parasitol Today.* 8: 260–266.
- Marfurt J, Niederwiese I, Divine M, Beck H, Felger I. 2003. Diag-nostic genotyping of old and new world *Leishmania* species by PCR-RFLP. *Diag Microbiol Infect Dis.* 46:115-124.
- Maria V, Losurdo M, Lucente MS, Lorusso E, Elia G, et al. 2016. Multiplex real-time RT-PCR assay for bovine viral diarrhoea virus type 1, type 2 and HoBi-like pestivirus. *Journal of Virological Methods.* 229:1–7.
- Marinho-Filho J, Sazima I. 1998. Brazilian bats and conservation biology: a first survey. In *Bat biology and conservation* (T.H. Kunz & P.A. Racey, eds). Smithsonian Institution, Washington, DC, p.282-294.
- Marinkelle CJ. 1966. Observations on human, monkey and bat trypanosomes and their vectors in Colombia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 60, 109–116.
- Marinkelle CJ. 1976. Biology of the trypanosomes of bats. In *Biology of the Kinetoplastida, Vol 1*, (ed. Lumsden, W. H. R. and Evans, D. A.), pp. 175–216. Academic Press, London, UK.
- Marlow MA, da Silva Mattos M, Makowiecky ME, Eger I, Rossetto AL, et al. 2012. Divergent profile of emerging cutaneous leishmaniasis in subtropical Brazil: new endemic areas in the southern frontier. *PLoS One.* 8(2):e56177.
- Martinković F, Matanović K, Rodrigues AC, Garcia HA, Teixeira MM. 2012. *Trypanosoma (Megatrypanum) melophagium* in the sheep ked *Melophagus ovinus* from organic farms in Croatia: phylogenetic inferences support restriction to sheep and sheep keds and

- close relationship with trypanosomes from other ruminant species. *J Eukaryot Microbiol.* 59(2):134-44.
- Martorelli LFA, Almeida MF, Aguiar EAC, Silva MMS, Novaes ECR. 1995. Isolamento do vírus rábico de morcego insetívoro *Myotis nigricans*. *Rev Saúde Públ.* 29:140-141.
- Martorelli LFA, Aguiar EAC, Almeida MF, Silva MMS, Nunes VFP. 1996. Isolamento do vírus rábico de morcego insetívoro *Lasiurus borealis*. *Rev Saúde Públ.* 30:101-2.
- Martorelli LFA, Almeida MF, Aguiar EAC, Silva MMS, Durigon EL. 2002. Rabies in a bat colony of *Histiotus velatus*, São Paulo City, Brazil. In: 13th International Meeting on Research Advances and Rabies Control in the Americas, Ooxaca. 60-61.
- Martorelli LFA, Kataoka APAG, Almeida MF, Trezza-Netto J, Sodr  MM, et al. 2009. Antigenic characterization of rabies virus isolated in bats from cities of São Paulo state, Brazil during 1988 to 2009. In: International Meeting on Research Advances and Rabies Control in the Americas, Quebec.
- Mary C, Faraut F, Lascombe L, Dumon H. 2004. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a realtime PCR assay with high sensitivity. *J Clin Microbiol.* 42(11):5249-55.
- Marzochi MC. 2016. Editorial Visceral leishmaniasis in Southern Rio Janeiro State and the risk of propagation to São Paulo State, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 49(2): 147–149.
- Maslov DA, Yurchenko VY, Jirku M, Lukes J. 2010. Two new species of trypanosomatid parasites isolated from Heteroptera in Costa Rica. *J Eukaryot Microbiol.* 57(2):177-88.
- McAuliffe GN, Anderson TP, Stevens M, Adams J, Coleman R. 2013. Systematic application of multiplex PCR enhances the detection of bacteria, parasites, and viruses in stool samples. *Journal of Infection.* 67, 122e129.
- Massunaga P, Carrieri ML, Favoretto SR, Paranayba K, Kotait I. 2003. Rabies in insectivorous bats in urban area of Brasilia, DF. In: 14th National Meeting of Virology, Florianópolis.
- Mauricio IL, Stothard JR, Miles MA. 2000. The strange case of *Leishmania chagasi*. *Parasitol Today.* 16: 188-189.
- Mauricio IL, Yeo M, Baghaei M, Doto D, Pratlong F, et al. 2006. Towards multilocus sequence typing of the *Leishmania donovani* complex: resolving genotypes and haplotypes for five polymorphic metabolic enzymes (ASAT, GPI, NH1, NH2, PGD). *Int J Parasitol.* 36: 757-769.
- Medellín RA, Equihua M, Amin MA. 2000. Bat diversity and abundance as indicators of disturbance in neotropical rainforests. *Conservation Biology.* 14:1666-1675
- Medina A, Harvey CA, MerloDS, V lchez S. 2007. Bat diversity and movement in an agricultural landscape in Matigu s, Nicaragua. *Biotropica.* 39(1):120-128.
- Mehle A. 2014. Unusual Influenza A Viruses in Bats. *Viruses.* 6(9): 3438–3449.
- Menezes Jr LF, Duarte AC, Novaes RLM. 2008. Deslocamento de *Artibeus lituratus* (Olfers, 1818) (Mammalia, Chiroptera) entre ilha e continente no Estado do Rio de Janeiro, Brasil.
- Menzel W, Jelkmann W, Maiss E. 2002. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. *Journal of Virological Methods.* 99:81-92.
- Merzlyak E, Yurchenko V, Kolesnikov AA, Alexandrov K, Podlipaev SA, et al. 2001. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids based on small subunit rRNA genes: polyphyly of *Leptomonas* and *Blastocrithidia*. *J Eukaryot Microbiol.* 48(2):161–169.
- Metzdorf IP, da Costa Lima MS, Cepa Matos MF, de Souza Filho AF, de Souza Tsujisaki RA, et al. 2017. Molecular characterization of *Leishmania infantum* in domestic cats in a region of Brazil endemic for human and canine visceral leishmaniasis. *Acta Trop.* 166:121-125. doi: 10.1016/j.actatropica.2016.11.013.

- Meyer-Siegler K, Mauro DJ, Seal G, Wurzer J, Deriel JK, Sirover MA. A human nuclear uracil DNA glycosylase is the 37-kDa subunit of glyceraldehydes - 3 - phosphate dehydrogenase. *P Natl Acad Sci USA*. 1991; 88: 8460-8464.
- Michels PA, Poliszczak A, Osinga KA, Misset O, Van Beeumen J, et al. 1986. Two tandemly linked identical genes code for the glycosomal glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase in *Trypanosoma brucei*. *EMBO J*. 5(5):1049-56.
- Michels PA, Hannaert V, Bringaud F. 2000. Metabolic aspects of glycosomes in trypanosomatidae - new data and views. *Parasitol Today*. 16(11):482-9.
- Ministério da Saúde, 2013. *Rev Patol Trop Vol*. 42 (4): 475-478. Nota técnica disponível no site: http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2013/Nov/18/Informe_Diagnostico_DC_NUCOM_2_.pdf e publicada com autorização da Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis, Ministério da Saúde.
- Miranda JMD, Bernardi IP, Passos FC. 2006. A new species of *Eptesicus* (Mammalia: Chiroptera: Vespertilionidae) from the Atlantic Forest, Brazil. *Zootaxa*. 1383: 57-68.
- Molyneaux DH, Stiles JK. 1991. Trypanosomatid vector interactions. *Annales de la Société belge de médecine tropicale*. 71(1):151-166.
- Montalvo AM, Nodarse JF, Goodridge IM, Fidalgo LM, Marin M, et al. 2010. Differentiation of *Leishmania* (*Viannia*) *panamensis* and *Leishmania* (*V.*) *guyanensis* using Bccl for hsp70 PCR-RFLP. *Tran R Soc Trop Med Hyg*. 104(5):364-367.
- Moras LM, Milagres A, Tavares VC. 2015. Distribution and taxonomy of the common big-eared bat *Micronycteris microtis* (Chiroptera: Phyllostomidae) in South America. *Mammalia*. 79(4): 439-447.
- Moratelli R, Wilson DE. 2013. Distribution and natural history of *Myotis lavalii* (Chiroptera, Vespertilionidae). *Journal of Mammalogy*. 94(3):650-656.
- Moratelli R, Calisher CH. 2015. Bats and zoonotic viruses: can we confidently link bats with emerging deadly viruses? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 110(1):1-22.
- Moreira D, Lopez-Garcia, P, Vickerman, K. 2004. An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. *Int J Syst Evol Microbiol*. 54: 1861-1875.
- Morrison AC, Ferro C, Morales A, Tesh RB, Wilson ML. 1993. Dispersal of the sand fly *Lutzomya longipalpis* (Diptera: Psychodidae) at an endemic focus of visceral leishmaniasis in Colombia. *Journal of Medicine and Entomology*. 30:427-435.
- Morsy TA, Salama MMI, Abdel Hamid MY. 1987. Detection of *Leishmania* antibodies in bats. *J Egypt Soc Parasitol*. 17: 797-798.
- Mühldorfer K. 2013. Bats and Bacterial Pathogens: A Review. 60(1):93-103
- Müller N, Zimmermann V, Forster U, Bienz M, Gottstein B, Welle M. 2003. PCR-based detection of canine *Leishmania* infections in formalin-fixed and paraffin-embedded skin biopsies: elaboration of a protocol for quality assessment of the diagnostic amplification reaction. *Vet Parasitol*. 114(3):223-9.
- Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. 2005. Advances in leishmaniasis. *Lancet*. 366:1561-1577.
- Mutinga MJ. 1975. The animal reservoir of cutaneous leishmaniasis on Mount Elgon, Kenya. *East Afr Med J*. 52: 142-151.
- Myers P, White R, Stallings J. 1983. Additional records of bats from Paraguay. *Journal of Mammalogy*. 64(1):143-145.
- Myskova J, Svobodova M, Beverley SM, Volf P. 2007. A lipophosphoglycan-independent development of *Leishmania* in permissive sand flies. *Microbes Infect*. 9:317-324.

- Nasereddin A, Jaffe CL. 2010. Rapid diagnosis of Old World Leishmaniasis by high-resolution melting analysis of the 7SL RNA gene. *J Clin Microbiol.* 48(6):2240-2.
- Neitzke-Abreu HC, Reinhold-Castro KR, Venazzi MS, Scodro RB, Dias Ade C, Silveira TG, et al. 2014. Detection of *Leishmania (Viannia)* IN *Nyssomyia neivai* and *Nyssomyia whitmani* by multiplex polymerase chain reaction, in Southern Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 56: 391-395.
- Nogueira MR, Dias D, Peracchi AL. 2007. Subfamília Glossophaginae. In *Morcegos do Brasil* (N.R. Reis, A.L. Peracchi, W.A. Pedro & I.P. Lima, eds). Nelio R. dos Reis, Londrina, p.45-60.
- Nogueira MR, Lima IP, Peracchi AL, Simmons NB. 2012. New Genus and Species of Nectar-Feeding Bat from the Atlantic Forest of Southeastern Brazil (Chiroptera: Phyllostomidae: Glossophaginae). *American Museum Novitates* 3747: 1-30.
- Nogueira MR, de Lima IP, Moratelli R, Tavares VC, Gregorin R, et al. 2014. Checklist of Brazilian bats, with comments on original records. *Check List.* 10(4): 808-821, doi:<http://dx.doi.org/10.15560/10.4.808>.
- Nordstorm JL, Vickery MC, Blackstone GM, Murray SL, De Paola A. 2007. Development of a multiplex real-time PCR assay with an internal amplification control for the detection of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters. *Appl Environ Microbiol.* 73(18):5840-7.
- Nowak MR. 1991. Walker's Mammals of the World. 5th ed. The Johns Hopkins Press Ltd, London:642 p.
- Noyes HA, Arana B, Chance ML, Maingon R. 1997. The *Leishmania hertigi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) complex and the lizard *Leishmania*: Their classification and evidence for a neotropical origin of the *Leishmania-Endotrypanum* clade. *J Euk Microbiol.* 44:511-517.
- Noyes HA, Chance ML, Croan DG, Ellis JT. 1998. *Leishmania (Sauroleishmania)*: A Comment on Classification. [http://dx.doi.org/10.1016/S0169-4758\(97\)01196-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0169-4758(97)01196-4).
- Noyes HA, Stevens JR, Teixeira M, Phelan J, Holz P. 1999. A nested PCR for the *ssrRNA* gene detects *Trypanosoma binneyi* in the platypus and *Trypanosoma* sp. in wombats and kangaroos in Australia. *Int J Parasitol.* 29(2):331-9.
- Nunes HLFL, Feijó JA, Beltrão M, Lopez LCS, Fracasso MPA. 2013. First and easternmost record of *Molossops temminckii* (Burmeister, 1854) (Chiroptera: Molossidae) for the state of Paraíba, northeastern Brazil. *Check List.* 9 (2):436-439.
- Oliveira-Filho AT, de Carvalho DA. 1993. Florística e fisionomia da vegetação no extremo norte do litoral da Paraíba. *Revista Brasileira de Botânica, São Paulo,* 16 (1): 115-130.
- Oliveira JA, Gonçalves PR, Bonvicino CR. 2003. Mamíferos da caatinga. Pp. 275–334 in *Ecologia e conservação da caatinga* (I. R. Leal, J. M. C. Silva, and M. Tabarelli, eds.). EDUFPE, Recife, Brazil.
- Oliveira MP, Cortez M, Maeda FY, Fernandes MC, Haapalainen EF, et al. 2009. Unique behavior of *Trypanosoma dionisii* interacting with mammalian cells: invasion, intracellular growth, and nuclear localization. *Acta Trop.* 110(1):65-74.
- Oliveira MPC, Ramosa TC, Pinheiro AMVN, Bertini S, Takahashi HK, et al. 2013. Tridimensional ultrastructure and glycolipid pattern studies of *Trypanosoma dionisii*. *Acta Tropica.* 128(3):548–556.
- Oliveira AM, Vieira CP, Dibo MR, Guirado MM, Rodas LA, et al. 2016. Dispersal of *Lutzomyia longipalpis* and expansion of canine and human visceral leishmaniasis in São Paulo State, Brazil. *Acta Trop.* 164:233-242.

- Oprea M, Mendes P, Vieira TB, Ditchfield AD. 2009. Do wooded streets provide connectivity for bats in an urban landscape? *Biodiversity and Conservation* 18:2361-2371.
- Ortega J, Alarcón DI. 2008. *Anoura geoffroyi* (Chiroptera: Phyllostomidae). *J. Mamm.* 818:1-7.
- Ozensoy S, Ozbel Y, Turgay N et al. 1998. Serodiagnosis and epidemiology of visceral leishmaniasis in Turkey. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 59, 363–369.
- Owen RD. 1987. Phylogenetic analyses of the bat subfamily Sternodermatinae (Mammalia: Chiroptera). *Spec. Pub., Mus. Texas Tech. Univ.* 26, 1–65.
- Owen RD. 1991. The systematic status of *Dermanura concolor* (Peters, 1865) (Chiroptera: Phyllostomidae), with description of a new genus. *B. Am. Mus. Nat. Hist.* 206, 18–25.
- Pacheco RS, Fernandes O, Salinas G, Segura I, Momen H, et al. 2000. Intraspecific heterogeneity in the mini-xon gene localization of *Leishmania (V.) panamensis* and *Leishmania (V.) guyanensis* from Colombia. *J Parasitol.* 86: 1250-1253.
- Pacheco SM, Sodré M, Gama AR, Bredt A, Cavallini-Sanches EM, et al. 2010. Morcegos urbanos: status do conhecimento e plano de ação para a conservação no Brasil. *Chiroptera Neotropical.* 16(1): 630–647.
- Páez A, Núñez C, García C, Bóshell J. 2003; Molecular epidemiology of rabies epizootics in Colombia: evidence for human and dog rabies associated with bats. *J Gen Virol.* 84:795-802.
- Paglia AP, Fonseca GAB, Rylands AB, Herrmann G, Aguiar LMS, et al. 2011. Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil / Annotated Checklist of Brazilian Mammals. 2ª Versão Atualizada/2nd Edition. Occasional Papers in Conservation Biology 6. Conservation International, Arlington, VA. 75pp.
- Paiva-Cavalcanti M, Felinto de Brito ME, de Souza WV, de Miranda Gomes Y, Abath FC. 2009. The development of a real-time PCR assay for the quantification of *Leishmania infantum* DNA in canine blood. *Vet J.* 182(2):356-358.
- Paiva-Cavalcanti M, Régis-da-Silva CG, Gomes YM. 2010. Comparison of real-time PCR and conventional PCR for detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection: a mini-review. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 16: 537-542.
- Passos EC, Carrieri ML, Dainovskas E, Camara M, Silva MMS. 1998. Isolamento do vírus rábico em morcego insetívoro *Nyctinomops macrotis*, no município de Diadema, SP (Brasil). *Rev Saúde Públ.* 32:74-6.
- Passos JG, Passamani M. 2003. *Artibeus lituratus* (Chiroptera, Phyllostomidae): biologia e dispersão de sementes no Parque do Museu de Biologia Prof. Mello Leitão, Santa Teresa (ES). *Natureza on line.* 1(1):1-6.
- Pavão F, Castilho MS, Pupo MT, Dias RLA, Correa AG, et al. 2002. Structure of *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complexed with chalepin, a natural product inhibitor, at 1.95 Å resolution. *FEBS Lett* 520: 13-17.
- Peacock CS, Seeger K, Harris D, et al. 2007. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nature genetics.* 39:839-47.
- Pedro WA, Carvalho C, Hayashi MM, Bredt A, Arnani NMS, et al. 1997. Notes on *Vampyressa pusilla* (Wagner, 1843) in the south of São Paulo State. *Chiroptera Neotropical.* 3(2):79-80.
- Pedro WA, Passos FC, Lim Bk. 2001. Morcegos (Chiroptera; Mammalia) da Estação Ecológica dos Caetetus, Estado de São Paulo. *Chiroptera Neotropical.* 7(1-2):136-140.
- Peracchi AL, Lima IP, Reis NR, Nogueira MR, Filho HO. 2011. Ordem Chiroptera. In Mamíferos do Brasil (N.R. Reis, A.L. Peracchi, W.A. Pedro & I.P. Lima, eds). 2 ed. Nélio R. dos Reis, Londrina, p.155-234.

- Pereira Ede F, Thomaz-Soccol V, Lima HC, Thomaz-Soccol A, de Castro EA, et al. 2008. Molecular diagnosis of leishmaniosis in the Paraná state of southern Brazil. *Exp Dermatol.* 17(12):1024-30.
- Pereira, Michael Douglas Barbosa. As chuvas na cidade de João Pessoa: uma abordagem genética / Michael Douglas Barbosa Pereira.- João Pessoa, 2014.
- Perini FA, Tavares VC, Nascimento CMD. 2003. Bats from the city of Belo Horizonte, Minas Gerais, Southeastern Brazil. *Chiropt. Neotrop.* 9:1-2.
- Peterson AT, Shaw J. 2003. *Lutzomyia* vectors for cutaneous leishmaniasis in Southern Brazil: ecological niche models, predicted geographic distributions, and climate change effects. *International Journal for Parasitology.* 33:919–931.
- Piarroux R, Azaiez R, Lossi AM, Reynier P, Muscatelli F, et al. 1993. Isolation and characterization of a repetitive DNA sequence from *Leishmania infantum*: development of a visceral leishmaniasis polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg.* 49: 364–369.
- Pimentel CFR. 2012. Herança de sequências de minicírculos de kDNA integradas no genoma de células germinativas com persistência de nDNA de *Trypanosoma cruzi*. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília.
- Pinheiro, MC, Ribeiro CCDU, Lourenço EC, Landulfo GA, Luz HR, et al. 2013. Levantamento de enteroparasitos em morcegos através de técnica de centrífugo flutuação (Mammalia: Chiroptera) em área de Floresta Tropical. *Neotropical Helminthology.* 7(1)143-147.
- Pinto CM, Kalko EK, Cottontail I, Wellinghausen N, Cottontail VM. 2012. TcBat a bat-exclusive lineage of *Trypanosoma cruzi* in the Panama Canal Zone, with comments on its classification and the use of the 18S rRNA gene for lineage identification. *Infect Genet Evol.* 12(6):1328-32.
- Pinto CM, Ocaña-Mayorga S, Tapia EE, Lobos SE, Zurita AP, Aguirre-Villacís F, et al. 2015. Bats, Trypanosomes, and Triatomines in Ecuador: New Insights into the Diversity, Transmission, and Origins of *Trypanosoma cruzi* and Chagas Disease. *PLoS ONE* 10(10): e0139999.
- Pires DPS, Fábian ME. 2013. Diversidade, riqueza e estratificação vertical de espécies de morcegos em um remanescente de Mata Atlântica no Sul do Brasil. *Biotemas.* 26 (4):121-131.
- Pires AS, Borges AF, Cappellazzo A, Dorta ML, Lino Junior R de S. 2015. Identification and Biological Characterization of *Leishmania (Viannia) guyanensis* Isolated from a Patient with Tegumentary Leishmaniasis in Goiás, a Nonendemic Area for This Species in Brazil. *Biomed Res Int.* 350764. doi: 10.1155/2015/350764. Epub 2015
- Pires AS, Borges AF, Cappellazzo CA, Dorta ML, Lino Jr RS, et al. 2015. Identification and Biological Characterization of *Leishmania (Viannia) guyanensis* isolated from a Patient with Tegumentary Leishmaniasis in Goiás, a Nonendemic Area for This Species in Brazil. *BioMed Research International.* 350764. doi:10.1155/2015/350764
- Pita-Pereira D, Alves CR, Souza MB, Brazil RP, Bertho A, et al. 2005. Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridization assay. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 99: 905-13.
- Plano de Manejo do Parque Nacional da Serra dos Órgãos. (acesso em 01/05/2017) www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/imgs/unidadescoservacao/pm_parna_serra_or_gaos_1.pdf

- Plowright RK, Field HE, Smith C, Divljan A, Palmer C, et al. 2008. Reproduction and nutritional stress are risk factors for Hendra virus infection in little red flying foxes (*Pteropus scapulatus*). *Proc Biol Sci.* 275: 861–869.
- Podlipaev S. 2001. The more insect trypanosomatids under study the more diverse Trypanosomatidae appears. *Int J Parasitol.* 31:648-652.
- Podtiaguin B. 1944 - Contribuciones al Conocimiento de los Murciélagos del Paraguay - Revista de la Sociedad Científica del Paraguay 6: p25-62.
- Poinar GO, Mastalerz M: 2000. Taphonomy of fossilized resins: determining the biostratigraphy of amber. *Acta Geol Hisp.* 35: 171-182.
- Poinar, GO Jr, Poinar, R. 2004. *Paleoleishmania proterus* n. gen., n. sp. (Trypanosomatidae: Kinetoplastida) from Cretaceous Burmese amber. *Protist.* 155: 305–310.
- Poinar, GO Jr. 2007. Early Cretaceous trypanosomatids associated with fossil sand fly larvae in Burmese amber. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 102(5): 635-637.
- Pontes ES. 2015. Infecção por Tripanosomatídeos em pequenos mamíferos provenientes de áreas com distintos perfis de degradação ambiental no entorno do Maciço da Pedra Branca, Rio de Janeiro. Trabalho de conclusão de curso, Faculdades São José.
- Prates M, Gatto LCS, Costa MIP. 1981. Geomorfologia – Projeto RADAMBRASIL, Levantamento de recursos naturais. Rio de Janeiro, Ministério das Minas e Energia, vol. 23, p. 301-348
- Quan PL, Firth C, Conte JM, Williams SH, Zambrana-Torrel CM, et al. 2013. Bats are a major natural reservoir for hepaciviruses and pegiviruses. *Proc Natl Acad Sci USA.* 110:8194–8199.
- Queiroz LH, Carvalho C, Buso DS, Ferrari CIL, Pedro WA. 2009. Perfil epidemiológico da raiva na região Noroeste do Estado de São Paulo no período de 1993 a 2007. *Rev Soc Bras Med Trop.* 42:9-14.
- Quijada L, Soto M, Alonso C, Requena JM. 1997. Analysis of post-transcriptional regulation operating on transcription products of the tandemly linked *Leishmania infantum* hsp70 genes. *The Journal of Biological Chemistry.* 272, 4493–4499.
- Quinnel RJ, Dye C, Shaw JJ. 1992. Host preferences of the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* in Amazonian Brazil. *Medical and Veterinary Entomology.* 6:195-200
- Quintal AP, Ribeiro Ede S, Rodrigues FP, Rocha FS, Floeter-Winter LM et al. 2011. *Leishmania* spp. in *Didelphis albiventris* and *Micoureus paraguayanus* (Didelphimorphia: Didelphidae) of Brazil. *Vet Parasitol.* 176(2-3):112-119.
- Quispe-Tintaya KW, Laurent T, Decuyper S, Hide M, Banuls AL, et al. 2005. Fluorogenic assay for molecular typing of the *Leishmania donovani* complex: taxonomic and clinical applications. *J Infect Dis.* 192: 685-692.
- Rangel DA. 2017. Tripanosomatídeos em morcegos em áreas florestais com diferentes níveis de antropização na Mata Atlântica no Rio de Janeiro. Dissertação de Mestrado, Instituto Oswaldo Cruz.
- Ramirez JL, Guevara P. 1987. The ribosomal gene spacer as a tool for the taxonomy of *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol.* 22: 177-183.
- Ramírez CA, Requena JM, Puerta CJ. 2011. Identification of the HSP70-II gene in *Leishmania braziliensis* HSP70 locus: genomic organization and UTRs characterization. *Parasit Vectors.* 4: 166.
- Ramírez JD, Tapia-Calle G, Muñoz-Cruz G, Poveda C, Rendón LM, et al. 2014. Trypanosome species in neo-tropical bats: Biological, evolutionary and epidemiological implications. *Infect Genet Evol.* 22:250–256.

- Redondo RAF, Brina LPS, Silva RF, Ditchfield AD, Santos FR. 2008. Molecular systematics of the genus *Artibeus* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 49:44–58
- Reis NR, Peracchi AL. 1987. Quirópteros da região de Manaus, Amazonas, Brasil (Mammalia, Chiroptera). *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, Série Zoologia*, 3: 161-182.
- Reis NR, 2007. *Morcegos do Brasil*. Londrina, EDIFURB: 253 p.
- Riou G, Delain E. 1969. Electron microscopy of the circular kinetoplasmic DNA from *Trypanosoma cruzi*: occurrence of catenated forms. *Proc Natl Acad Sci USA*. 62:210-217.
- Rioux J, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P, et al. 1990. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann Parasitol Hum Comp*. 65:111-125.
- Rip D, Gouws PA. 2009. Development of an Internal Amplification Control Using Multiplex PCR for the Detection of *Listeria monocytogenes* in Food Products. *Food Anal. Methods*. 2:190–196.
- Rocha PA, Feijó JA, Mikalauskas JS, Ferrari SF. 2011. First record of mormoopidae bats (Chiroptera, Mormoopidae) from the Brazilian Atlantic Forest. *Mammalia* 75: 295-299.
- Rodgers MR, Popper SJ, Wirth DF. 1990. Amplification of Kinetoplast DNA as a Tool in the Detection and Diagnosis of *Leishmania*. *Exp Parasitol*. 71:267-275.
- Rodrigues AC, Garcia HA, Batista JS, Minervino AH, Góes-Cavalcante G, et al. 2010. Characterization of spliced leader genes of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri*: phylogeographical analysis of Brazilian isolates from cattle supports spatial clustering of genotypes and parity with ribosomal markers. *Parasitology*. 137(1):111-22.
- Rodríguez-Posada ME, Cárdenaz-González C. 2011. El Murciélago de Visera *Sphaeronycteris toxophyllum* Peters, 1882 (Chiroptera: Phyllostomidae) em Colombia. *Chiroptera Neotropical*. 18: 1115-122.
- Romero GA, Noronha EF, Pirmez C, Pires F do E, Fernandes O, et al. 2009. Sensitivity and reproducibility of a PCR assay for *Leishmania* detection using skin biopsy imprints on filter paper. *Acta Trop*. 109(1):74-7.
- Roque ALR. 2009. Avaliação do potencial de pequenos mamíferos e importância de animais domésticos na manutenção dos ciclos de transmissão de tripanosomatídeos: *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania infantum* e *Leishmania braziliensis*. Tese de Doutorado, Instituto Oswaldo Cruz.
- Roque ALR, Cupolillo E, Marchevsky RS, Jansen AM. 2010. *Thrichomys laurentius* (Rodentia; Echimyidae) as a Putative Reservoir of *Leishmania infantum* and *L. braziliensis*: Patterns of Experimental Infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 4(2): 1-8.
- Roque ALR, Jansen AM. 2014. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *Int J Parasitol Parasites Wildl*. 3(3):251-262.
- Rosário IN, Andrade AJ, Ligeiro R, Ishak R, Silva IM. 2016. Evaluating the Adaptation Process of Sandfly Fauna to Anthropized Environments in a Leishmaniasis Transmission Area in the Brazilian Amazon. *J Med Entomol*. 54(2):450-459.
- Rosin G, Landau I, Hugot J-P: 1978. Considérations sur le genre *Nycteria* (Haemoproteidae) parasite de Microchiroptères africains avec description de quatre espèces nouvelles. *Ann Parasitologie (Paris)*. 53: 447-459.
- Rotureau B. 2006. Ecology of the *Leishmania* species in the Guianan ecoregion complex. *Am J Trop Med Hyg*. 74(1): 81-96.

- Ruschi A. 1952. Morcegos do Estado do Espírito Santo; família Emballonuridae. Chave analítica para os gêneros, espécies e subespécies representadas no E. E. Santo. B Museu Biol Prof Mello Leitão Ser Zool. 10:1-19.
- Sachadyn P, Kur J. 1998. The construction and use of a PCR internal control. *Molecular and Cellular Probes*. 12(5):259-262.
- Sambrook J, Fritschi EF and Maniatis T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Sampaio E, Lim B, Peters S. 2016. *Dermanura cinerea*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T2124A22000480. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-2.RLTS.T2124A22000480.en>. Acesso em 24 de abril de 2017.
- Sangenis LHC, Lima SRA, Mello CX, Cardoso DT, Mello JN, et al. 2014. Expansion of visceral leishmaniasis in the state of Rio de Janeiro, Brazil: Report of the first autochthonous case in the municipality of Volta Redonda and the difficulty of diagnosis. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*. 56(3):271-274.
- Santos CP, Gibson DI. 2015. Checklist of the Helminth Parasites of South American Bats. *Zootaxa*. 3937(3):471-499.
- São Thiago PT, Guida U. 1990. Leishmaniose Tegumentar Americana no oeste do estado da Santa Catarina, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 23(4):201-203.
- Sant'anna MRV, Soares AC, Araujo RN, Gontijo NF, Pereira MH. 2016. Triatomines (Hemiptera, Reduviidae) blood intake: Physical constraints and biological adaptations. *Journal of Insect Physiology*. 97: 20–26.
- Savani ES, de Almeida MF, de Oliveira Camargo MC, D'Auria SR, Silva MM, et al. 2010. Detection of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in Brazilian bats. *Vet Parasitol*. 168(1-2):5-10.
- Sazima I. 1976. Observations on the feeding habits of phyllostomid bats (*Carollia*, *Anoura*, and *Vampyrops*) in southeastern Brazil. *Journal of Mammalogy*. 57:381–382.
- Sazima I, Fischer WA, Sazima M, Fischer E. 1994. The fruit bat *Artibeus lituratus* as a forest and city dweller. *Ciência e Cultura* 46: 164-168.
- Schaefer R, Batista HB, Franco AC, Rijsewijk FA, Roehe PM. 2005. Studies on antigenic and genomic properties of Brazilian rabies virus isolates. *Vet Microbiol*. 107:161-70.
- Schaer J, Perkins SL, Decher J, Leendertze FH, Fahr J, et al. 2003. High diversity of West African bat malaria parasites and a tight link with rodent Plasmodium taxa. *PNAS*. 10(43).
- Scheffer KC, Carrieri ML, Albas A, Santos HCP, Kotait I, et al. 2007. Rabies virus in naturally infected bats in the state of São Paulo, Southeastern Brazil. *Rev Saúde Publ*. 41:389-95.
- Schlee D: 1990. Das Bernstein-Kabinett. Stuttg Beitr Naturkunde. 28: 1-100.
- Schonian G, Akuffo H, Lewin S, Maasho K, Nylén S, et al. 2000. Genetic variability within the species *Leishmania aethiopica* does not correlate with clinical variations of cutaneous leishmaniasis. *Mol Biochem Parasitol*. 106(2):239-248.
- Schönian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HDFH, et al. 2003. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 47: 349-358.
- Schönian G, Mauricio I, Cupolillo E. 2010. Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*? *Trends Parasitol*. 26(10):466-9.
- Schneider MCP, Romijn C, Uieda W, Tamayo H, Silva DF. 2009: Rabies transmitted by vampire bats to humans: an emerging zoonotic disease in Latin America? *Rev Panam Salud Publica*. 25, 260–269.

- Schwarz RS, Bauchan GR, Murphy CA, Ravoet J, de Graaf DC, et al. 2015. Characterization of Two Species of Trypanosomatidae from the Honey Bee *Apis mellifera*: *Crithidia mellificae* Langridge and McGhee, and *Lotmaria passim* n. gen., n. sp. *J Eukaryot Microbiol.* 62(5):567-583.
- Serra-Cobo J, Lopez-Roig M. 2016. Bats and Emerging Infections: An Ecological and Virological Puzzle. *Adv Exp Med Biol.* DOI 10.1007/5584_2016_131.
- Shapiro TA, Englund PT. 1995. The structure and replication of kinetoplast DNA. *Annu Rev Microbiol.* 49:117-43.
- Shapiro JT, da Costa Lima Junior MS, Dorval ME, França AO, Cepa Matos MF, et al. 2013. First record of *Leishmania braziliensis* presence detected in bats, Mato Grosso do Sul, southwest Brazil. *Acta Trop.* 128, 171–174.
- Shapira M, McEwen JG, Jaffe CL. 1988. Temperature effects on molecular processes which lead to stage differentiation in *Leishmania*. *EMBO J.* 7(9):2895-901.
- Shi C, Yang F, Zhu X, Du E, Yang Y, et al. 2016. Evaluation of Housekeeping Genes for Quantitative Real-Time PCR Analysis of *Bradysia odoriphaga* (Diptera: Sciaridae). *Int J Mol Sci.* 17(7).
- Shin JH, Lee SE, Kim TS, Ma DW, Chai JY, Shin EH. 2016. Multiplex-Touchdown PCR to Simultaneously Detect *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, and *Cyclospora cayentanensis*, the Major Causes of Traveler's Diarrhea. *Korean J Parasitol.* 54(5):631-636.
- Shoji Y, Kobayashi Y, Sato G, et al. 2004. Genetic characterization of rabies viruses isolated from frugivorous bat (*Artibeus* spp.) in Brazil. *J Vet Med Sci.*;66:1271-3.
- Shoji Y, Kobayashi Y, Sato G, Gomes AAB, Itou T, et al. 2006. Genetic and phylogenetic characterization of rabies virus isolates from wildlife and livestock in Paraíba, Brazil. *Acta Virol.* 50:33-7.
- Silva SSP, Peracchi AL. 2001. Visits of Bats to Flowers of *Lafoensia glyptocarpa*. *Revista Brasileira de Biologia*, 59(1):19-22.1999.
- Silva-Iturriza A, Nassar JM, García-Rawlins AM, Rosales R, Mijares A. 2013. *Trypanosoma evansi* kDNA minicircle found in the Venezuelan nectar-feeding bat *Leptonycteris curasoae* (Glossophaginae) supports the hypothesis of multiple origins of that parasite in South America. *Parasitol Int.* 62(2):95–99.
- Silva AM, Marques-Aguiar SA, Barros RMS, Nagamachi CY, Pieczarka JC. 2005 - Comparative cytogenetic analysis in the species *Uroderma magnirostrum* and *U. bilobatum* (cytotype 2n = 42) (Phyllostomidae, Stenodermatinae) in the Brazilian Amazon. *Genetics and Molecular Biology*, 28: 248-253.
- Silva ES, Gontijo CM, Melo MN. 2005. Contribution of molecular techniques to the epidemiology of neotropical *Leishmania* species. *Trends Parasitol.* 21(12): 550- 2.
- Silva LL. 2007. Precipitações Pluviais da Pré-Estação Chuvosa no Período Chuvoso e suas Influências na Produtividade Agrícola da Paraíba. (Dissertação de Mestrado). Campina Grande/PB. Programa de Pós-graduação em Meteorologia/UFCG. 2007. 114p.
- Silva MMS, Harmani EFB, Gonçalves EFB, Uieda W. 1996. Bats from the metropolitan region of São Paulo, southeastern Brazil. *Chiroptera Neotropical.* 2(1):39-41.
- Silva MV, Xavier SM, Moreira WC, Santos BCP, Esberard CEL. 2007. Vírus rábico em morcego *Nyctinomops laticaudatus* na cidade do Rio de Janeiro, RJ: isolamento, titulação e epidemiologia. *Rev Soc Bras Med Trop.* 40:479-81.
- Silva RA, Souza AM, Passos JJ, Alencar AO, Lima AC, et al. 1967. A pesquisa do vírus rábico em morcegos no Brasil. *Veterinária (Rio de Janeiro).* 20:105-14.

- Simmons NB. 1996. A new species of *Micronycteris* (Chiroptera: Phyllostomidae) from northeastern Brazil, with comments on phylogenetic relationships. *Am Mus Novit.* 3158: 1–34.
- Simmons NB. 1998. in *Bat Biology and Conservation*, eds. Kunz, T. H. & Racey, P. A. (Smithsonian Inst. Press, Washington, DC), pp. 3–26.
- Simmons NB. 2005. Evolution. An Eocene big bang for bats. *Science.* 28;307(5709):527-528.
- Simmons NB, Seymour, Habersetzer J, Gunnell GF. 2008. Primitive Early Eocene bat from Wyoming and the evolution of flight and echolocation. *Nature.* 451:14. doi:10.1038/nature06549
- Simpson AGB, Gill EE, Callahan HA, Litaker RW, Roger AJ. 2004. Early evolution within kinetoplastids (euglenozoa), and the late emergence of trypanosomatids. *Protist.* 155(4):407–22
- Simpson AGB, Stevens JR, Lukes J. 2006. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends Parasitol.* 22(4):168-74.
- Simpson AM, Neckelmann N, de la Cruz VF, Munich ML, Simpson L. 1985. Mapping and 5' end determination of kinetoplast maxicircle gene transcripts from *Leishmania tarentolae*. *Nucleic Acids Res.* 26;13(16):5977-5993.
- Simpson L. 1973. Structure and function of kinetoplast DNA. *J Protozool.* 20(1):2-8.
- Simpson L. 1986. Kinetoplast DNA in trypanosomid flagellates. *Int Rev Cytol.* 99:119-79.
- Simpson L. 1987. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. *Annu Rev Microbiol.* 41:363-82.
- Smith JD. 1976. Chiropteran evolution. Spec. Pub., Mus. Texas Tech. Univ. 10, 46–49.
- Sodré MM, Rosa AR, Almeida MF. 2007. Rabies in the nectarivorous bat *G. soricina* (Pallas, 1766) in São Paulo city, Brazil. *Chiropt Neotrop.* 13:307-8.
- Sodré MM, da Gama AR, Almeida MF. 2010. Updated list of bat Species positives for rabies vírus in Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 52(2):75-81.
- Sohal RS. 1986. The rate of living theory: a contemporary interpretation. In *Insect Aging* (Collatz K-G, Sohal RS, eds). Berlin: Springer-Verlag.
- Sodré MM, Gama AR, Almeida MF. 2010; Updated list of bat species positive for rabies in Brazil. *Rev Inst Med Trop.* 52:75-81.
- Sogin ML, Elwood HJ, Gunderson JH. 1986. Evolutionary diversity of eukaryotic smallsubunit rRNA genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83(5):1383-7.
- Solano-Gallego L, Rodriguez-Cortes A, Trotta M, Zampieron C, Razia L, Furlanello T, et al. Detection of *Leishmania infantum* DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniosis. *Vet Parasitol.* 2007; 147:315-319.
- Solca Mda S, Guedes CE, Nascimento EG, Oliveira GG, dos Santos WL, et al. 2012. Qualitative and quantitative polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Leishmania* in spleen samples from naturally infected dogs. *Vet Parasitol.* 184: 133–140.
- Souto RP, Vargas N, Zingales B. 1999. *Trypanosoma rangeli*: Discrimination from *Trypanosoma cruzi* based on a variable domain from the large subunit ribosomal RNA gene. *Experimental Parasitology.* 91, 306-314.
- Souza NA, Silva JB, Godoy RE, Souza FJM, Andrade-Coelho CA, et al. 2015. Studies on Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) in the Campus FIOCRUZ Mata Atlântica, Jacarepaguá, in the City of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 48(1):26-32.
- Souza V, Rocha M, Valera A, Eguiarte LE. 1999: Genetic structure of natural populations of *Escherichia coli* in wild hosts on different continents. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3373–3385.

- Smales LR. 2007. Oligacanthorhynchidae (Acanthocephala) from mammals from Paraguay with the description of a new species of *Neonicicola*. *Comparative Parasitology*. 74, 237–243.
- Steindel M, Grisard EC, de Carvalho Pinto CJ, Cordeiro FD, et al. 1998. Characterization of trypanosomes from the subgenus *Schizotrypanum* isolated from bats, *Eptesicus* sp. (Chiroptera: Vespertilionidae), captured in Florianópolis, Santa Catarina State, Brazil. *J Parasitol*. 84(3):601-7.
- Stephens AS, Stephens SR, Morrison NA. 2011. Internal control genes for quantitative RT-PCR expression analysis in mouse osteoblasts, osteoclasts and macrophages. *BMC Res Notes*. 4:410.
- Stevens LR, Noyes HA, Dover GA, Gibson WC. 1999. The ancient and divergent origins of the human pathogenic trypanosomes, *Trypanosoma brucei* and *T. cruzi*. *Parasitology*. 118(1):107-116.
- Stevens J, Rambaut A. 2001. Evolutionary rate differences in trypanosomes. *Infect. Genet. Evol.* 1:143–150.
- Sturm NR, Simpson L. 1991. *Leishmania tarentolae* minicircles of different sequence classes encode single guide RNAs located in the variable region approximately 150 bp from the conserved region. *Nucleic Acids Research*. 19(22): 6277-6281
- Sturm NR, Murthy VK, Garside L, Campbell DA. 1998. The mini-exon gene of *Trypanosoma (Nannomonas) simiae*: sequence variation between isolates and a distinguishing molecular marker. *Acta Trop*. 71:199-206.
- Stutz WH, Albuquerque MC, Uieda W, Macedo EM, França CB. 2004. Updated list of bats from Uberlândia, State of Minas Gerais, Southeastern Brazil. *Chiropt Neotrop*. 10:188-90.
- Sulaiman IM, Morgan UM, Thompson RC, Lal AA, Xiao L. 2000. Phylogenetic relationships of *Cryptosporidium* parasites based on the 70-kilodalton *heat shock protein* (HSP70) gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2385–2391.
- Suzuki T, Higgins PJ, Crawford DR. Control selection for RNA quantitation. *Biotechniques*. 2000; 29(2):332–7.
- Svobodova M, Zidková L, Cepika I, Oborník M, Lukes J, et al. 2007. *Sergeia podlipaevi* gen. nov., sp. nov. (Trypanosomatidae, Kinetoplastida), a parasite of biting midges (Ceratopogonidae, Diptera). *Int J Syst Evol Microbiol*. 57(2):423–432.
- Ubelaker JE, Specian RD, Duszynski DW. 1977. Endoparasites. pp. 7-56. In R.J. Baker, J.K. Jones Jr. & D.C. Carter (eds.). *Biology of bats of the New World Family Phyllostomatidae*. Part II. Spec. Pub. Mus. Texas Tech Univ., 13.
- Uieda W, Harmani NMS, Silva MMS. 1995. Raiva em morcegos insetívoros (Molossidae) do Sudeste do Brasil. *Rev Saúde Publ*. 29:393-7.
- Uieda W, Hayashi MM, Gomes LH, Silva MMS. 1996. Espécies de quirópteros diagnosticados com raiva no Brasil. *Bull Inst Pasteur*. 1:17-35.
- Uieda W, Chaves ME. 2005. Bats from Botucatu region, State of São Paulo, Southeastern Brazil, *Chiropt Neotrop*. 11:224-6.
- Taniuchi M, Verweij JJ, Noor Z, Sobuz SS, van Lieshout L, et al. 2011. High Throughput Multiplex PCR and Probe-based Detection with Luminex Beads for Seven Intestinal Parasites. *Am J Trop Med Hyg*. 84(2): 332–337.
- Tavoloni P. 2005. Diversidade e frugivoria de morcegos filostomídeos (Chiroptera, Phyllostomidae) em habitats secundários e plantios de *Pinus* spp., no município de Anhembi – SP. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo.

- Taylor LH, Latham SM, Woolhouse MEJ. 2001. Risk factors for human disease emergence. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological. Science.* 356: 983-989.
- Teeling EC, Madsen O, Van den Bussche RA, de Jong WW, Stanhope MJ, et al. 2002. Paraphyly and the convergent evolution of a key innovation in Old World rhinolophoid microbats. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99(3):1431-6.
- Teeling EC, Springer MS, Madsen O, Bates P, O'Brien SJ, et al. 2005. A molecular phylogeny for bats illuminates biogeography and the fossil record. *Science.* 307 (5709):580-584.
- Teeling EC Chiroptera. 2009. In: S.B. Hedges and S. Kumar, Editors, *The Time Tree of Life*, Oxford University Press. 499–503.
- Teixeira SC, Peracchi AL. 1996. Morcegos do Parque Estadual da Serra da Tiririca, Rio de Janeiro, Brasil (Mammalia, Chiroptera). *Revista Brasileira de Zoologia.* 13:61–66.
- Teixeira RC, Corrêa CE, Fischer E. 2009. Frugivory by *Artibeus jamaicensis* (Phyllostomidae) bats in the Pantanal, Brazil. *Stud. Neotrop. Fauna E.* 44:7-15.
- Teixeira MM, Borghesan TC, Ferreira RC, Santos MA, Takata CS, et al. 2011. Phylogenetic Validation of the Genera *Angomonas* and *Strigomonas* of Trypanosomatids Harboring Bacterial Endosymbionts with the Description of New Species of Trypanosomatids and of Proteobacterial Symbionts. *Protist.* 162(3):503-524.
- Thomas ME, Rasweiler IJJ, D'Alessandro A. 2007. Experimental transmission of the parasitic flagellates *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* between triatomine bugs or mice and captive neotropical bats. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* 102, 559–565.
- Tojal da Silva AC, Cupolillo E, Volpini AC, Almeida R, Romero GA. 2006. Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, state of Acre, Brazil. *Trop Med Int Health.* 11(9):1388-1398.
- Tomaz LAG, Zortea M, Souza M, Jayme VS. 2007. Isolamento do vírus rábico em morcego *Carollia perspicillata* em Niquelândia, Goiás. *Chiropt Neotrop.* 13:309-12.
- Tomás-Pérez M, Fisa R, Riera C. 2013. The use of Fluorescent Fragment Length Analysis (PCR-RFLP) in the Direct Diagnosis and Identification of Cutaneous Leishmania Species. *Am J Trop Med Hyg.* Feb 4.
- Towner JS, Sealy TK, Khristova ML, Albariño CG, Conlan S, Reeder SA, et al. 2008. Newly discovered Ebola virus associated with hemorrhagic fever outbreak in Uganda. *PLoS Pathog*:e1000212.
- Trapido H. 1946. Observations on the vampire bat with special reference to longevity in captivity. *Jour. Mamm.* 27: 217-219.
- Tryphomas L, Zawdzka Z, Bernard MA, Janzen EA. 1977. Visceral leishmaniasis in a dog: Clinical hematological and pathological observations. *Can. J. Comp. Med.* 41:1-12.
- Tschoeke D, Nunes G, Jardim R, Lima J, Dumaresq A. 2014. The Comparative Genomics and Phylogenomics of *Leishmania amazonensis* Parasite. *Evolutionary Bioinformatics.* 10 131–153.
- Van der Auwera G, Maes I, De Doncker S, Ravel C, Cnops L, et al. 2013. Heat-shock protein 70 gene sequencing for *Leishmania* species typing in European tropical infectious disease clinics. *Euro Surveill.* 18(30):pii=20543.
- Van Den Bussche RA, Baker RJ, Wichman HA, Hamilton MJ. 1993. *Artibeus toltecus*. *Mol. Biol. Evol.* 10:944–959.
- Van Den Bussche RA, Hudgeons JL, Baker RJ. 1998. Phylogenetic accuracy, stability, and congruence: relationships within and among the New World bat genera *Artibeus*, *Dermanura* and *Koopmania*. In: Kunz, T.H., Racey, P.A. (Eds.), *Bat Biology and Conservation*. Smithsonian Institution, Washington, DC, pp. 43–58.

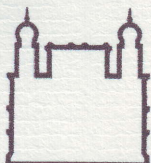
- Vallejo GA, Guhl F, Chiari E, Macedo AM. 1999. Species specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by Polymerase Chain Reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. *Acta. trop.* 72: 203-212.
- Vallejo GA, Guhl F, Carranza JC, Moreno J, Triana O, et al. 2003. Parity between kinetoplast DNA and miniexon gene sequences supports either clonal evolution or speciation in *T. rangeli* strains isolated from *Rhodnius colombiensis*, *R. pallescens* and *R. prolixus* in Colombia. *Infect Genet Evol.* 3: 39–45.
- Ventura RM, Paiva F, Silva RMS, Takeda GF, Buck GA, 2001. *Trypanosoma vivax*: Characterization of the spliced-leader gene of a Brazilian stock and species-specific detection by PCR amplification of an intergenic spacer sequence. *Exp Parasitol.* 99:37-8.
- Vickerman K, Preston T. 1976. The diversity of the kinetoplastid flagellates. In *Biology of the Kinetoplastida*. Edited by W. H. R. Lumsden & D. A. Evans. London: Academic Press, pp. 1–34.
- Victoir K, Banuls AL, Arevalo J, Llanos-Cuentas A, Hamers R, et al. 1998. The gp63 gene locus, a target for genetic characterization of *Leishmania* belonging to subgenus *Viannia*. *Parasitology.* 117: 1-13.
- Vilar TD, Gitti CB, Valim MP, Desidério MHG, Sá-Freire L, et al. 2004. Registro de *Trypanosoma (Megatrypanum) pessoai* Deane & Sugay, 1963 em morcego hematófago *Desmodus rotundus* (Geoffroy, 1810) de Vargem Pequena, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. *Entomol Vec.* 11(3):535-39.
- Vilar EM, Nunes H, Nascimento JL, Cordeiro-Estrela P. 2015. Distribution extension of *Ametrida centurio* Gray, 1847 (Chiroptera, Phyllostomidae): First record in the Brazilian Atlantic Forest. *Check List the journal of biodiversity data.* 11(1): 1503.
- Viola LB, Attias M, Takata CS, Campaner M, De Souza W, et al. 2009a. Phylogenetic analyses based on small subunit rRNA and glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes and ultrastructural characterization of two snake Trypanosomes: *Trypanosoma serpentis* n. sp. From *Pseudoboa nigra* and *Trypanosoma cascavelli* from *Crotalus durissus terrificus*. *J Eukaryot Microbiol.* 56(6):594-602.
- Viola LB, Almeida RS, Ferreira RC, Campaner M, Takata CS, et al. 2009b. Evolutionary history of trypanosomes from South American caiman (*Caiman yacare*) and African crocodiles inferred by phylogenetic analyses using SSU rRNA and gGAPDH genes. *Parasitology.* 136:55-65.
- Vizotto LD, Taddei VA. 1973. Chave para determinação de quirópteros brasileiros. *Rev Fac Filos Cien Letr S José R Preto Bol Cienc.* 1:1-72.
- Von der Heyden S, Chao E, Cavalier-Smith T. 2004. Genetic diversity of goniomonads: an ancient divergence between marine and freshwater species. *European Journal of Phycology,* 39:4, 343-350.
- Von Zuben CJ. 1997. Implications of spatial aggregation of parasites for the population dynamics in host-parasite interaction. *Rev. Saúde Pública.* 31 (5): 523-30.
- Volf P, Myskova J. 2007. Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors. *Trends Parasitol.* 23: 91–92.
- Volpini AC, Passos VMA, Oliveira GC, Romanha AJ. 2004. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. *Acta Tropica.* 90: 31-37.
- Volpini AC, Marques MJ, dos Santos SL, Machado-Coelho GL, Mayrink W, Romanha AJ. 2006. *Leishmania* identification by PCR of Giemsa-stained lesion imprint slides stored for up to 36 years. *Clinical Microbiology and Infection.* 12: 815-818.

- Voss RS, Emmons LH. 1996. Mammalian diversity in neotropical lowland rainforests: a preliminary assessment. *Bull Amer Mus Nat Hist.* 230:1-115.
- Votýpka J, Suková E, Kraeva N, Ishemgulova A, Duží I, et al. 2013. Diversity of Trypanosomatids (Kinetoplastea: Trypanosomatidae) Parasitizing Fleas (Insecta: Siphonaptera) and Description of a new genus *Blechomonas* gen. n. *Protist.* 164(6):763-81.
- Votýpka J, Kostygov AY, Kraeva N, Grybchuk-Ieremenko A, Tesařová M, et al. 2014. *Kentomonas* gen. n., a new genus of endosymbiont-containing trypanosomatids of Strigomonadinae subfam. n. *Protist.* 165(6):825-838.
- Wallace FG. 1966. The trypanosomatid parasites of insects and arachnids. *Experimental parasitology.* 18(1):124–193.
- Wallace FG, Camargo EP, McGhee RB, Roitman I. 1983. Guidelines for the Description of New Species of Lower Trypanosomatids¹. *The Journal of Protozoology.* 30(2):308–313.
- Walter P, Blobel G. 1982. Signal recognition particle contains a 7S RNA essential for protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Nature.* 299: 691–698.
- Wanzeller ALM, Diniz JAP, Gomes LCM, Cruz ACR, Soares MCP. 2002. Ultrastructural, Antigenic and Physicochemical Characterization of the Mojuí dos Campos (Bunyavirus) Isolated from Bat in the Brazilian Amazon Region. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 97(3): 307-311.
- Wheeler RJ, Gluenz E, Gull K. 2013. The Limits on Trypanosomatid Morphological Diversity. *Plos One.* 8(11): e79581. doi:10.1371/journal.pone.0079581.
- Whitaker Jr JO, Findley JS. 1980. Foods eaten by some bats from Costa Rica and Panama. *Jour. Mamm.* 61 (3): 540-544.
- Weigl R. 2005. Longevity of mammals in captivity; from the living collections of the world. Stuttgart, Germany: Kleine Senckenberg-Reihe.
- Weiss JB. DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. *Clin Microbiol Vet.* 1995; 8: 113-30.
- Weiss S, Witkowski PT, Auste B, Nowak K, Weber N. 2012. Hantavirus in Bat, Sierra Leone. *Emerg Infect Dis.* 18(1): 159–161.
- Westenberger SJ, Sturm NR, Campbell DA. 2006. *Trypanosoma cruzi* 5S rRNA arrays define five groups and indicate the geographic origins of an ancestor of the heterozygous hybrids. *Int J Parasitol.* 36(3):337-46.
- Wibbelt G, Kurth A, Hellmann D, Weishaar M, Barlow A, et al. 2010. White-nose syndrome fungus (*Geomyces destructans*) in bats, Europe. *Emerging Infectious Diseases.* 16:1237–1243.
- Willig MR. 1983. Composition, microgeographic variation, and sexual dimorphism in Caatingas and Cerrado bat communities from northeast Brazil. *Bulletin of Carnegie Museum of Natural History* 23:1–131.
- Willig MR. 1985. Reproductive patterns of bats from Caatingas and Cerrado biomes in northeast Brazil. *Journal of Mammalogy.* 66:668–681.
- Willig MR. 1986. Bat community structure in South America: a tenacious chimera. *Revista Chilena de Historia Natural* 59:151–168.
- Willig MR, Moulton MP. 1989. The role of stochastic and deterministic processes in structuring Neotropical bat communities. *Journal of Mammalogy.* 70:323–329.
- Willig MR, Camilo GR, Nobile SJ. 1993. Dietary overlap in frugivorous and insectivorous bats from edaphic cerrado habitats of Brazil. *Journal of Mammalogy, Lawrence,* 74 (1): 117-128.

- Wilson DE. 1979. Reproductive patterns. In *Biology of bats of the New World Family Phyllostomatidae*. Part III. (R.J. Baker, J.K. Jones Jr. & D.C. Carter, eds). Special Publications Museum, Texas Tech University 16:317-378.
- Wilson DE, Reeder DM. 2005. *Mammal species of the World: a taxonomic and geographic reference*. 2 ed. Washington: Smithsonian Institution Press: 137-241.
- Wilson ME, Young BM, Andersen KP, Weinstock JV. 1995. A Recombinant *Leishmania chagasi* Antigen That Stimulates Cellular Immune Responses in Infected Mice. *Infection and Immunity*. 63(5):2062–2069.
- Wilkinson GS, South JM. 2002. Life history, ecology and longevity in bats. *Aging Cell*. 1:124-131.
- Winer J, Jung CK, Shackel I, Williams PM. 1999. Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Anal Biochem*. 270: 41-49.
- Woo PC, Lau SK, Li KS, Poon RW, Wong BH, et al. 2006. Molecular diversity of coronaviruses in bats. *Virology*. 351:180–7 10.1016/j.virol.2006.02.041
- Yamasaki M, Tajima M, Lee KW, Jeong JR, Yamato O, Maede Y, 2002. Molecular cloning and phylogenetic analysis of *Babesia gibsoni* heat shock protein 70. *Vet. Parasitol*. 11, 123–129.
- Yurchenko VY, Merzlyak EM, Kolesnikov AA. 1999. Structure of Leishmania Minicircle Kinetoplast DNA Classes. *J Clin Microbiol*. 37(5): 1656–1657.
- Yurchenko V, Kostygov A, Havlová J, Grybchuk-Ieremenko A, Ševčíková T, et al. 2016. Diversity of Trypanosomatids in Cockroaches and the Description of *Herpetomonas tarakana* sp. n. *J Eukaryot Microbiol*. 63(2):198–209.
- Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W. 2000. "A greedy algorithm for aligning DNA sequences" *J Comput Biol* 2000; 7(1-2):203-14.
- Zampieri RA, Laranjeira-Silva MF, Muxel SM, de Lima ACS, Shaw JJ, et al. 2016. High Resolution Melting Analysis Targeting hsp70 as a Fast and Efficient Method for the Discrimination of *Leishmania* Species. *PLoS Negl Trop Dis*. 10(2): e0004485.
- Zilberstein D, Shapira M. 1994. The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. *Annual Reviews of Microbiology*. 48, 449–470.
- Zilka A, Garlapati S, Dahan E, Yaolsky V, Shapira M. 2001. Developmental Regulation of Heat Shock Protein 83 in *Leishmania*. 3'processing and mRNA stability control transcript abundance, and translation is directed by a determinant in the 3' untranslated region. *The Journal of Biological Chemistry*. 276, 47922–47929.
- Zelazny AM, Fedorko DP, Li L, Neva FA, Fischer SH. 2005. Evaluation of 7SL RNA gene sequences for the identification of *Leishmania* spp. *Am J Trop Med Hyg*. 72(4):415-20.
- Zetun CB, Hoffmann JL, Silva RC, de Souza LC, Langoni H. 2009: *Leptospira* spp. and *Toxoplasma gondii* antibodies in vampire bats (*Desmodus rotundus*) in Botucatu region, SP, Brazil. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis*. 15, 546–552.
- Zortéa M. 2003. Reproductive patterns and feeding habits of three nectarivorous bats (Phyllostomidae: Glossophaginae) from the Brazilian Cerrado. *Brazilian Journal of Zoology*. 63(1):159-168.
- Zurita AI, Rodriguez J, Piñero JE, Pacheco R, Carmelo E, et al. 2003. Cloning and characterization of the *Leishmania (Viannia) braziliensis* Hsp70 gene. Diagnostic use of the C-terminal fragment rLb70 (513–663). *The Journal of Parasitology*. 89:372–378.

9. LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Comissão de ética no uso de animais – CEUA/FIOCRUZ –
LW81/12



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de Referência



**Comissão de Ética
no Uso de Animais**

1

LICENÇA

LW-81/12

Certificamos que o protocolo (P-42/12.1), intitulado "**DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR TRIPANOSOMATÍDEOS EM MAMÍFEROS POTENCIAIS RESERVATÓRIOS NO BRASIL.**", sob a responsabilidade de **ANDRE LUIZ RODRIGUES ROQUE**, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive, aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 26/11/2016 e inclui o uso total de:

Rodentia

- 600 Machos.
- 600 Fêmeas.

Marsupialia

- 600 Machos.
- 600 Fêmeas.


Chiroptera

- 200 Machos.
- 200 Fêmeas.

Carnivora

- 75 Machos.
- 75 Fêmeas.

(continua)


Octavio A. F. Presgrave
Coordenador
CEUA/FIOCRUZ
SIAPE 04626550

LICENÇA

LW-81/12

(continuação da licença LW-81/12 - protocolo 42/12.1)

Cingulata

- 10 Machos.
- 10 Fêmeas.

Pilosa

- 10 Machos.
- 10 Fêmeas.

Canis familiaris

- 460 Machos.
- 460 Fêmeas.

Sus domesticus

- 100 Machos.
- 100 Fêmeas.

Bovinae

- 40 Machos.
- 40 Fêmeas.

Capra aegagrus hircus

- 40 Machos.
- 40 Fêmeas.

Rio de Janeiro, 26 de novembro de 2012.

Octavio Augusto França Presgrave

Coordenador da CEUA/FIOCRUZ

Octavio A. F. Presgrave
Coordenador
CEUA/FIOCRUZ
SIAPE 04626550

Anexo 2. Autorização para atividades com finalidade científica –
Ministério do Meio Ambiente – MMA, 2014



Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 41683-3	Data da Emissão: 15/05/2014 15:26	Data para Revalidação*: 14/06/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Emmanuel Messias Vilar Gonçalves da Silva	CPF: 083.915.474-77
Título do Projeto: DIVERSIDADE FUNCIONAL E FILOGENÉTICA DA QUIROPTEROFAUNA NA RESERVA BIOLÓGICA GUARIBAS/PB	
Nome da Instituição : UFPB - UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA	CNPJ: 24.098.477/0001-10

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Reuniões com a equipe do Programa de Pesquisa e Monitoramento da Biodiversidade da REBIO Guaribas	01/2014	01/2014
2	Reconhecimento de pontos para redes de dossel.	01/2014	04/2014
3	Coleta de morcegos.	01/2014	05/2015
4	Elaboração e finalização do relatório final de coletas e atividades.	05/2014	05/2014
5	Elaboração e finalização do relatório parcial de coletas e atividades.	06/2014	06/2014

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA nº 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Outras ressalvas

1	As redes de neblinas deverão ser verificadas no mínimo de 30 em 30 minutos.
---	---

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Isabela Jerônimo Bezerra	Estagiária	104.566.224-03	3220397 ssp-PB	Brasileira
2	Luis Gustavo Almeida Simplicio de Brito	Estagiário	097.285.934-90	3695633 SSP-PB	Brasileira
3	MARGARIDA ALCOFORADO FURQUIM	Estagiária	090.454.524-56	3311377 SSP-PB	Brasileira
4	Wendy Narjara Silva Santos	Estagiária	095.118.024-02	3654523 ssds-PB	Brasileira
5	Isabella Lais Chalegre Rodrigues de Andrade	Estagiária	084.232.984-69	8063994 SDS-PE	Brasileira
6	Renata de Cássia Pires	Colaboradora	076.276.726-00	12286820 PC-MG	Brasileira
7	fernando carneiro beltrao	Estagiário	101.332.464-18	3762813 ssp/pb-PB	Brasileira
8	Vitor Antonio Louzada de Araújo	Colaborador	105.280.047-51	202721825 DIC-RJ	Brasileira

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 35719429





Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 41683-3	Data da Emissão: 15/05/2014 15:26	Data para Revalidação*: 14/06/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Emmanuel Messias Vilar Gonçalves da Silva	CPF: 083.915.474-77
Título do Projeto: DIVERSIDADE FUNCIONAL E FILOGENÉTICA DA QUIROPTEROFAUNA NA RESERVA BIOLÓGICA GUARIBAS/PB	
Nome da Instituição : UFPB - UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA	CNPJ: 24.098.477/0001-10

9	Pedro Cordeiro Estrela de Andrade Pinto	Coordenador do Projeto e taxidermista	695.984.601-34	1611087333 cer-nas-BA	Brasileira
10	Maria Izabel Medeiros Diniz Pimentel	Estagiária	063.010.084-56	3826375 SSDF-PB	Brasileira
11	Newton Mota Gurgel Filho	Colaborador	013.487.583-41	2000003004652 SSP-CE	Brasileira
12	José Anderson Feijó da Silva	Colaborador	074.032.114-56	6710150 SSP-PE	Brasileira
13	Natan Diego Alves de Freitas	Estagiário	057.366.084-05	3762079 SSSD-PB	Brasileira
14	Ewerth Janssen Cunha de Vasconcelos	Estagiário	091.582.984-36	3587894 SSP-PB	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1		PB	RESERVA BIOLÓGICA GUARIBAS	UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Chiroptera
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Chiroptera
3	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Chiroptera (*Qtde: 20)

* Quantidade de indivíduos por espécie, por localidade ou unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Fezes, Ectoparasita, Fragmento de tecido/órgão
2	Método de captura/coleta (Outros mamíferos)	Puçá, Rede de neblina

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UFPB - UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA	coleção

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 35719429



Anexo 3. Autorização para atividades com finalidade científica –
Ministério do Meio Ambiente – MMA, 2015



Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 41683-5	Data da Emissão: 20/02/2015 12:30	Data para Revalidação*: 21/03/2016
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Emmanuel Messias Vilar Gonçalves da Silva	CPF: 083.915.474-77
Título do Projeto: DIVERSIDADE FUNCIONAL E FILOGENÉTICA DA QUIROPTEROFAUNA NA RESERVA BIOLÓGICA GUARIBAS/PB	
Nome da Instituição : UFPB - UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA	CNPJ: 24.098.477/0001-10

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Reuniões com a equipe do Programa de Pesquisa e Monitoramento da Biodiversidade da REBIO Guaribas	01/2014	01/2014
2	Reconhecimento de pontos para redes de dossel.	01/2014	04/2014
3	Coleta de morcegos.	01/2014	05/2015
4	Elaboração e finalização do relatório final de coletas e atividades.	05/2014	05/2014
5	Elaboração e finalização do relatório parcial de coletas e atividades.	06/2014	06/2014

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Outras ressalvas

1	As redes de neblinas deverão ser verificadas no mínimo de 30 em 30 minutos.
---	---

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Isabela Jerônimo Bezerra	Estagiária	104.566.224-03	3220397 ssp-PB	Brasileira
2	JORGE LUIZ DO NASCIMENTO	Colaborador	074.568.217-04	101480382 IFP-RJ	Brasileira
3	Luis Gustavo Almeida Simplicio de Brito	Estagiário	097.285.934-90	3695633 SSP-PB	Brasileira
4	MARGARIDA ALCOFORADO FURQUIM	Estagiária	090.454.524-56	3311377 SSP-PB	Brasileira
5	Wendy Narjara Silva Santos	Estagiária	095.118.024-02	3654523 ssds-PB	Brasileira
6	Isabella Lais Chalegre Rodrigues de Andrade	Estagiária	084.232.984-69	8063994 SDS-PE	Brasileira
7	Renata de Cássia Pires	Colaboradora	076.276.726-00	12286820 PC-MG	Brasileira
8	fernando carneiro beltrao	Estagiário	101.332.464-18	3762813 ssp/pb-PB	Brasileira

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 61565535





Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 41683-5	Data da Emissão: 20/02/2015 12:30	Data para Revalidação*: 21/03/2016
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Emmanuel Messias Vilar Gonçalves da Silva	CPF: 083.915.474-77
Título do Projeto: DIVERSIDADE FUNCIONAL E FILOGENÉTICA DA QUIROPTEROFAUNA NA RESERVA BIOLÓGICA GUARIBAS/PB	
Nome da Instituição : UFPB - UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA	CNPJ: 24.098.477/0001-10

#	Nome	Função	CPF	Identificação	Nacionalidade
9	Vitor Antonio Louzada de Araújo	Colaborador	105.280.047-51	202721825 DIC-RJ	Brasileira
10	Pedro Cordeiro Estrela de Andrade Pinto	Coordenador do Projeto e taxidermista	695.984.601-34	1611087333 cer-nas-BA	Brasileira
11	Maria Izabel Medeiros Diniz Pimentel	Estagiária	063.010.084-56	3826375 SSDF-PB	Brasileira
12	Newton Mota Gurgel Filho	Colaborador	013.487.583-41	2000003004652 SSP-CE	Brasileira
13	KARLLA MORGANNA DA COSTA REGO	Colaboradora	063.313.954-82	2459535 SSPPB-PB	Brasileira
14	José Anderson Feijó da Silva	Colaborador	074.032.114-56	6710150 SDS-PE	Brasileira
15	Natan Diego Alves de Freitas	Estagiário	057.366.084-05	3762079 SSSD-PB	Brasileira
16	Ewerth Janssen Cunha de Vasconcelos	Estagiário	091.582.984-36	3587894 SSP-PB	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1		PB	RESERVA BIOLÓGICA GUARIBAS	UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Chiroptera
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Chiroptera
3	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Chiroptera (*Qtde: 20)

* Quantidade de indivíduos por espécie, por localidade ou unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Fezes, Ectoparasita, Fragmento de tecido/órgão
2	Método de captura/coleta (Outros mamíferos)	Puçã, Rede de neblina

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UFPB - UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA	coleção

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 61565535



Anexo 4. Sequência de DNA e região genômica dos marcadores moleculares utilizados no sistema de PCR multiplex;

Organismo	Iniciador Senso	Iniciador Antisenso	Região genômica (Cromossomo)	Tamanho do fragmento (pb)
<i>Leishmania sp.</i>	5'GGG(G/T)AGGGGCGTTCT(C/G)CGAA- 3'	5'(C/G)(C/G)(C/G)(A/T)CTAT(A/T)TTACACCAACCCC 3'	Mitocondrial 26	120
Hospedeiro mamífero	5'ACCACAGTCCATGCCATCAC 3'	5'GTCAGGTCCACCACTGACAC 3'	Nuclear 12	212

Anexo 5. Análise *in silico* da identidade das sequências entre os iniciadores direcionados para o fragmento de gapdh e as sequências representativas do gene gapdh para as espécies de *Leishmania* e hospedeiros mamíferos;

	Gene ID	Localização do gene	Espécies	Total score	Query cover	E value	Identidade	Iniciadores
1	2597	NC_000012.12	<i>Homo sapiens</i>	197	100%	4,00E-08	100%	Forward
				134	100%	4,00E-08	100%	Reverso
2	451783	NC_006479.4	<i>Pan troglodytes</i>	177	100%	1,00E-05	95%	Forward
				134	100%	4,00E-08	100%	Reverso
3	14433	NC_000072.6	<i>Mus musculus</i>	251	100%	5,00E-08	100%	Forward
				124	90%	0,011	100%	Reverso
4	24383	NC_005103.4	<i>Rattus norvegicus</i>	191	100%	4,00E-08	100%	Forward
				81.8	80%	0,01	100%	Reverso
5	102245543	NW_005366017.1	<i>Myotis brandt</i>	198	100%	1,00E-05	95%	Forward
				192	100%	0,003	90%	Reverso
6	102888425	NW_006437736.1	<i>Pteropus alecto</i>	183	100%	1,00E-05	95%	Forward
				155	100%	0,002	90%	Reverso
7	403755	NC_006609.3	<i>Canis lupus</i>	169	100%	1,00E-05	95%	Forward
				79.8	70%	0,009	100%	Reverso
8	100033897	NC_009149.2	<i>Equus caballus</i>	216	100%	1,00E-05	95%	Forward
				177	100%	0,003	90%	Reverso
9	281181	AC_000162.1	<i>Bos taurus</i>	208	100%	0,003	90%	Forward
				210	90%	0.01	100%	Reverso
10	102422339	NW_005871058.1	<i>Myotis lucifugus</i>	149	100%	1,00E-05	95%	Forward
				190	100%	0,003	90%	Reverso
11	5653844	NC_007271.2	<i>Leishmania major</i> (strain Friedlin)	43.1	60%	0.66	100%	Forward
				62.9	100%	7,00E-04	90%	Reverso
12	DQ092549	DQ092549.1	<i>L. tarentolae</i>	57.5	60%	0.66	100%	Forward
				24.3	69%	7,00E-04	100%	Reverso
13	5417820	NC_009322.2	<i>L. braziliensis</i> MHOM/BR/75/M2904	45.1	60%	0.17	100%	Forward
				55.0	100%	7,00E-04	90%	Reverso
14	13388249	NC_018263.1	<i>L. donovani</i> BPK282A1	14.4	35%	0.65	100%	Forward
				59.5	45%	0.17	100%	Reverso
15	5073932	NC_009420.2	<i>L. infantum strain</i> JPCM5	14.4	35%	0.65	100%	Forward
				59.5	45%	0.17	100%	Reverso
16	13448275	NC_018324.1	<i>L. mexicana</i> MHOM/GT/2001/U1103	No significant similarity found				Forward
				47.1	45%	0.17	100%	Reverso
17	22577345	NC_025877.1	<i>L. panamensis strain</i> MHOM/PA/94/PSC-1	45.1	60%	0.17	100%	Forward
				24.3	100%	7,00E-04	90%	Reverso
18	KP197180	KP197180.1	<i>L. lainsoni CBT75</i>	43.1	90%	0.39	100%	Forward
				69.4	100%	2	100%	Reverso
19	KF041811	KF041811.1	<i>L. chagasi CBT 13</i>	43.1	60%	0.45	100%	Forward
				53.0	100	5,00E-04	90%	Reverso

Anexo 6. Artigo publicado durante o doutorado com dados referentes à dissertação de mestrado. Distinct *Leishmania* Species Infecting Wild Caviomorph Rodents (Rodentia: Hystricognathi) from Brazil. Renata Cássia-Pires, Mariana C. Boité, Paulo S. D'Andrea, Heitor M. Herrera, Elisa Cupolillo, Ana Maria Jansen, André Luiz R. Roque. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014 8(12): e3389.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003389>



Distinct *Leishmania* Species Infecting Wild Caviomorph Rodents (Rodentia: Hystricognathi) from Brazil

Renata Cássia-Pires¹, Mariana C. Boité², Paulo S. D'Andrea³, Heitor M. Herrera⁴, Elisa Cupolillo², Ana Maria Jansen¹, André Luiz R. Roque^{1*}

1 Laboratory of Trypanosomatid Biology, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **2** Laboratory of Leishmaniasis Research, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **3** Laboratory of Biology and Parasitology of Wild Reservoir Mammals, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **4** Dom Bosco Catholic University, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

Abstract

Background: Caviomorph rodents, some of the oldest *Leishmania* spp. hosts, are widely dispersed in Brazil. Despite both experimental and field studies having suggested that these rodents are potential reservoirs of *Leishmania* parasites, not more than 88 specimens were analyzed in the few studies of natural infection. Our hypothesis was that caviomorph rodents are inserted in the transmission cycles of *Leishmania* in different regions, more so than is currently recognized.

Methodology: We investigated the *Leishmania* infection in spleen fragments of 373 caviomorph rodents from 20 different species collected in five Brazilian biomes in a period of 13 years. PCR reactions targeting kDNA of *Leishmania* sp. were used to diagnose infection, while *Leishmania* species identification was performed by DNA sequencing of the amplified products obtained in the HSP70 (234) targeting. Serology by IFAT was performed on the available serum of these rodents.

Principal findings: In 13 caviomorph rodents, DNA sequencing analyses allowed the identification of 4 species of the subgenus *L. (Viannia)*: *L. shawi*, *L. guyanensis*, *L. naiffi*, and *L. braziliensis*; and 1 species of the subgenus *L. (Leishmania)*: *L. infantum*. These include the description of parasite species in areas not previously included in their known distribution: *L. shawi* in *Thrichomys inermis* from Northeastern Brazil and *L. naiffi* in *T. fosteri* from Western Brazil. From the four other positive rodents, two were positive for HSP70 (234) targeting but did not generate sequences that enabled the species identification, and another two were positive only in kDNA targeting.

Conclusions/Significance: The infection rate demonstrated by the serology (51.3%) points out that the natural *Leishmania* infection in caviomorph rodents is much higher than that observed in the molecular diagnosis (4.6%), highlighting that, in terms of the host species responsible for maintaining *Leishmania* species in the wild, our current knowledge represents only the “tip of the iceberg.”

Citation: Cássia-Pires R, Boité MC, D'Andrea PS, Herrera HM, Cupolillo E, et al. (2014) Distinct *Leishmania* Species Infecting Wild Caviomorph Rodents (Rodentia: Hystricognathi) from Brazil. PLoS Negl Trop Dis 8(12): e3389. doi:10.1371/journal.pntd.0003389

Editor: Gabriele Schönian, Charité University Medicine Berlin, Germany

Received: June 5, 2014; **Accepted:** October 31, 2014; **Published:** December 11, 2014

Copyright: © 2014 Cássia-Pires et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability: The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: FAPERJ and CNPq supported this study through research grants provided to EC, AMJ and ALRR, while RCP had scholarship supported by CAPES. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* Email: roque@ioc.fiocruz.br

Introduction

More than 30 species within the *Leishmania* genus (Trypanosomatidae, Trypanosomatida) are recognized, including both extremely specific as well as generalist species transmitted by a variety of Phlebotomine vectors worldwide [1–2]. In fact, several *Leishmania* species are multi-host parasites that infect mammal species of different orders, including humans [3–4]. The diversity of *Leishmania* species, mammal hosts and environments in which the transmission occurs reveals a complex system. Leishmaniasis has an important impact on public health since it results in a spectrum of debilitating diseases, which can progress to very severe, even fatal cases. In Brazil, human cutaneous leishmaniasis is associated with at least six different species of the subgenus

Leishmania (Viannia) besides *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, while the visceral form is exclusively associated with *Leishmania (L.) infantum* [5–7].

Although usually interpreted as such, the description of *Leishmania* DNA in a given mammal species is not sufficient to consider this species a reservoir host. Reservoir is better defined not as a single species, but as an assemblage of species responsible for the long lasting maintenance of a parasite in a given environment [8]. In reservoir systems, each species of mammal host plays a unique role in the maintenance of the parasite, which means that these systems should always be considered in a restricted spatio-temporal scale, particular to each site and each moment [9]. Failures in interrupting human transmission and preventing new epidemics are probably related to the lack of

Author Summary

Leishmaniasis is a major public health problem expanding in Brazil and one of the reasons is that we still have poor knowledge of some aspects of the biology and epidemiology of *Leishmania* species, including the role of wild mammals. Caviomorph rodents, some of the oldest *Leishmania* spp. hosts, are widely dispersed in Brazil and reported as potential reservoirs of *Leishmania* parasites. Spleen fragments of 373 Brazilian caviomorph rodents from 20 species were investigated for *Leishmania* infection. The molecular algorithm proposed to diagnose the infection associate the sensitivity of a molecular target with multiple copies with the specificity of another marker with discriminatory taxonomic ability between species. These demonstrated their usefulness in identifying most of the parasite species infecting the rodents, including the description of species in previously unknown hosts and in areas not previously included in their known distribution, such as *L. shawi* in *Thrichomys inermis* from Northeastern Brazil and *L. naiffi* in *T. fosteri* from Western Brazil. Although the percent of infection by molecular diagnosis was 4.6%, the serology demonstrated that about 51% of them had been exposed to *Leishmania* parasites pointing that caviomorph rodents are inserted in enzootic cycles of *Leishmania*, to a higher extent than currently recognized.

knowledge of various aspects of the natural transmission cycles of these parasites. In this sense, the involvement of synanthropic hosts, such as caviomorph rodents and their potential to act as reservoirs cannot be ignored.

Although the diagnosis of *Leishmania* sp. infection in mammal tissues through molecular assays has been conducted by several groups, the identification of the *Leishmania* species is still a great challenge [10–12]. The parasite isolation in wild mammals is complex due to the difficulties in performing aseptic culture during field expeditions. Besides, the usually observed low parasite load and irregular distribution of parasites among host tissues impair even more the isolation efficiency [13–17]. To overcome such limitations, molecular approaches have been developed and applied aiming to detect and identify *Leishmania* species directly in biological samples. The advantage of molecular approaches based on PCR is that they combine high sensitivity for direct detection of the infecting parasites in various human, animal and sand fly tissues, with species specificity [18]. The PCR followed by either Restriction Fragment Polymorphism (RFLP) or DNA sequencing of distinct targets have already been employed in biological samples. Not all of them are, however, useful for identification at the species level. Molecular targets directed to the conserved region of the kinetoplast minicircles of *Leishmania* are the most used for diagnosis due to their sensitivity (which is related to the high number of copies in a single parasite (~10,000) but detects only the subgenus level. The PCR-RFLP of the internal transcribed spacer 1 (ITS1) is the assay commonly used for direct detection and identification of *Leishmania* species in the Old World, but for Brazilian species presents a lower resolution. Among the targets that result in intraspecific variability, the *Heat Shock Protein* of 70 kDa is encoded by a polymorphic gene which has regions allowing diagnosis of the *Leishmania* species circulating in Brazil [19].

Rodents comprise more than two hundred species distributed in many different habitats. In fact, in nature, we found semi-aquatic, terrestrial and semi-fossorial species [20]. This trait is probably the main reason explaining their exposure to the different transmission cycles of several species of *Leishmania* in the wild [8]. The South

American rodents are divided into two sub orders (Sciurognathi and Hystricognathi). The first Caviomorph rodents (Rodentia: Hystricognathi) arrived in the Americas about 35mya (million years ago), much earlier than other rodent groups [21]. Along with the first caviomorph migrants, during the Oligocene, it has already been proposed that new species of the *Leishmania* (*Leishmania*) subgenus may have arrived and subsequently diversified in the native mammal fauna [22].

Nowadays, caviomorph rodents are widely distributed in Brazil and contribute significantly to the animal biomass of these habitats. They are also found in peridomestic environments that report the circulation of *Leishmania* parasites among other species of mammals, humans and/or dogs [23–26]. To date in Brazil, there are few studies of natural *Leishmania* infection in caviomorph rodents and not more than 88 specimens were analyzed [27–29]. Furthermore, experimental studies pointed to the putative role of two caviomorph species as *Leishmania* reservoirs: *Thrichomys laurentius* infected by *L. infantum* and *L. braziliensis* [17] and *Proechimys semispinosus* infected with *L. infantum* [30]. In this sense, the analysis of different caviomorph rodent species from different regions and collected at different periods of time, may define the role of these taxa in the reservoir host system of *Leishmania* sp. In the present study we investigate the infection by *Leishmania* spp. in 373 caviomorph rodents from 20 different species and discuss the role of this group in the maintenance of the transmission cycles of *Leishmania* spp. in different regions of Brazil.

Materials and Methods

Animal samples

We evaluated spleen fragments from caviomorph rodents (n = 373) collected in five out six Brazilian biomes between 1999 and 2012 (S1 Table). These animals were captured using Tomahawk and Shermann “live-traps” during studies conducted by our laboratory [31–33]. In these studies, whenever the euthanasia of animals were realized, usually for taxonomic identification and/or diagnosis of parasite’s infection, spleen fragments were collected in plastic tubes containing ethanol and stored at –20°C.

Molecular diagnosis

All tissue fragments were re-hydrated with Nuclease-free water and the DNA extraction was performed using the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, USA) according to the manufacturer’s recommendations. Positive and negative controls were derived from fragments of spleen and liver from infected (*Leishmania braziliensis*–IOC-L2483) and non-infected hamsters provided by the animal facilities of the Oswaldo Cruz Foundation. PCR were conducted using the pureTaq Ready-To-Go PCR beads (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) and primers directed to the conserved region of the *Leishmania* -kDNA minicircle, as follows: forward: 5′ – GG-GAGGGGCGTTCTGCGAA-3′ and reverse: 5′ – GGCCCAC-TAT ATTACACCAACCCC – 3′ [17]. The PCR products were visualized after electrophoresis on 8% polyacrylamide gel and silver staining using a specific kit (DNA Silver Staining, GE Healthcare). Positive samples were submitted to a new PCR directed to a fragment of 234 bp of the *hsp70* gene, using the following primers (5′ - GGA CGA GAT CGA GCG CAT GGT - 3′) and (5′- TCC TTC GAC GCC TCC TGG TTG - 3′) [19]. The PCR amplifications were performed in a final volume of 50 µL containing 5 µL of DNA, 0.2 pmol of each primer, 0.2 µM dNTPs, 1.5 mM MgCl₂ and 1 U GoTaq®DNA polymerase

(Promega). The PCR assays used the following amplification cycle: 94°C for 5 min followed by 30 cycles of 94°C for 30 sec, 63°C for 1 min and 72°C for 1 min and a final extension at 72°C for 10 min. To increase the number of DNA copies, products obtained in the first reaction were submitted to a second PCR with the same primers and conditions described.

The PCR products obtained for HSP70 (234) targeting and the products positive only in kDNA targeting were purified using the Wizard SV Gel kit and PCR Clean-up System kit (Promega). The both products were sequenced with the same primers used for the PCR assay using the ABI PRISM BigDyeTerminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. Sequencing was performed on an automated DNA sequencer (ABI PRISM[®]BigDye[™] Terminator Cycle Sequencing) at the Genomic Platform – DNA Sequencing (PDTIS – FIOCRUZ). Consensus sequences were aligned and edited with the BioEdit Version v7.1.11 [34] and Phred/Phrap/Consed package Version: 0.020425.c [35] from two forward and two reverse strands. Sequences with Phred values below ten over their extent were discarded and only sequence segments with values above twenty were used for contig construction. Contigs from all samples were manually assembled and aligned in MEGA4 [36]. For that samples that not generated good-quality consensus sequence, the PCR reaction and the DNA sequencing was repeated two or more times until we obtain sequence segments equal to the previously established criteria. Species identification was performed by similarity analysis obtained by Alignment Search Tool (BLAST) algorithm hosted by NCBI, National Institute of Health, USA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), against sequences available on GeneBank after calculation of the statistical significance of matches. Besides, we also compared our sequences with a panel of sequences for HSP70 (234) gene obtained from representative strains of different *Leishmania* species circulating in Brazil available in the *Leishmania* collection of the Oswaldo Cruz Institute/CLIOC (Table 1). This table was allowed the identification of the positions of the polymorphic site that differentiates the parasite species.

Serological diagnosis

The immunofluorescence assay (IFAT) was performed on 130 available serum samples from the evaluated rodents, as described by Camargo (1966) [37]. A mixture of promastigotes from cultures of *L. (V.) braziliensis* (IOC/L566) and *L. (L.) infantum* (IOC/L579) obtained from CLIOC was used as antigen. In order to detect possible cross-reaction with *Trypanosoma cruzi*, sera were also tested using reference strains of *T. cruzi* (TcI M000/BR/1974/F and TcII MHOM/BR/1950/Y). The reactions were conducted using an *in-house* intermediary antibody anti-*Trichomys* serum produced in rabbits [38]. The reaction was visualized using a commercial anti-rabbit IgG-FITC (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Rodents that displayed serological titers 1/10 and 1/20 for *Leishmania* spp. infection were considered positive only if these titers were equal or higher than the titers observed in the same rodent for *T. cruzi* infection. Rodents that displayed *Leishmania* serological titers equal or higher than 1:40 were considered positive independent of *T. cruzi* results.

Ethics statement

All the procedures carried out with these animals were authorized by the Brazilian Institute of Environment and Renewable Natural Resources (IBAMA) and followed protocols approved by the Ethics Committee of Animal Use Fiocruz (P0007-99, P0179-03; P0292/06; L0015-07).

Table 1. Main polymorphisms along the HSP70 (234) sequences that allow the distinction of *Leishmania* species from reference strains.

<i>Leishmania</i> Species	19	22	23	24	35	36	39	45	47	48	58	70	78	79	113	116	117	122	145	148	150	156	158	160	161	163	168	170	171	174	181	182	183	185	201			
Position of Polymorphic Site																																						
<i>L. (V) braziliensis</i>	T	G	T	C	C	A	C	A	A	T	G	G	G	G	A	G	G	G	A	G	G	A	C	G	G	A	T	C	C	C	A	C	A	C	G	A		
<i>L. (V) shawi</i>	A	G	G	.	.	
<i>L. (V) guyanensis</i>	A	
<i>L. (V) naiffi</i>	C	G	.	.
<i>L. (V) lainsoni</i>	C	.	A	T
<i>L. (L) infantum</i>	C	.	A	T	G	C	A	G	G	C	C	A	.	C	C	.	G	T	C	T	.	A	G	.	A	.	.	A	A	A	.	G	T	A	G	.	G	
<i>L. (L) amazonensis</i>	C	A	A	T	G	C	A	.	G	C	C	A	.	.	C	.	G	T	C	C	C	A	T	G	A	.	A	A	A	G	G		

doi:10.1371/journal.pntd.0003389.t001

Results

We found 17 caviomorph rodents (4.6%) positive in the PCR directed to *Leishmania* sp. kDNA. From these, 15 samples were also positive when tested for HSP70 (234) primers, two directly after the PCR and 13 only after the re-amplification of the product obtained in the first PCR reaction (Fig. 1). DNA sequencing analyses allowed the identification of 4 species of the subgenus *Leishmania* (*Viannia*) and 1 species of the subgenus *Leishmania* (*Leishmania*) in samples of 13 caviomorph rodents (Fig. 2, Table 2). In five situations, the DNA sequence analysis revealed identity values above 95% for more than one *Leishmania* species and we opted not to define one of them as the etiological agent. A single sample (one *Thrichomys laurentius* from Piauí) displayed different DNA sequences that presented high values of similarity with distinct species of *Leishmania* in two consecutive reactions. This was considered as result of a hybrid population or mixed infection. *Leishmania* infection was observed in five caviomorph rodent species captured in two municipalities belonging to Pantanal and in two belonging to Caatinga biomes (Fig. 2). In the Pantanal, 7 animals were positive for *Leishmania* spp and the identification of the *Leishmania* species was possible in 4 of them: one *T. fosteri* captured in Corumbá, was found infected by *L. (V.) naiffi* while *L. (L.) infantum* was found infecting one *Dasyprocta azarae* and two *Clyomys laticeps* in Aquidauna and Corumbá, respectively. Also in Corumbá, we were unable to identify the *Leishmania* species infecting one *T. fosteri* because the analysis of the parasite DNA sequence revealed similarity with two *Leishmania* species (*L. (V.) naiffi* and *L. (V.) braziliensis*).

From Caatinga biome, in the municipality of Curacá/Bahia, one *Thrichomys inermis* was found infected by *L. (V.) shawi*. In São Raimundo Nonato/Piauí, two *T. laurentius* were found infected, respectively, by *L. (V.) guyanensis* and *L. (L.) infantum*. In four *T. laurentius*, the identification of the *Leishmania* species was not possible because the parasite DNA sequencing analyses showed high similarity for two *Leishmania* species (Table 2). The specific diagnosis in the seventh *T. laurentius* was only possible after two

attempts and showed the presence of two *Leishmania* species, *L. (V.) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* (S2 Table). This was interpreted as the result of a mixed infection and/or a possible hybrid of them.

The prevalence of antibodies against *Leishmania* sp. in IFAT was 51.3% (59/115). In 15 samples the results were inconclusive and were therefore not included in the final analysis. Among the samples analyzed (S1 Table), 56 animals were positive in IFAT but negative by PCR. From these, the majority of them ($n = 34$) displayed titers equal or higher than 1:20 in the IFAT. Of the six animals positive for *Leishmania* kDNA, three were also positive by IFAT. Other 53 rodents were negative for both tests.

Discussion

A clear expansion of leishmaniasis around the country has been observed in the last decades [23,39–41]. From the different reasons already proposed to explain this expansion, a common point is the recognition that we still have poor knowledge of some aspects of the biology and epidemiology of *Leishmania* species, which, in the end, result in inefficient control strategies. The mammalian hosts of most *Leishmania* species are still poorly understood, which reinforces the need for studies that verify the distribution of these parasites in other mammalian taxa beyond those classically reported as reservoirs. Caviomorph rodents comprise an enormous group of species that exploit different habitats, and also include some species already domesticated by humans, such as the chinchilla and the guinea pig (*Cavia* spp.) [42].

Among the rodent species found infected in this study, only species from genus *Dasyprocta* and *Thrichomys* were already found infected by *Leishmania* spp. in Brazil. *Dasyprocta* sp., was found infected by *L. guyanensis* in Pará state [27] while *T. apereoides*, was founded infected by *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, and *L. amazonensis* in Minas Gerais state [28–29]. Moreover, other *Thrichomys* species were reported as potential reservoirs of trypanosome species in different regions of Brazil [33,43]. We

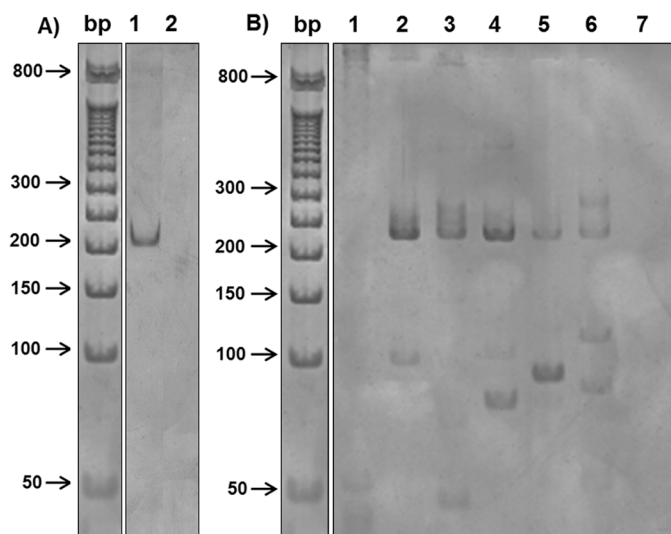


Fig. 1. Illustrative representation of HSP 70 (234) amplification for *Leishmania* sp. before and after re-amplification of the PCR products. (A) PCR products of first amplification of HSP 70 (234) targeting analyzed by electrophoresis polyacrylamide gel stained with silver. Lanes: bp. molecular-weight marker (50 bp DNA ladder); 1. Infected *Thrichomys laurentius* from São Raimundo Nonato/PI; 2. Negative control of PCR reaction. (B) PCR products of re-amplification of the product obtained in the first PCR reaction. Lanes: bp. molecular-weight marker (50 bp DNA ladder); 1. Negative *Thrichomys fosteri* from Corumbá/MS (Positive only in kDNA); 2–5. Infected *T. laurentius* from São Raimundo Nonato/PI; 6. Infected *T. fosteri* from Corumbá/MS; 7. Negative control of PCR after re-amplification.
doi:10.1371/journal.pntd.0003389.g001

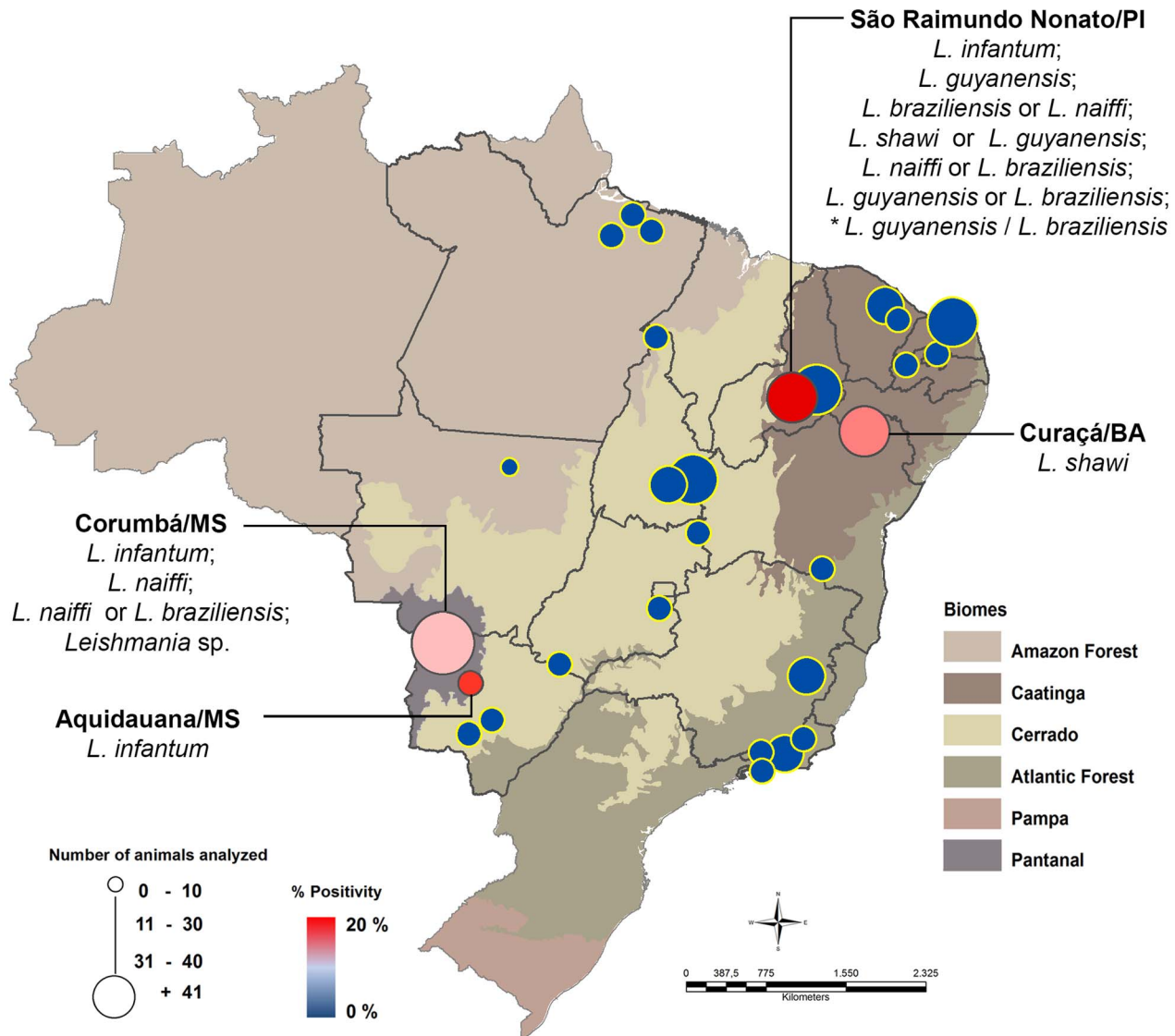


Fig. 2. Map of the distribution of *Leishmania* species infecting caviomorph rodents in Brazil. Blue markers indicate municipalities where caviomorph rodents were collected, but were all negative in the molecular assay. Red markers indicate municipalities with animals positive for *Leishmania* infection. * Sample with high value between distinct species of *Leishmania* was considered as a result of hybrid or mixed infection. doi:10.1371/journal.pntd.0003389.g002

presented here the first description of *Leishmania* infection in *Clyomys laticeps*, a rodent species already found naturally infected by *T. evansi* and *T. cruzi* in Pantanal region” [33,44].

Thrichomys inermis was the most abundant small mammal captured during the field expedition in Curaçá/Bahia, which points to its importance as a potential reservoir host. We described here for the first time, *L. shawi* in rodents, as well as this *Leishmania* species outside the Amazon region. Up to know, *L. shawi* is known to be transmitted only by *Lutzomyia whitmani* associated to arboreal and/or scansorial mammals (primates, sloths and coatis) suggesting a transmission cycle restricted to this forest strata [7,45]. In a first view, our findings led to the suggestion that this transmission could also occur near the ground, since *T. inermis* is a terrestrial rodent that only rarely explores the understory strata [20]. However, we recently revealed through camera traps another species of this genus (*T. fosteri*) invading a coati nest about 12 meters high in the Pantanal region (Guilherme

Mourão, personal communication). This finding reflects the lack of knowledge about the biology of some of the most widely distributed mammal species and the risk of incorrectly interpreting the parasite transmission cycle based on misconceptions of the biology of their mammal hosts and/or vectors.

American visceral leishmaniasis (AVL) is widely distributed in the state of Mato Grosso do Sul. Currently, the Aquidauana municipality displays an increasing number of human and canine cases in the urban area [46] and here we report for the first time the presence of *L. infantum* in sylvatic areas of this municipality. It is worth mentioning that although *Dasyprocta azarae* is a wild rodent species, these animals are frequently found in urban environments such as parks and woodlands. In these localities, these animals have no natural predators and are usually provided with food by local visitors, resulting in propitious conditions for reproduction. The presence of synanthropic *L. infantum* hosts in areas of intense transmission is a factor usually not considered in

Table 2. Infected caviomorph rodents and their respective *Leishmania* species identified by the analysis of similarity between the DNA sequences from the PCR products targeting HSP70 (234) and available sequences from GeneBank.

Locality	Positive mammal	<i>Leishmania</i> identification	Max Score	Identity (%)
Bahia	<i>Thrichomys inermis</i>	<i>Leishmania</i> (V). <i>shawi</i>	422	99
Mato Grosso do Sul	<i>Thrichomys fosteri</i>	<i>Leishmania</i> (V). <i>naiffi</i>	390	99
	<i>Dasyprocta azarae</i>	<i>Leishmania</i> (L). <i>infantum</i>	185	88
	<i>Clyomys laticeps</i>	<i>Leishmania</i> (L). <i>infantum</i>	427	99
	<i>Clyomys laticeps</i>	<i>Leishmania</i> (L). <i>infantum</i>	361	93
	<i>Thrichomys fosteri</i>	<i>Leishmania</i> (V). <i>naiffi</i> OR	435	100
		<i>Leishmania</i> (V). <i>braziliensis</i>	424	99
Piauí	<i>Thrichomys laurentius</i>	<i>Leishmania</i> (V). <i>guyanensis</i>	433	100
	<i>Thrichomys laurentius</i>	<i>Leishmania</i> (L). <i>infantum</i>	303	97
	<i>Thrichomys laurentius</i>	<i>Leishmania</i> (V). <i>braziliensis</i> OR	422	99
		<i>Leishmania</i> (V). <i>naiffi</i>	422	99
	<i>Thrichomys laurentius</i>	<i>Leishmania</i> (V). <i>shawi</i> OR	390	95
		<i>Leishmania</i> (V). <i>guyanensis</i>	385	95
	<i>Thrichomys laurentius</i>	<i>Leishmania</i> (V). <i>naiffi</i> OR	435	100
		<i>Leishmania</i> (V). <i>braziliensis</i>	424	99
	<i>Thrichomys laurentius</i>	<i>Leishmania</i> (V). <i>naiffi</i> OR	422	99
		<i>Leishmania</i> (V). <i>braziliensis</i>	411	98
	<i>Thrichomys laurentius</i> *	<i>Leishmania</i> (V). <i>guyanensis</i>	416	100
	<i>Leishmania</i> (V). <i>braziliensis</i>	416	99	

* Sample with high value between distinct species of *Leishmania* was considered as a result of hybrid or mixed infection.
doi:10.1371/journal.pntd.0003389.t002

the epidemiology of VL. Nevertheless, we can not rule out the participation of other wild hosts in this transmission cycle, which is a complicating factor for the success of control strategies.

Also in the Pantanal region, the Corumbá municipality is endemic for AVL, recording dog's and human's cases [47–48]. In this municipality, there were conducted four expeditions between 2003 and 2009, and *Leishmania* infected rodents were found in all of them. The captures occurred in two farms that present different land uses. The Alegria Farm has livestock activities whereas the Nhimirim Farm is the center for scientific studies and presents large conservation areas. Two *Clyomys laticeps*, each one captured in one farm were found infected by *L. infantum*. This is especially important in the Alegria Farm where the interaction between wild and domestic mammals is common. All other infected rodents were captured in the Nhimirim Farm, pointing out that richness of biodiversity, as encountered in preserved areas, also reflect parasite diversity. At least one *Thrichomys fosteri* were found infected by *Leishmania naiffi* and this represents the first description of *Leishmania naiffi* in rodents and also of this *Leishmania* species outside the Amazon region [49–50]. Although we found no reports of the known *L. naiffi* vectors in the Mato Grosso do Sul state, their presence cannot be discarded or, alternatively, this transmission is being maintained by other phlebotomine species [51]. Another *T. fosteri* was founded infected by *L. naiffi* although the sequence of the amplified products revealed that *L. braziliensis* could not be discarded as etiologic agent of this infection. Indeed, these species differ in solely four nitrogenous bases at positions 79, 161, 168 e 182 when sequenced to target HSP70 (234) (Table 1).

Our data from São Raimundo Nonato/Piauí revealed the higher diversity of *Leishmania* species in a single host species, *Thrichomys laurentius*. This diversity could be observed in two

consecutive years of expeditions. *T. laurentius* are a wild mammal species that has synanthropic habits and displayed high relative abundance in both expeditions. These rodents displayed high prevalence of infection that can potentially be considered a risk of infection not only for other wildlife populations, but also for domestic animals and men that expose themselves in areas of transmission. One *T. laurentius* was found infected by *L. infantum*. Indeed, the Piauí state is endemic for AVL with records of infection in marsupials, dogs and wild carnivores [52–55]. Another *T. laurentius* was found infected by *L. guyanensis*. This parasite species is commonly found in the Amazon region and known to be transmitted mainly by *Lutzomyia umbratilis*, a anthrophilic species that is generally found in understory strata [56].

Despite the difficulties, specific diagnosis is crucial to better understand the complex network of transmission of *Leishmania* species, which was achieved in the above mentioned situations. Ideally, studies that focus on the description of *Leishmania* reservoirs in a given area should be performed in long-termed studies. When not possible, punctual studies may also be quite informative, but it is imperative that this must be analysed within a broad methodological approach that includes parasitological, serological and molecular diagnoses in different tissues. These factors will define the role of a given mammal host as a reservoir of *Leishmania* parasites. Nevertheless, this study design not always is possible due to inherent difficulties in working with wild mammals in the field. The molecular algorithm proposed here sought to combine the sensitivity of a molecular target and the specificity of DNA sequencing analysis of a locus. In fact, PCR targeted to the conserved region of kDNA has proved to be the most sensitive, but only allows the identification up to the subgenus level [15,57]. Although less sensitive to diagnose the infection, the

variable region of HSP 70 enabled the identification of the parasite species [19]. It is worth mentioning that in most cases positive reactions were only visualized after the re-amplification of the sequences obtained in the first reaction. This is the first time this approach is applied directly in tissue samples from wild mammals.

Also in São Raimundo Nonato, the analysis of the molecular identification of four animals resulted in similar sequences for more than one *Leishmania* species. One *T. laurentius* showed similar results for *L. shawi* and *L. guyanensis*, an expected result since both *Leishmania* species belong to the same complex and differ only in two bases, in HSP70 (234) sequence (Table 1). Other three *T. laurentius* showed similar results for *L. braziliensis* e *L. naiffi* (Table 2). We also obtained a divergent result after repeating the PCR reaction of one *T. laurentius* sample, which was interpreted as a result of a mixed infection or a hybrid between *L. braziliensis* and *L. guyanensis*. These five situations of inconclusive species identification reflect an inherent limitation of the employed methodology. On the other hand, it highlights how complex the identification of *Leishmania* species is (especially when sylvatic samples are used) and reflects how challenging is the establishment of a universal methodology, unique for diagnosis of the infection. In nature, the evolutionary success of *Leishmania* populations depends on their ability to multiply and be transmitted in different microenvironments (vertebrate and invertebrate hosts), which are both influenced by the habitat where they live. This process of evolution species is a dynamic, mutable and still poorly known phenomenon. Our attempt to describe the parasitic populations resulting from such complex interactions into discrete (not continuous) taxonomic units, although epidemiologically important, is always subject to findings like these. These should not be interpreted as an indicative to search for new discriminatory molecular markers, but instead as a natural report of the complexity that exists in *Leishmania* taxa.

The serological survey showed that 51.3% of the caviomorph rodents evaluated had become exposed to *Leishmania* parasites, and, therefore, are expected to be infected. However, we found only 4.6% of positive rodents through the molecular analysis of spleen fragments. *Leishmania* sp. has non-uniform distribution in tissues of vertebrate hosts, and may be present in other fragments of the spleen as well as in different tissues as skin and/or liver. The three animals that were positive for the molecular diagnosis, but negative for IFAT may have been caught in an initial phase of infection when there was not yet production of detectable IgG in

serological tests. Another factor, although less known in wild hosts, may be an inability (permanent or temporary) of some individuals to produce detectable antibodies in serological assays. The rate of infection demonstrated by the serology points out that the natural *Leishmania* infection in caviomorph rodents is much higher than that observed in the molecular diagnosis. Our results based on PCR of spleen fragments and serology reflects only the “tip of the iceberg” highlighting that the knowledge about the epidemiology of different *Leishmania* species that infect caviomorph rodents is just at its beginning. The diversity of *Leishmania* species found infecting different caviomorph rodent species reflects the dynamism and complexity of the transmission cycles of these parasites in nature.

Supporting Information

S1 Table Origin of the analyzed caviomorph rodents, which were collected in Brazil between 1999 and 2012. (DOCX)

S2 Table Similarity levels observed by BLAST analysis among the DNA sequencing obtained for the target HSP70 (234) in the infected caviomorph rodents and available sequences from GeneBank with their respective accession numbers. (DOCX)

Acknowledgments

The authors are thankful to Vitor Rademaker Martins and the staff of the Laboratory of Tripanosomatids Biology and the Laboratory of Biology and Parasitology of Wild Mammal Reservoirs for capture and supply of the spleen fragments from some caviomorph rodents. We also offer thanks to Dr. Cibele Bonvicino for taxonomic identification of some rodents; Dr. Vera Bongertz for insightful comments; and Rodrigo Mexas and Dr. Samanta Xavier for being helpful in the development of the figures. The authors also thank Daniela Ribeiro Vallim da Silva and Regina Coeli Rathunde Matos for assistance with the molecular diagnosis and the Genomic Platform – DNA Sequencing (PDTIS – FIOCRUZ).

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RCP MCB EC ALRR. Performed the experiments: RCP MCB PSD HMH. Analyzed the data: RCP MCB EC AMJ ALRR. Contributed reagents/materials/analysis tools: PSD HMH EC AMJ ALRR. Wrote the paper: RCP MCB AMJ ALRR.

References

- Fraga J, Montalvo AM, De Doncker S, Dujardin JC, Van der Auwera G (2010) Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. *Infect Genet Evol* 10: 238–245.
- Bañuls AL, Hide M, Prugnolle F (2007) *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv Parasitol* 64: 1–109.
- Ashford RW (1996) Leishmaniasis reservoir and their significance in control. *Clin Dermat* 14: 523–32.
- Rotureau B (2006) Ecology of the *Leishmania* species in the Guianan ecoregion complex. *Am J Trop Med Hyg* 74: 81–96.
- Grimaldi Jr G, Tesh RB, McMahon-Pratt D (1989) A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in The New World. *Am J Trop Med Hyg* 41: 687–725.
- Ministério da Saúde (2006) Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral. 1st Edition. Brasília, DF; Brazil. 120 p.
- Ministério Da Saúde (2010) Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2nd Edition. Brasília, DF; Brazil. 182 p.
- Roque ALR, Jansen AM. Hospedeiros e reservatórios de *Leishmania* sp. e sua importância na manutenção dos Ciclos de Transmissão nos ambientes silvestre e Sinantrópico. In: Conceição-Silva F, De-Simone SG, Alves CR, Porrozi R. *Questões atuais em leishmanioses do continente americano*. Editora Fiocruz. In press.
- Roque ALR, Jansen AM (2010) Reservatórios do *Trypanosoma cruzi* e sua relação com os vetores. In: *Vetores da doença de Chagas no Brasil*. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro.
- Reithinger R and Dujardin JC (2007) Molecular diagnosis of leishmaniasis: Current status and future applications. *J Clin Microbiol* 45:21–25.
- Goto H, Lindoso JA (2010) Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 8:419–433.
- Schönian G, Kuhls K, Mauricio IL (2011) Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. *Parasitology* 138:405–425.
- Lopez M, Inga R, Cangalaya M, Echevarria J, Llanos-Cuentas A, et al. (1993) Diagnosis of *Leishmania* using the polymerase chain reaction: a simplified procedure for field work. *Am J Trop Med Hyg* 49: 348–356.
- Degrave W, Fernandes O, Campbell D, Bozza M, Lopes U (1994) Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* - a mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89: 463–469.
- Volpini AC, Passos VMA, Oliveira GC, Romanha AJ (2004) PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop* 90: 31–37.
- Ampuero J, Rios AP, Carranza-Tamayo CO, Romero GA (2009) Genus-specific kinetoplast-DNA PCR and parasite culture for the diagnosis of localized cutaneous leishmaniasis: applications for clinical trials under field conditions in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 104:992–997.
- Roque ALR, Cupolillo E, Marchevsky RS, Jansen AM (2010) *Thrichomys laurentius* (Rodentia; Echimyidae) as a Putative Reservoir of *Leishmania infantum* and *L. braziliensis*: Patterns of Experimental Infection. *PLoS Negl Trop Dis* 4: 1–8.

18. Schönian G, Mauricio I, Cupolillo E (2010) Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*? Trends Parasitol 26:466–469.
19. da Graça GC, Volpini AC, Romero GA, de Oliveira Neto MP, Hueb M, et al. (2012) Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. Mem Inst Oswaldo Cruz 107:664–674.
20. Bonvicino CR, Oliveira JA, D'Andrea PS (2008) Guia dos Roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos. Rio de Janeiro: Centro Pan-Americano de Febre Afetosa – OPAS/OMS. 120 p.
21. Flynn JJ, Wyss AR (1998) Recent advances in South American mammalian paleontology. Trends Ecol. Evol 13: 449–454.
22. Thomaz-Soccol V, Lanotte G, Rioux JÁ, Pratlong F, Martini-Dumas A, et al. (1993) Monophyletic origin of the genus *Leishmania* Ross, 1903. Ann Parasitol Hum Comp 68: 107–108.
23. 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 10: 139–146.
24. Pita-Pereira D, Souza GD, Zwetsch A, Alves CA, Brito C, et al. (2009) Short Report: First Report of *Lutzomyia (Nyssomyia) neivai* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) Naturally Infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a Periurban Area of South Brazil Using a Multiplex Polymerase chain Reaction Assay. Am J Trop Med Hyg 80: 593–595.
25. Shimabukuro PH, da Silva TR, Ribeiro FO, Baton LA, Galati EA (2010) Geographical distribution of American cutaneous leishmaniasis and its phlebotomine vectors (Diptera: Psychodidae) in the state of São Paulo, Brazil. Parasit Vectors 3:121.
26. Humberg RM, Oshiro ET, Cruz Mdo S, Ribolla PE, Alonso DP, et al. (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.
27. Lainson R, Shaw JJ, Povoia M (1981) The importance of edentates (sloths and anteaters) as primary reservoirs of *Leishmania braziliensis guyanensis*, causative agent of “pianbois” in north Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg 75: 611–612.
28. Oliveira FS, Pirmez C, Pires MQ, Brazil RP, Pacheco RS (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(3–4): 219–227.
29. Quaresma PF, Rêgo FD, Botelho HA, da Silva SR, Moura AJ Jr, et al. (2011) Wild, synanthropic and domestic hosts of *Leishmania* in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg 105: 579–585.
30. Travi BL, Arteaga LT, Leon AP, Adler GH (2002) Susceptibility of spiny rats (*Proechimys semispinosus*) to *Leishmania (Viannia) panamensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Mem Inst Oswaldo Cruz 97: 887–892.
31. Herrera HM, Norek A, Freitas TPT, Rademaker V, Fernandes O, et al. (2005) Domestic and wild mammals infection by *Trypanosoma evansi* in a pristine area of the Brazilian Pantanal region. Parasitol Res 96: 121–126.
32. Roque ALR, D Andrea PS, Andrade GB, Jansen AM (2005) *Trypanosoma cruzi*: Distinct patterns of infection in the sibling caviomorph rodent species *Thrichomys apereoides laurentius* and *Thrichomys pachyurus* (Rodentia, Echimyidae). Exp Parasitol 111: 37–46.
33. Rademaker V, Herrera HM, Raffel TR, D Andrea PS, Freitas TPT, et al. (2009) What is the role of small rodents in the transmission cycle of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma evansi* (Kinetoplastida Trypanosomatidae)? A study case in the Brazilian Pantanal. Acta Trop 111: 102–107.
34. Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Department of Microbiology, North Carolina State University. Nucleic Acids Symp Ser 41:95–98.
35. Gordon D (2002) Viewing and Editing Assembled Sequences Using Consed. Current Protocols in Bioinformatics: John Wiley & Sons, Inc.
36. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. Molecular Biology and Evolution 24: 1596–1599.
37. Camargo ME (1966) Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 8:227–235.
38. Herrera L, Xavier SCC, Viegas C, Martinez C, Cotias PM, et al. (2004) *Trypanosoma cruzi* in a caviomorph rodent: parasitological and features of the experimental infection of *Thrichomys apereoides* (Rodentia: Echimyidae). Exp Parasitol 107:78–88.
39. Barreto ML, Teixeira MG, Bastos FI, Ximenes RAA, Barata RB, et al. (2011) Sucessos e Fracassos no Controle de Doenças Infecciosas no Brasil: O Contexto Social e Ambiental, Políticas, Intervenções e Necessidades de Pesquisa. Lancet. Saúde no Brasil 3, 47–60. Available at: <http://download.thelancet.com/flattcontentassets/pdfs/brazil/brazilpor3.pdf>. Accessed 20 March, 2014.
40. Harhay MO, Oliario PL, Costa DL, Costa CH (2011) Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. Trends Parasitol 27: 403–409.
41. Marlow MA, da Silva Mattos M, Makowiecky ME, Eger I, Rossetto AL, et al. (2013) Divergent Profile of Emerging Cutaneous Leishmaniasis in Subtropical Brazil: New Endemic Areas in the Southern Frontier. PLoS One 8: e56177.
42. Voloch CM, Vilela JF, Loss-Oliveira L, Schrago CG (2013) Phylogeny and chronology of the major lineages of New World hystricognath rodents: insights on the biogeography of the Eocene/Oligocene arrival of mammals in South America. BMC Res Notes 6:160.
43. Herrera L, D'Andrea PS, Xavier SCC, Mangia RH, Fernandes O, et al. (2005) *Trypanosoma cruzi* infection in wild mammals of the National Park ‘Serra da Capivara’ and its surroundings (Piauí, Brazil), an area endemic for Chagas disease. Trans R Soc Trop Med Hyg 99: 379–388.
44. Herrera HM, Rademaker V, Abreu UGP, D'Andrea PS, Jansen AM (2007) Variables that modulate the spatial distribution of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma evansi* in the Brazilian Pantanal. Acta Trop 102:55–62.
45. Lainson R, Braga RR, de Souza AA, Povoia MM, Ishikawa EA, et al. (1989) *Leishmania (Viannia) shawi* sp. n., a parasite of monkeys, sloths and procyonids in Amazonian Brazil. Ann Parasitol Hum Comp 64: 200–207.
46. Mato Grosso do Sul (2012) Governo do Estado de Mato Grosso do Sul. Secretaria de Saúde de Saúde do Estado Estadual de Vigilância Epidemiológica Coordenadoria. Estadual de Zoonoses Gerência. Informe epidemiológico das leishmanioses n° 4/2012. Campo Grande. Available: <http://www.saude.ms.gov.br/controle/ShowFile.php?id=123472>. Accessed 20 March 2014.
47. Antonialli SAC, Torres TG, Paranhos Filho AC, Tolezano JE (2007) Spatial analysis of American Visceral Leishmaniasis in Mato Grosso do Sul State, Central Brazil. J Infect 54: 509–514.
48. Pita-Pereira D, Cardoso MA, Alves CR, Brazil RP, Brito C (2008) 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 107:66–9.
49. Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT, Braga RR, Ishikawa EA (1990) Cutaneous leishmaniasis of man due to *Leishmania (Viannia) naiffi*. Lainson and Shaw, 1989. Ann Parasitol Hum Comp. 65: 282–284.
50. Naiffi RD, Freitas RA, Naiffi MF, Arias JR, Barret TV, et al. (1991) Epidemiological and nosological aspects of *Leishmania naiffi*. Lainson & Shaw, 1989. Mem Inst Oswaldo Cruz 86: 317–321.
51. Azipurua J, De La Cruz D, Valderama A, Windsor D (2010). *Lutzomyia* sand fly diversity and rates of infection by *Wolbachia* and an exotic *Leishmania* species on Barro Colorado Island, Panama. PLoS Negl Trop Dis 4:627.
52. Werneck GL, Costa CH (2005) Utilização de dados censitários em substituição a informações socioeconômicas obtidas no nível individual: uma avaliação empírica. Epidemiol Serv Saúde 14:143–150.
53. Nascimento EL, Martins DR, Monteiro GR, Barbosa JD, Ximenes MF, et al. (2008) Forum: geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Postscript: new challenges in the epidemiology of *Leishmania chagasi* infection. Cad Saude Publica 24: 2964–2967.
54. Werneck GL (2008) Forum: geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Introduction. Cad Saude Publica 24: 2937–2940.
55. de Almeida AS, Medronho Rde A, Werneck GL (2011) Identification of risk areas for visceral leishmaniasis in Teresina, Piauí State, Brazil. Am J Trop Med Hyg 84: 681–687.
56. Ready PD, Arias JR, Freitas RA (1985) A pilot study to control *Lutzomyia umbratilis* (Diptera: Psychodidae), the major vector of *Leishmania braziliensis guyanensis*, in a peri-urban rainforest of Manaus, Amazonas state, Brazil. Mem Inst. Oswaldo Cruz 80: 27–36.
57. Volpini AC, Marques MJ, dos Santos SL, Machado-Coelho GL, Mayrink W, Romanha AJ (2006) *Leishmania* identification by PCR of Giemsa-stained lesion imprint slides stored for up to 36 years. Clin Microbiol Infect 12: 815–818.

Anexo 7. Artigo referente a resultados do Doutorado. Multiplex PCR as a tool for the diagnosis of *Leishmania* spp. kDNA and the gapdh housekeeping gene of mammal hosts. de Cássia-Pires R, de Melo MF, Barbosa RD, Roque AL. *PLoS One*. 2017 Mar 16; 12(3):e0173922. doi: 10.1371/journal.pone.0173922. eCollection 2017.

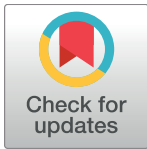
RESEARCH ARTICLE

Multiplex PCR as a tool for the diagnosis of *Leishmania* spp. kDNA and the gapdh housekeeping gene of mammal hosts

Renata de Cássia-Pires¹, Myllena de Fátima Alheiros Dias de Melo², Raquel da Hora Barbosa³, André Luiz Rodrigues Roque^{1*}

1 Laboratory of Trypanosomatid Biology, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **2** Laboratory of Molecular Biology and Endemic Diseases, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **3** Center of Medical Sciences, Biomedical Institute, Fluminense Federal University, UFF, Niterói, Rio de Janeiro, Brazil

* roque@ioc.fiocruz.br



OPEN ACCESS

Citation: de Cássia-Pires R, de Melo MdFAD, Barbosa RdH, Roque ALR (2017) Multiplex PCR as a tool for the diagnosis of *Leishmania* spp. kDNA and the gapdh housekeeping gene of mammal hosts. PLoS ONE 12(3): e0173922. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173922>

Editor: Henk D. F. H. Schallig, Academic Medical Centre, NETHERLANDS

Received: September 9, 2016

Accepted: February 28, 2017

Published: March 16, 2017

Copyright: © 2017 de Cássia-Pires et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: FAPERJ (E-26/102.172/2013), PAPES-FIOCRUZ (401764/2015-0) and CNPq (446468/2014-2) supported this study through research grants provided to ALRR, while RCP had scholarship supported by CNPq. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

Background

The PCR assays usually employed for *Leishmania* diagnosis does not simultaneously detect a constitutive gene that would certify the viability of the DNA sample. We present a multiplex PCR approach for the simultaneous diagnosis of the *Leishmania* sp. kDNA fragment and a catalytic domain segment of a conserved region of the mammalian gapdh gene.

Methodology

The proposed multiplex protocol was designed through *in silico* PCR. The annealing temperature, concentration of primer pairs, number of cycles, distinct polymerase enzymes and premix kit were defined to achieve an optimal reaction. The DNA detection sensitivity was tested with different concentrations of known *L. tropica* DNA, and the reproducibility of the assay was confirmed using samples from 106 wild mammals that were previously subject to *Leishmania* sp. kDNA analysis through singleplex reactions.

Principal findings

The following optimal conditions were established: 95°C for 1 min followed by 30 cycles of 95°C for 30 s, 61°C for 30 s, and 72°C for 30 s and a final extension at 72°C for 1 min. The multiplex PCR system was capable of detecting 0.1 ng of *L. tropica* diluted in 100 ng of mammalian DNA. Of 51 kDNA samples that were previously found to be positive, 45 (88.2%) were positive for both targets, two were positive only for kDNA and four were negative for both. Of 55 kDNA samples that were previously identified as negative, 38 (69.1%) were positive for gapdh whereas the other 17 were negative for both targets.

Conclusions/Significance

The proposed multiplex PCR system allows the simultaneous detection of the gapdh gene and *Leishmania* sp. kDNA in tissue samples derived from distinct wild mammal species.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

The amplification of the *gapdh* mammalian gene in the same reaction ensures the quality and viability of the DNA in the sample, eliminating the possibility of false-negative results that would impair an accurate description of the infection rates in a given population.

Introduction

Leishmaniases are a group of parasitic diseases caused by heteroxenous protozoans from the *Leishmania* genus (Ross 1903). This genus is composed of approximately 30 species, approximately 20 of which are described as pathogenic to humans [1]. *Leishmania* species are involved in complex transmission cycles that include domestic and/or wild mammals from nine different orders and dozens of insect vector species from the Phlebotominae family [2–3].

To overcome the limitations of the traditional parasitological methods (related to the difficulties associated with the isolation of parasites, usually due to a low parasite load and an irregular distribution among host tissues), molecular approaches aiming to detect *Leishmania* species directly in biological samples have been developed. The advantage of molecular approaches based on Polymerase Chain Reactions (PCRs) is the combination of high sensitivity for parasite detection in various human, animal and sand fly tissues with target specificity [4–5]. Additionally, the possibility of combining multiple targets in the same assay enables the identification of parasites and the evaluation of sample integrity and PCR performance in the diagnosis of infection from Phlebotominae sandflies in some studies [6–7]. The same approach, although proposed for mammals [8–9], is rarely employed because these studies sought to investigate infection by specific *Leishmania* species: namely *L. braziliensis* and *L. infantum*.

The kDNA is the most employed molecular target in the routine diagnosis of *Leishmania* infection because of its recognized high sensitivity and specificity for the detection of infection, and the use of this target allows parasite identification at the genus or, at most, subgenus level [10]. The genes responsible for expression of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gapdh* or G3PD) enzyme are present in all mammalian cells [11]. Thus, the detection of *gapdh* is a potential tool for controlling the quality of samples of mammalian tissues used for PCR. In the present study, we developed a multiplex PCR system that allows direct diagnosis from tissue fragments of different mammalian hosts by targeting a region of kinetoplast (kDNA) conserved in several species of the *Leishmania* genus and a constitutive gene (*gapdh*) of the mammal hosts.

Materials and methods

Ethics statement

All of the procedures carried out with these animals were authorized by the Brazilian Institute of Environment and Renewable Natural Resources (IBAMA) and followed protocols approved by the Ethics Committee of Animal Use of Fiocruz (P0007-99, P0179-03, P0292/06, and L0015-07). The non-infected human DNA used as a PCR control was kindly donated by Dr. Constança Britto and derived from studies approved by the Ethics Committee and conducted in the Laboratory of Molecular Biology and Endemic Diseases (IOC/Fiocruz).

Primer design and *in silico* analysis

A conserved region in the *gapdh* gene was used to design a primer pair that is able to detect DNA from several mammalian species, including wild animals. Considering the size of the

Leishmania sp. amplicon in kDNA reactions [120 base pairs (bp)], we aimed to obtain a mammalian conserved region to be in close proximity, and identified a region that could yield amplicons with 212 bp. Representative gapdh mammalian genomes (*Homo sapiens*—NM_001289745.1; *Pan troglodytes*—XM_508955.6; *Mus musculus*—NM_001289726.1; *Rattus norvegicus*—NM_017008.4; *Monodelphis domestica*—XM_007503905.1; *Equus caballus*—NM_001163856.1; *Felis catus*—NM_001009307.1; *Bos taurus*—NM_001034034.2; *Myotis lucifugus*—XM_006084148.2); *Leishmania* spp. genomes (*L. donovani*—13388249; *L. infantum*—5073932; and *L. mexicana*—13448275; and glycosomal gene sequences identified in various *Leishmania* species (*L. major*—5653844; *L. braziliensis*—5417820; *L. tarentolae*—DQ092549; *L. panamensis*—22577345; *L. infantum*—KF041811; and *L. lainsoni*—KP197180) were retrieved from the GenBank database and used in FASTA format to identify the conserved region. The sequences were aligned using CLC Workbench v.6 software (Qiagen, Valencia, CA, USA). The gapdh primer pair was designed with Primer3 software [12].

The phylogenetic relationship of the target gapdh sequence of mammals and *Leishmania* species was inferred using a Neighbor Joining (NJ) tree with 1,000 replicates that was constructed based on the Kimura 80 distance measure using the CLC-Main Workbench software 6.9.1 (Bio, Qiagen, Denmark). To infer similarity and minimize nonspecific detection, the oligonucleotides were compared with gapdh genes using the BLAST database search program (provided online by the National Center for Biotechnology Information—NCBI www.ncbi.nlm.nih.gov). An *in silico* analysis, which was conducted using the Multiple Primer Analyzer web tool from ThermoScientific™ (www.thermoscientific.com/webtools/multipleprimer) was also performed to evaluate the possibility of using the oligonucleotides in the multiplex reaction and dimer detection. The second primer pair used to amplify sequences of the *Leishmania* spp. kDNA conserved region was previously described [10] (Table 1).

DNA of control samples

Positive DNAs were obtained from spleen and liver fragments of hamsters infected with *L. braziliensis* (MHOM/BR/2000/LTCP13396 = IOC-L2483) [13]. DNA of samples from *Leishmania tropica* (MHOM/AZ/1958/STRAINOD) and *L. tarentolae* (LEXSInduce4 Expression Kit, Jena Bioscience, Jena, GE) were also used as positive controls. All parasites were derived from Fiocruz’ Institutional Collections: Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC) and Coleção de Protozoários (COLPROT). Negative controls were obtained from spleen and liver fragments of non-infected hamsters and non-infected DNA extracted from *Homo sapiens* blood and nail samples. Blood and nail samples were extracted using a QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). Tissue fragments and promastigote forms of *Leishmania* were extracted using a Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA). All procedures were performed according to the manufacturer’s recommendations.

Table 1. DNA sequence and genomic region of molecular targets employed in the multiplex PCR system.

Organism	Primer sense	Primer antisense	Genomic region	Fragment size (bp)	References
<i>Leishmania</i> sp. kDNA	5' GGG (G/T) AGGGGCGTTCT (C/G) CGAA-3'	5' (C/G) (C/G) (C/G) (A/T) CTAT (A/T) TTACACCAACCCC 3'	Mitochondrial, chromosome 26	120	Degrave et al., 1994
Vertebrate host DNA	5` ACCACAGTCCATGCCATCAC 3'	5` GTCAGGTCCACCCTGACAC 3'	Nuclear, chromosome 12	212	This study

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173922.t001>

Multiplex PCR standardization

All PCR standardizations were performed in 0.2-ml plastic tubes in a Mastercycler Nexus Thermal Cycler (Eppendorf[™], Hamburg, Germany) using the DNA control samples mentioned above. A premix volume sufficient for the number of reactions was prepared, and this premix consisted of 2 μ L of DNA template in a final volume of 25 μ L.

PCR standardization was initiated with a touchdown PCR protocol [14] to verify the ideal conditions for amplifying the *gapdh* target fragment. Gradient PCR with temperatures ranging from 57°C to 61°C was performed using both pairs of primers (kDNA and *gapdh*). The PCR mix contained 10X buffer, 0.4 mM of each deoxyribonucleoside triphosphate (dNTPs), 1.25 U of Taq DNA polymerase (G008, abm[®]) and 10 μ M of each primer.

Using an annealing temperature of 61°C and maintaining the remaining reagent concentrations, we tested different concentrations of each primer pair (ranging from 5 to 25 μ M) in the same reaction. The reactions were performed using the following conditions: 95°C for 1 min followed by 40 cycles of 95°C for 30 s, 61°C for 30 s, and 72°C for 30 s and a final extension at 72°C for 1 min. These tests were also performed with and without the addition of 5% dimethyl sulfoxide (DMSO).

With the optimal concentrations kDNA and *gapdh* primers of 15 and 5 μ M, respectively, the amplification efficiency was tested using the Taq DNA polymerase enzymes (ABM[®]) and FidelityTaq PCR Master Mix (Affymetrix, USB). In both of these tests, we reduced the number of cycles from 40 to 30 without changing the remaining conditions. Finally, we compared the success of the multiplex PCRs with that of the reactions using premix Ready-To-Go PCR beads (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK).

Sensitivity test

The sensitivity of DNA detection by multiplex PCR was defined by employing DNA from *L. tarentolae*, *L. tropica* and *H. sapiens* using mixtures consisting of a constant concentration of human DNA (100 ng) and different concentrations of *L. tropica* DNA (100, 50, 10, 5, 1, and 0.1 ng). The *L. tarentolae* DNA was used to control the specificity of the *gapdh* gene.

Multiplex PCR reactions with samples from wild mammals

After establishing the multiplex PCR system using the control DNA samples, we tested its reproducibility using samples of different tissues from 106 wild mammals (Table 2). All of these samples had been previously tested for *Leishmania* sp. kDNA in singleplex reactions using the same primers and conditions in a previous study [13], and the results revealed that 51 and 55 of these samples were positive and negative, respectively.

Gel electrophoresis and documentation

The PCR products were visualized after electrophoresis on an 8% polyacrylamide gel and subjected to silver staining using a kit (DNA Silver Staining, GE Healthcare). A 50-bp DNA ladder (Promega, Madison, WI, USA) was employed as the base pair length marker, and gel pictures were taken using a GS-800[™] Calibrated Densitometer (Bio-Rad, CA, USA).

Results

The analysis of the genetic similarity among *gapdh* genes emphasized the importance of the coding sequence (CDS) segment and the catalytic domain. This gene, which is present as a single copy and has been mapped to chromosome 12 in the *Homo sapiens* genome [15], showed a high density of sequences that were conserved among its orthologous genes (S1 Fig). Using the

Table 2. Details of the samples employed to validate the multiplex PCR system: Mammal order, geographic origin and tissue from wild mammalian hosts previously diagnosed with *Leishmania* spp. infection using a singleplex reaction.

Mammal Order	Federal Unit	Tissue Fragment	kDNA (+)	kDNA (-)
Chiroptera	Paraíba	Li (7); Sk (9); Spl (16)	Li (7); Sk (7); Spl (14)	Sk (2); Spl (2)
	Rio de Janeiro	Spl (2)	Spl (1)	Spl (1)
	Santa Catarina	Spl (2)	0	Spl (2)
Didelphimorphia	Bahia	Spl (1)	Spl (1)	0
	Goiás	Li (8); Sk (4)	Li (1)	Li (7); Sk (4)
	Paraíba	Li (1); Sk (1); Spl (18)	0	Li (1); Sk (1); Spl (18)
	Rio de Janeiro	Spl (1)	0	Spl (1)
Lagomorpha	Paraíba	Li (1); Sk (1)	Li (1); Sk (1)	0
Rodentia	Bahia	Spl (2)	Spl (2)	0
	Goiás	Li (6); Sk (8)	Li (1)	Li (5); Sk (8)
	Mato Grosso do Sul	Spl (10)	Spl (8)	Spl (2)
	Paraíba	Li (1)	0	Li (1)
	Piauí	Spl (7)	Spl (7)	0
		N = 106	N = 51	N = 55

Li: Liver; Sk: Skin; Spl: Spleen

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173922.t002>

information obtained from the alignment of the mammalian *gapdh* sequences, two candidate oligonucleotide primers were proposed for amplifying a segment of approximately 212 bp from the catalytic domain. The alignment of the target *gapdh* sequence (212 bp) showed that 122 (57%) nucleotides were conserved in different species (bar plot height variation, Fig 1A), and 167 (79%) nucleotides were conserved in mammal sequences (Fig 1A). The target *gapdh* sequence (212 bp) of mammal and *Leishmania* species diverged into two clearly separate branches, as illustrated in the phylogenetic tree (Fig 1B). In addition, despite an *in silico* analysis showed a high sequence identity (more than 90%) between the *gapdh* oligonucleotides and the representative of *gapdh* sequences (S1 Table), the results of total score, coverage and e-value using *Leishmania* *gapdh* sequences were lower than mammal *gapdh* data, which suggested low probability of hybridization with different *Leishmania* DNA samples. These oligonucleotides can be combined with the *Leishmania* spp. kDNA in a multiplex assay because no specificity is lost by alignment with their specific targets, resulting in a lack of dimer detection.

The temperature was the first aspect of the multiplex reaction that we standardized, and the results revealed a temperature of 61 °C was demonstrated to be more effective for annealing both pairs of primers with their respective target sequences. Nevertheless, the PCR conditions established at this temperature and with 40 cycles sometimes resulted in some non-specific bands (approximately 400 bp), which are heavier than those of the targets of interest. The addition of 5% DMSO eliminated almost all non-specific bands.

After testing different concentrations of each primer, the best optimal conditions for amplification of both primers were identified using concentrations of the *gapdh* target and the kDNA equal to 5 and 15 µM, respectively. The reactions were successfully employed using two different Taq enzymes; however, the use of the Taq DNA polymerase enzyme (ABM®) showed some unspecific heavier than the fragments of interest, whereas a slightly better resolution was obtained using the Fidelity Taq PCR Master Mix (Affymetrix, USB) with a cycling profile of only 30 cycles (Fig 2). Once the conditions and cycling profile of the multiplex PCR assay were established, the reactions were also tested using Premix PuReTaq Ready-To-Go PCR beads, and the results were similar to those obtained from the amplifications performed with the Fidelity Taq PCR Master Mix (Affymetrix, USB). We were able to detect up to 0.1 ng of

A

ACCACAGTCCATGCCATCAC



B

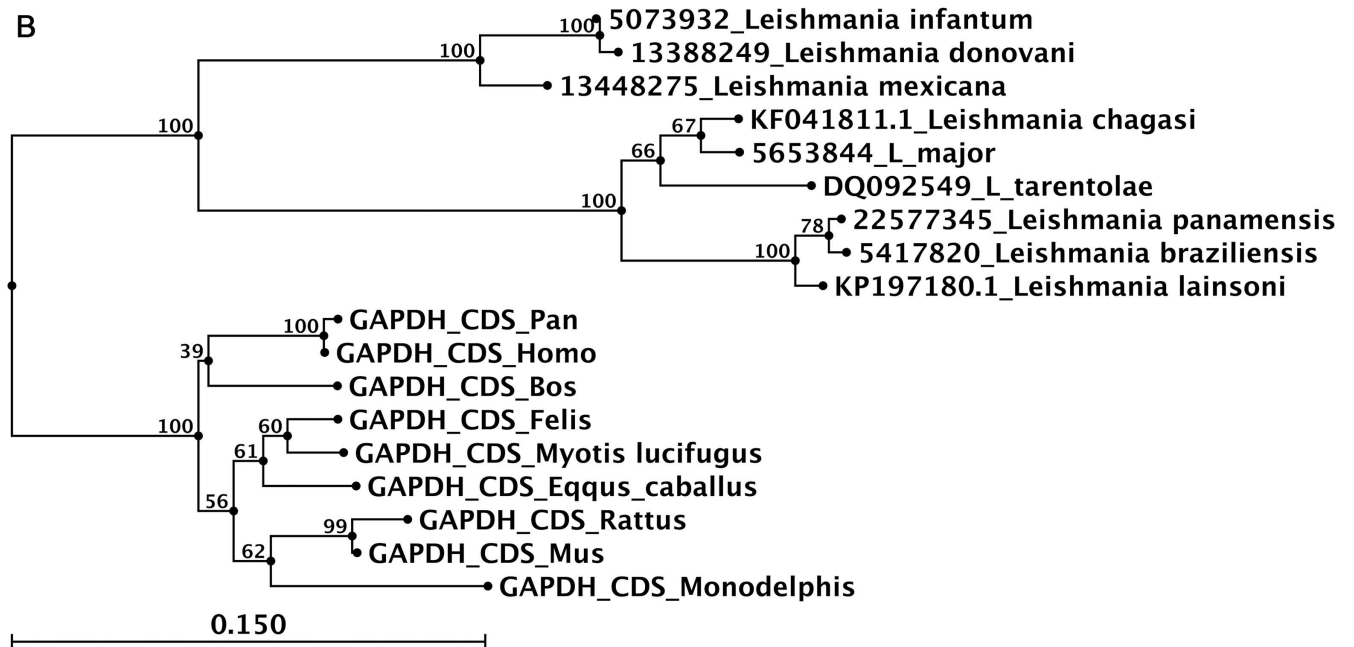


Fig 1. gapdh alignment among mammal and *Leishmania* species and phylogenetic tree of the gapdh sequences. (A) Multiple alignment of the target gapdh segment (212 bp) of different mammals and *Leishmania* phylogeny using ClustalW in CLC-Main Workbench software (6.9.1). All sequences were accessed from the NCBI and EMBL-EBI databases using UniProt and InterPro resources. The alignment showed 122 (57%) nucleotides that were conserved in different species, whereas 167 (79%) were conserved in mammal sequences (variable height in the bar plot). (B) A phylogenetic tree of the target gapdh sequence (212 bp) of different mammal and *Leishmania* species based on the neighbor joining method

showed two divergent branches: mammals and *Leishmania* clusters. Arrows—localization and orientation of each primer in the alignment; bar plot—nucleotide conservation; consensus—sequence generated through the most conserved nucleotides between all aligned sequences; tree parameters: neighbor joining tree with 1,000 replicates and constructed based on the Kimura 80 distance measure using CLC-Main Workbench software (6.9.1).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173922.g001>

Leishmania sp. DNA from *L. tropica* diluted in 100 ng of mammalian DNA. Only the corresponding *gapdh* and kDNA bands were observed in human and *Leishmania* samples, respectively (Fig 3).

One hundred six wild mammalian samples were tested using the PuReTaq Ready-To-Go PCR beads (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) with the following conditions: 95°C for 1 min followed by 30 cycles of 95°C for 30 s, 61°C for 30 s, and 72°C for 30 s, and a final extension at 72°C for 1 min. Of 51 samples that were previously found to be positive for the kDNA target through singleplex reactions, 45 (88.3%) amplified both pair of primers, as expected. Two liver samples (one from a marsupial and one from a rodent) were positive only for the kDNA target. The four remaining samples (three derived from bat's skin and one obtained from a fragment of rodent spleen) were negative for both primer sets, and this result was likely due to DNA degradation after the singleplex reaction, which had been performed four years before. Of the 55 samples that were previously found to be negative for the kDNA target, all yielded negative results in the multiplex reactions, but only 38 of these (69.1%) tested positive for the *gapdh* control, suggesting that the remaining 17 samples had degraded, and are thus prone to yield false-negative results (Table 3). The 21 mammal samples (17 and four that were previously considered positive and negative, respectively) that were found to be negative for both targets using the multiplex PCR were tested again using through a singleplex PCR for *Leishmania* sp. kDNA and this re-testing yielded negative results.

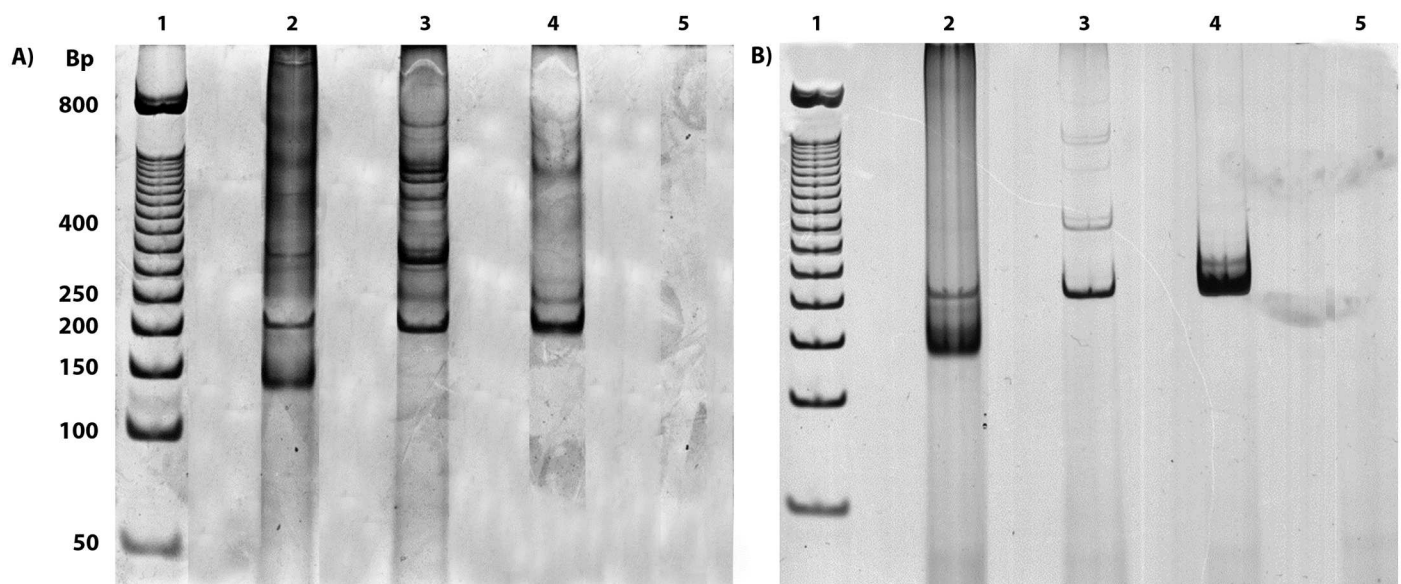


Fig 2. Silver-stained electrophoresis polyacrylamide gel obtained from the amplification of *gapdh* and kDNA with the multiplex PCR system. (A) PCR products from the multiplex PCR system using Taq DNA polymerase enzymes (ABM[®]) in the presence of 5% DMSO. (B) PCR products from the multiplex PCR system using the FidelityTaq PCR Master Mix (Affymetrix, USB). In both figures: 1. molecular-weight marker (50-bp DNA ladder); 2. infected rodent; 3. uninfected rodent; 4. human DNA; and 5. negative PCR control.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173922.g002>

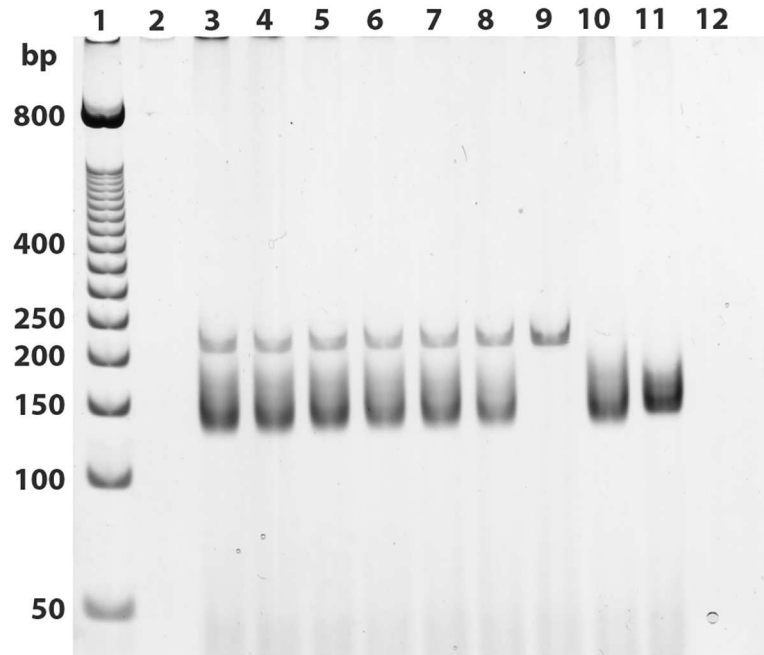


Fig 3. Silver-stained electrophoresis polyacrylamide gel obtained from the sensitivity test for detecting *Leishmania* sp. DNA with a constant concentration of human DNA (100 ng). 1: molecular-weight marker (50-bp DNA ladder); 2: empty; 3–8: mixture of human DNA and 100 (3), 50 (4), 10 (5), 5 (6), 1 (7) and 0.1 (8) ng of *L. tropica*; 9: uninfected rodent; 10: *Leishmania tropica* DNA; 11: *Leishmania tarentolae* DNA; and 12: Negative control for the PCR.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173922.g003>

Discussion

Molecular tools for the diagnosis of *Leishmania* infections are routinely employed for humans, vectors, and wild and domestic mammalian samples [6,13,16–17]. This intracellular parasite is heterogeneously distributed in mammal tissues and is usually described in low parasite loads, at least in wild mammals [2]. For this reason, targets directed to the conserved region of

Table 3. Amplification of the molecular targets used in the multiplex PCR system using samples from wild mammalian hosts.

Order	Tissue	(+) for both targets	(-) for kDNA and (+) for gapdh	(-) for both targets	(+) for kDNA and (-) for gapdh
Chiroptera	Li	7	0	0	0
	Sk	4	2	3	0
	Spl	15	5	0	0
Didelphimorphia	Li	0	8	0	1
	Sk	0	5	0	0
	Spl	1	15	4	0
Lagomorpha	Li	1	0	0	0
	Sk	1	0	0	0
	Spl	0	0	0	0
Rodentia	Li	0	0	6	1
	Sk	0	1	7	0
	Spl	16	2	1	0
		N = 45	N = 38	N = 21	N = 2

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173922.t003>

Leishmania kDNA are the most employed due to their high sensitivity of detection, which is a result of the estimated 10–20 thousand mini-circle copies of kDNA in each parasite cell [18]. Despite the high sensitivity of this molecular target, false-negative results could be related to inappropriate DNA extraction and/or DNA degradation after extraction, and these false-negative results impact the calculation of infection rates, resulting in underestimation and sometimes minimization of a serious public health problem. Based on the high sensitivity of the kDNA target, we proposed a molecular test that maintains the detection sensitivity for *Leishmania* sp. DNA while simultaneously evaluating the sample integrity by detecting a constitutive mammalian gene as an internal reaction control.

Many housekeeping genes (such as the mammal *gapdh* gene) can be used as an internal control for sample viability in molecular assays [19–20]. Here, we designed new oligonucleotides capable of amplifying smaller fragments of the *gapdh* gene that can be used in combination with a primer pair targeting *Leishmania* kDNA without affecting the PCR conditions. These proposed oligonucleotides amplified a highly conserved region of the catalytic domain, with a degree of specificity that enables its application to different mammalian samples that show more than 90% identity among sequences from the GenBank database and no cross-reaction with *Leishmania* genomes was noted.

Despite the excellent sensitivity of the Fidelity Taq[®] enzyme, their use in our standardization showed no significant differences between this enzyme and the common Taq DNA enzymes. The use of PCR premix beads (PuReTaq Ready-To-Go PCR beads[®]) allows greater reproducibility and lessens the chance of contaminating the reactions due to decreased reagent handling and higher control over the concentrations of each reagent employed [13,21]. As determined through dilution of the known concentrations of *Leishmania* sp. DNA, we were able to amplify 0.1 ng of *Leishmania* diluted in 100 ng of mammalian DNA with high efficiency. The detection limit of these tests, in addition to the results obtained from the validation test with wild mammalian samples, showed that the multiplex PCR system proposed herein can be universally employed for the diagnosis of *Leishmania* infection in mammalian tissues, without any loss of efficiency.

To the best of our knowledge, only two published manuscripts present multiplex PCR tools for the diagnosis of *Leishmania* infections and a concomitantly evaluation of sample viability through the detection of the mammalian *gapdh* sequence. One of these studies focused on *L. braziliensis* [9], and the other investigated both *L. braziliensis* and *L. infantum* [8]. In contrast, the multiplex system described in this manuscript is able to detect any species within the *Leishmania* genus direct in tissues, independent of symptoms or suspicion of infection by one or other *Leishmania* species. The *Leishmania* genus comprises more than 30 species [1], and almost all of these circulate in the wild in complex cycles maintained by several potential reservoir species [2]. The *Leishmania* species that infect wild mammals or vectors in the wild might be quite different from the currently accepted distribution map of *Leishmania* species, which is based only on human and/or canine infection [13,22]. The herein proposed multiplex system can be applied for the identification of other *Leishmania* species rather than only *L. braziliensis* or *L. infantum* in any wild mammal host, independent of the geographic region or local epidemiological characteristics.

In addition, the multiplex system presented herein displayed high applicability for the detection of *Leishmania* sp. infection, regardless of the tissue fragment and/or mammal host. Four samples that were previously found to be positive for kDNA through singleplex PCR, which were stored in a freezer at -20°C, were not amplified again, through neither a multiplex reaction nor a new singleplex reaction. For the other 17 samples, the *gapdh* target was not amplified, which could be the result of inefficient DNA extraction or DNA degradation after extraction. Both of these cases should be assumed to yield false-negative results and should not

be included in the calculation of infection rates. Among the samples that were negative for both targets, 47.7% (11/21) were derived from skin. Less DNA is usually extracted from skin samples compared with the spleen and liver, and this DNA is likely more susceptible to integrity loss due to DNA degradation.

The testing of two liver samples from two animals [one rodent (*Calomys expulsus*) and one marsupial (*Gracilianus agilis*)] using the multiplex system yielded positive results only for the kDNA target. These samples likely contained a huge amount of *Leishmania* DNA, and the competition between the primer pairs resulted in the amplification of only the *Leishmania* sp. target, because the conditions of the multiplex reaction favor amplification of kDNA over the *gapdh* gene. Multiplex PCR systems are always subject to competition between the primer sets used and their respective target sequences [9]. Although *gapdh* amplification was not detected in these two samples (1.9%), this result did not interfere with the main goal of the proposed multiplex system, which is to detect the housekeeping *gapdh* gene in negative samples, because the viability of DNA in the samples that show *Leishmania* kDNA, amplification is confirmed with detection of the infection.

The multiplex PCR system proposed herein allows for the simultaneous detection of a constitutive mammalian gene (*gapdh*) and *Leishmania* sp. kDNA in tissue samples derived from distinct wild mammal species. kDNA is the most employed target in the detection of *Leishmania* sp. infection due its high copy number in each cell [10], and we included detection of the mammal *gapdh* sequence under the conditions established for parasite detection. Our multiplex system constitutes a screening method of the diagnosis of *Leishmania* infection because it eliminates false-negative results. At a subsequent moment, and focusing only on the positives samples from the first assay, identification of the *Leishmania* species can be achieved using appropriate molecular targets [13,23]. In this study, we confirmed the viability of DNA in the samples and, when positive, detected *Leishmania* kDNA in tissue samples from humans, experimentally infected rodents and different species of naturally infected wild mammals. The multiplex system presented herein can be incorporated for routine *Leishmania* sp. molecular diagnosis in mammalian samples.

Supporting information

S1 Fig. Multiple alignment of catalytic *gapdh* genes from different mammals and *Leishmania* species. The selected genes from *L. donovani*—13388249; *L. infantum*—5073932 and *L. mexicana*—13448275 encode cytosol isoenzymes, whereas the selected genes from *L. major*—5653844; *L. braziliensis*—5417820; *L. tarentolae*—DQ092549; *L. panamensis*—22577345; *L. chagasi*—KF041811 and *L. lainsoni*—KP197180 encode glycosomal isoenzymes. All species were structurally aligned using ClustalW in CLC—Workbench software (version 6), and all sequences were accessed from the NCBI and EMBL-EBI databases using UniProt and InterPro resources. Light grey—catalytic domain for each *gapdh* sequence; Dark Grey—localization of each primer in the alignment: Forward (ACCACAGTCCATGCCATCAC) and reverse (GTCAGGTCCACCACTGACAC). Bar plot—nucleotide conservation; consensus—sequence generated through the most conserved nucleotides between all aligned sequences. (TIF)

S1 Table. In silico analysis of sequence identity between the *gapdh* oligonucleotides designed in the present study and representative *gapdh* sequences of mammals and *Leishmania* species. (DOCX)

Acknowledgments

The authors are thankful to the staff of the Laboratory of Trypanosomatid Biology and the Laboratory of Biology and Parasitology of Wild Mammal Reservoirs for the capture and supply of the tissue fragments from wild hosts. We also offer thanks to Dra. Fabiana Lopes Rocha, Msc. Elida Vasconcelos and Edilene Pontes for kindly providing some of the DNA samples used in this work. The authors also thank to Dr. Isabel Di Azevedo for the help provided with the development of the figures.

Author Contributions

Conceptualization: RCP RHB ALRR.

Data curation: RCP RHB ALRR.

Formal analysis: RCP MFADM RHB ALRR.

Funding acquisition: ALRR.

Investigation: RCP MFADM RHB ALRR.

Methodology: RCP RHB ALRR.

Project administration: RCP RHB ALRR.

Resources: ALRR.

Supervision: ALRR.

Validation: RCP MFADM RHB.

Visualization: RCP MFADM RHB ALRR.

Writing – original draft: RCP MFADM RHB ALRR.

Writing – review & editing: RCP MFADM RHB ALRR.

References

1. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2004; 27: 305–318 <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2004.03.004> PMID: 15225981
2. Roque AL and Jansen AM. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *Int J Parasitol Parasites Wildl*. 2014; 3:251–62. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2014.08.004> PMID: 25426421
3. Brazil RP, Fuzari A, Andrade Filho JD. Sand Fly Vectors of *Leishmania* in the Americas—A Mini Review. *Entomol Ornithol Herpetol*. 2015; 4: 144.
4. Akhavan AA, Mirhendi H, Khamesipour A, Alimohammadian MH, Rassi Y, Bates P, et al. *Leishmania* species: detection and identification by nested PCR assay from skin samples of rodent reservoirs. *Exp Parasitol*. 2010; 126:552–556. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.06.003> PMID: 20566364
5. Paiva-Cavalcanti M, Régis-da-Silva CG, Gomes YM: Comparison of real-time PCR and conventional PCR for detection of *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* infection: a mini-review. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2010; 16: 537–542
6. Jorquera A, González R, Marchán-Marcano E, Oviedo M, Matos M. Multiplex-PCR for detection of natural *Leishmania* infection in *Lutzomyia* spp. captured in an endemic region for cutaneous leishmaniasis in state of Sucre, Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005; 100: 45–48. <https://doi.org/S0074-02762005000100008> PMID: 15867962
7. de Pita-Pereira D, Cardoso MAB, Alves CR, Brazil RP, 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 Tropica*. 2008; 107: 66–69. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.04.015> PMID: 18502392

8. Gonçalves SC, Régis-da-Silva CG, Brito MEF, Brandão-Filho SP, Paiva-Cavalcanti M. Application of the mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene for sample quality control in multiplex PCR for diagnosis of leishmaniasis. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2012; 18: 188–197.
9. Gonçalves-de-Albuquerque SC, Pessoa e Silva R, Morais RCS, Trajano-Silva LAM, Régis-da-Silva CG, Brandão-Filho SP, et al. Tracking false-negative results in molecular diagnosis: proposal of a triplex-PCR based method for leishmaniasis diagnosis. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2014; 20: 16 <https://doi.org/10.1186/1678-9199-20-16> PMID: 24808911
10. Degrave W, Fernandes O, Campbell D, Bozza M, Lopes UG. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*—a mini-review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1994; 89: 463–469. PMID: 7476234
11. Gilsbach R, Kouta M, Bönisch H, Brüss M. Comparison of in vitro and in vivo reference genes for internal standardization of real-time PCR data. *Biotechniques*. 2006; 40:173–177. PMID: 16526406
12. Rozen S and Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol. Biol*. 2000; 132, 365–386. PMID: 10547847
13. Cássia-Pires R, Boité MC, D’Andrea PS, Herrera HM, Cupolillo E, Jansen AM, et al. Distinct *Leishmania* species infecting wild caviomorph rodents (Rodentia: Hystricognathi) from Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 8(12):e3389. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003389> PMID: 25503973
14. Korbie DJ, Mattick JS. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity. *Nat Protoc*. 2008; 3:1452–1456. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.133> PMID: 18772872
15. Ercolani L, Florence B, Denaro M, Alexander M. Isolation and Complete Sequence of a Functional Human Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Gene. *J Biol Chem*. 1988 263:15335–15341. PMID: 3170585
16. Floeter-Winter LM, Uliana SRB. Molecular Biology applied to parasitology: The ribosomal cistron as a tool in phylogenetic and taxonomic studies and as a model for gene expression analysis. *Ciência e Cultura (SBPC)*, 1993; 45: 210–215.
17. Assis J, de Queiroz NM, da Silveira Rde C, Nunes CM, Oliveira TM, Junior AC, et al. Comparative study of diagnostic methods for visceral leishmaniasis in dogs from Ilha Solteira, SP. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2010; 19: 17–25. PMID: 20385055
18. Simpson L. Structure and function of kinetoplast DNA. *J Protozool*. 1973; 20: 2–8. PMID: 4571786
19. Stephens AS, Stephens SR, Morrison NA. Internal control genes for quantitative RT-PCR expression analysis in mouse osteoblasts, osteoclasts and macrophages. *BMC Res Notes*. 2011; 4:410. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-410> PMID: 21996334
20. Shi C, Yang F, Zhu X, Du E, Yang Y, Wang S, et al. Evaluation of Housekeeping Genes for Quantitative Real-Time PCR Analysis of *Bradysia odoriphaga* (Diptera: Sciaridae). *Int J Mol Sci*. 2016; 17(7).
21. Roque ALR, Cupolillo E, Marchevsky RS, Jansen AM. *Thrichomys laurentius* (Rodentia; Echimyidae) as a Putative Reservoir of *Leishmania infantum* and *L. braziliensis*: Patterns of Experimental Infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010; 4: 1–8.
22. Brito ME, Andrade MS, Mendonça MG, Silva CJ, Almeida EL, Lima BS, Félix SM, et al. Species diversity of *Leishmania* (*Viannia*) parasites circulating in an endemic area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil. *Trop Med Int Health* 2009; 14:1278–1286. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2009.02361.x> PMID: 19708899
23. Castilho T, Shaw J, Floeter-Winter L. New PCR assay using glucose-6-phosphate dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. *J Clin Microbiol*. 2003; 41: 540–546. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.2.540-546.2003> PMID: 12574243