

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINARIA
CAMPUS ARAÇATUBA

**Morcegos como hospedeiros de *Leishmania* spp. em
áreas endêmicas para leishmaniose visceral**

Fernanda Müller de Oliveira
Médica Veterinária

Araçatuba – SP
2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS ARAÇATUBA

**Morcegos como hospedeiros de *Leishmania* spp. em
áreas endêmicas para leishmaniose visceral**

Fernanda Müller de Oliveira

Orientadora Prof^a. Adj. Cárís Maroni Nunes

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP, campus Araçatuba, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

Araçatuba-SP

2012

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Morcegos como hospedeiros de Leishmania spp. em áreas endêmicas para
leishmaniose visceral.

AUTORA: FERNANDA MÜLLER DE OLIVEIRA

ORIENTADORA: Dr.^a CÂRIS MARONI NUNES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal) pela Comissão Examinadora.


Dr.^a ELISA SAN MARTIN MOURIZ SAVANI


Dr.^a VALÉRIA MARÇAL FÉLIX DE LIMA


Dr.^a CÂRIS MARONI NUNES

DATA DA REALIZAÇÃO: 06 de julho de 2012.


Presidente da Comissão Examinadora
Dr.^a CÂRIS MARONI NUNES
- Orientadora -

Catálogo na Publicação (CIP)
Serviço de Biblioteca e Documentação – FMVA/UNESP

Oliveira, Fernanda Müller de

O482m

Morcegos como hospedeiros de *Leishmania* spp. em áreas
endêmicas para leishmaniose visceral /Fernanda Müller de Oliveira.
Araçatuba: [s.n], 2012
54f. il.; CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Medicina Veterinária, 2012

Orientadora: Prof^a. Adj. Cárís Maroni Nunes

1. Leishmaniose-diagnóstico 2. Diagnóstico molecular 3. Relação
hospedeiro parasito 4. DNA de cinetoplasto 5. Reação em cadeia de
polimerase

CDD 636.089444

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Fernanda Müller de Oliveira – nascida na cidade de Limeira - SP em 08 de abril de 1985. Possui graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), campus de Araçatuba, São Paulo, em dezembro de 2008. Realizou iniciação científica na área de Zootecnia no Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal (DAPSA) na UNESP, campus Araçatuba e estágio curricular na Central de Vigilância Epidemiológica, CVE, em São Paulo. Possui especialização em MBA em Gestão Estratégica de Negócios, pela Anhanguera Educacional, em setembro de 2010, com a monografia intitulada “Gestão Estratégica do Sistema Único de Saúde” (SUS). Possui 03 resumos apresentados em congressos nacionais e 02 em congressos internacionais.

**“Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida com paixão,
perder com classe e vencer com ousadia, pois o triunfo
pertence a quem se atreve...
A vida é muito para ser insignificante.”**

Charles Chaplin

**“E se o amor estiver presente, as demais virtudes serão acompanhantes
e assim, o melhor acontecerá”.**

Fernanda Müller de Oliveira

DEDICATÓRIA

À minha avó materna Lourdes Gonçalves da Silva Müller (*In memoriam*)
que deixou muitas saudades.

Aos meus pais Marcos e Lindinalva, pelo apoio, pelo amor, por sempre
terem feito o melhor possível.

À minha irmã, Flávia Müller de Oliveira, companheira, incentivadora e
confidente.

E aos que torceram por mim e me ajudaram nesta trajetória.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente ao meu pai Marcos, a minha mãe Lindinalva e a minha irmã Flávia, que são exatamente tudo para mim, é inexplicável o amor, incondicional o apoio recebido e por tanto, torna-se impossível retribuir à altura tamanha dedicação. São a melhor parte de mim e a inspiração que tenho para prosseguir e acreditar que sempre há algo para aprender na vida e que devo ser uma pessoa do bem. Obrigada!

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), campus de Araçatuba, especialmente ao programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.

À minha querida orientadora, Professora Cárís Maroni Nunes, pela aceitação, por seu apoio, pelos ensinamentos, pela paciência, por seu profissionalismo, por ser tão humana e por seu notável entusiasmo e brilhantismo.

Aos meus amigos: Priscilla de Moraes Salvador, Silvana de Cássia Paulan, Jean Silva Paulo, Juliana Pereira Gamba, Hení Falcão, Juliana Tessália Wagatsuma e Acácio Duarte Pacheco por todo carinho recebido, cada qual foi participante de momentos cruciais de minha vida e sempre me estenderam a mão ou me escutaram na hora que mais precisei de um amigo.

Às queridas companheiras Fulvia Di Pillo e Érica de Souza Ribeiro Chapenotti por toda paciência e os ensinamentos recebidos.

Aos graduandos, Thainá Landim de Barros e Luis Henrique Camargo Costa pela ajuda na realização das tarefas laboratoriais e por terem sido tão responsáveis e solícitos.

Aos meus queridos companheiros do laboratório Adriana Santana Do Carmo, Yuri Tani Utsonomyia, Diego Pacheco dos Santos, Ludmilla Balbo Zavarez, Samuel Carvalho de Aragão e Carolina Belloti. Também em especial, pelo convívio e apoio do ilustre Professor Dr. José Fernando Garcia.

Ao meu primo Vinícius Müller pela disposição e carinho com que participou de momentos importantes de minha vida.

À toda família querida que esteve presente de alguma forma e à minha queridinha Lilica, assim como ao Bethoven, Bidú, Filomena, Josezinho e Tom... por toda graciosidade e pelo simples fato de alegrarem a minha vida com o mais sincero olhar.

À Deus, Pai e Criador, pelo caminho e a vida!

A todos que participaram deste mestrado direta ou indiretamente.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	12
RESERVATÓRIOS E OS MORCEGOS	14
IDENTIFICAÇÃO DE <i>LEISHMANIA</i> SPP. EM HOSPEDEIROS	17
REFERÊNCIAS	21
 CAPÍTULO 2 – DETECÇÃO DE <i>Leishmania chagasi</i> E <i>Leishmania amazonensis</i> EM MORCEGOS DE ÁREAS URBANAS ENDÊMICAS PARA LEISHMANIOSE VISCERAL.....	34
INTRODUÇÃO	35
MATERIAL E MÉTODOS	36
Área de estudo e coleta de amostras.....	36
Amostras	37
Extração e quantificação de DNA	37
Controles das reações de PCR	37
PCR convencional para identificação de DNA de <i>Leishmania</i> spp.....	38
“Nested”- PCR para identificação de DNA de <i>Trypanosoma</i> spp.	38
Diferenciação das espécies de <i>Leishmania</i> spp.....	40
“Nested” SSU rDNA PCR.....	40
ITS-PCR-RFLP.....	40
Análise estatística.....	41
RESULTADOS.....	41
Diferenciação das espécies de <i>Leishmania</i>	44
DISCUSSÃO	46
CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS	49

Morcegos como hospedeiros de *Leishmania* spp. em áreas endêmicas para leishmaniose visceral

RESUMO – A leishmaniose visceral é uma doença em franca expansão no Brasil e que tem a participação de algumas espécies animais na manutenção de seu ciclo. Este trabalho objetivou investigar a presença de *Leishmania* spp. em morcegos de área endêmica para leishmaniose visceral e investigar a participação destes animais como possíveis reservatórios desta zoonose. Avaliou-se a presença de DNA dos parasitas, por meio da PCR, em amostras de baço e pele de 375 quirópteros originários de 19 cidades do Estado de São Paulo, Brasil, áreas endêmicas e com transmissão intensa para leishmaniose visceral. A amplificação de kDNA de *Leishmania* spp. por PCR foi positiva em 4,53% dos quirópteros, sendo que a maior positividade foi observada em amostras de baço (94,1%) e dois animais foram positivos tanto para amostras de pele como de baço; a presença de DNA do gene SSU 18S rRNA de *Trypanosoma* spp., também investigada, foi positiva em 4,53% das amostras sendo 23,5% positivas somente na amostra de baço, 76,5% somente na amostra de pele. Um animal apresentou positividade tanto para *Leishmania* spp. como para *Trypanosoma* spp. Os resultados indicam a ocorrência de *Leishmania* spp. em quirópteros da área endêmica para leishmaniose visceral, indicando a possibilidade de serem reservatórios desta zoonose.

Palavras-chave: Leishmaniose-diagnóstico; Diagnóstico molecular; Relação hospedeiro-parasito; DNA de cinetoplasto; Reação em cadeia de polimerase.

Bats as *Leishmania* spp. hosts in visceral leishmaniasis endemic areas

SUMMARY – Visceral leishmaniasis is a disease with increasing incidence in Brazil and that has some animal species contributing to its maintenance. This study aimed at investigating the presence of *Leishmania* spp. in bats from an endemic area for visceral leishmaniasis, in order to assess its participation as possible potential reservoirs for this zoonosis. We collected spleen and skin samples of 375 bats from 19 cities in the State São Paulo, Brazil, areas of intense visceral leishmaniasis transmission. kDNA *Leishmania* spp. amplification by PCR was positive in 4.53% bats and a higher positivity was seen in spleen samples (94.1%); two bats were positive for both skin and spleen samples. *Trypanosoma* spp. genomic DNA amplification was also investigated and 4.53% of the samples were positive, 23.5% of these were positive only for spleen, 76.5% for skin. One bat was positive for both *Leishmania* spp. and *Trypanosoma* spp. DNA amplification. These results demonstrate the occurrence of *Leishmania* spp. in bats from endemic area for visceral leishmaniasis, indicating the possibility of these being reservoirs of this zoonosis.

Key-words: Leishmaniasis-diagnosis; Molecular diagnostics; Host-parasite relationship; Kinetoplast DNA; Polymerase chain reaction.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

A leishmaniose é uma zoonose endêmica em franca expansão no Brasil, de difícil controle e considerada um importante problema de Saúde Pública (BRASIL, 2006). É causada por protozoários digenéticos pertencentes ao sub-reino Protozoa, ordem Kinetoplastida, família *Trypanosomidae*, do gênero *Leishmania* (DESJEUX, et al., 2004). Na América do Sul, as leishmânias estão agrupadas em dois subgêneros, *Leishmania* (*Leishmania*) e *Leishmania* (*Viannia*) (GRAMICCIA e GRADONI, 2005), assim classificadas segundo o desenvolvimento das formas promastigotas no intestino do vetor, já que o ciclo de vida destes parasitas requer a alternância entre um inseto flebotômico e um mamífero hospedeiro (GOSSAGE, et al., 2003). A maioria das espécies de *Leishmania* (subgênero *Leishmania*) é parasita da região suprapilária, com desenvolvimento restrito no intestino médio; já as espécies do Novo Mundo, subgênero *Viannia*, como a *Leishmania braziliensis*, são parasitas peripilários, se desenvolvendo entre o intestino posterior antes da migração para o intestino médio (KAMHAWAI, 2006).

Os principais vetores das Leishmânias são os flebotômicos, sendo os do gênero *Lutzomyia*, associado à transmissão nas Américas. Durante o repasto sangüíneo, as formas promastigotas metacíclicas (formas infectantes) são depositadas na pele do hospedeiro e os parasitas são rapidamente capturados, principalmente por macrófagos, e em seguida, diferenciados na forma amastigota, intracelular obrigatória, infectando o hospedeiro vertebrado (HANDMAN e BULLEN, 2002; KATO et al., 2010). O ciclo biológico do protozoário reinicia-se quando o hospedeiro infectado, contendo as formas amastigotas da *Leishmania* spp. é picado pelo flebotômico, que as ingere durante a picadura. No trato digestório do vetor, as formas amastigotas passam por um complexo processo e dentro de alguns dias transformam-se em promastigotas metacíclicas, sendo assim tal vetor capaz de infectar outros mamíferos (BANETH, 2006; KILLICK-KENDRICK, 1990).

Vinte e duas espécies de *Leishmania* têm sido isoladas de casos humanos, resultando em diferentes formas clínicas viscerais ou tegumentares (LAINSON e SHAW, 1987 e 1998; WHO, 2010).

Diversas manifestações clínicas são observadas, desde sinais leves nas formas cutâneas, até o óbito, nas formas viscerais da doença, dependendo da espécie de parasita e do estado imunológico do hospedeiro (MURRAY, et al., 2005). A forma cutânea da leishmaniose (LC) é descrita desde a antiguidade, no Brasil, foi detectada quando das investigações de lesões em trabalhadores rurais em cidades de São Paulo, em 1909. É caracterizada por úlceras cutâneas refratárias ou nódulos localizados em locais de infecção que se curam espontaneamente, deixando cicatrizes. Outra forma conhecida é a leishmaniose cutânea difusa (DCL) que produz nódulos crônicos, não-ulcerados, por todo corpo (DESJEUX et al.; 2001; DESJEUX et al., 2004). A forma muco-cutânea da leishmaniose (MCL) provoca lesões nas mucosas nasais, na boca, garganta e tecidos circundantes (MARSDEN, 1986) e a forma visceral (LV) acomete fígado, baço, órgãos linfoides, resultando em febre, perda de peso, hepato e esplenomegalia (BRYCESON, 1996). Uma das formas mais letais desta zoonose é a forma visceral, que tem, nas Américas, como principal vetor os flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis* (LAINSON e SHAW, 1988).

As três mais importantes espécies dos dois subgêneros de *Leishmania* spp. foram identificadas no Brasil como agentes etiológicos da leishmaniose cutânea americana (ACL) em humanos (CAMARGO e LANGONI, 2006): a *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, transmitida por *Lutzomyia whitmani*, *Lutzomyia wellcomei* e *Lutzomyia intermedia*; a *Leishmania* (*V.*) *guyanensis*, transmitida por *Lutzomyia umbratilis*, *Lutzomyia anduzei* e *Lutzomyia squamiventris* (LAINSON e SHAW, 1987) e a *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*, que tem como principais vetores a *Lutzomyia flaviscutellata* e *Lutzomyia olmeca* (CAMARGO e LANGONI, 2006). O principal responsável pela leishmaniose muco-cutânea (MCL) é a *Leishmania* (*V.*) *braziliensis*, embora outras espécies também tenham sido relatadas na manifestação desta

forma, como a *Leishmania* (V.) *guayanensis* e *Leishmania* (L.) *amazonensis* (BARRAL et al., 1991; NAIFF et al., 1988; OSORIO, et al., 1998).

Quanto à leishmaniose visceral (LV) três espécies são agentes conhecidos no mundo e pertencem ao complexo *Leishmania donovani* (*Leishmania*): *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*, *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* e *Leishmania* (*Leishmania*) *donovani* (CAMARGO e LANGONI, 2006), sendo a *Leishmania donovani*, a forma visceral clássica antroponótica, ocorrendo a participação do homem de forma acidental ou secundária no ciclo (LEWIS e WARD, 1987) e as demais espécies consideradas zoonóticas. No Brasil, a LV é causada por *L.chagasi*, atualmente sendo considerada a mesma espécie que *L.infantum*.

A prevalência global de casos humanos de leishmaniose é estimada em 12 milhões, com incidência de 1-1,5 milhões de casos anuais nas formas cutâneas de leishmaniose (WHO, 2009) e cerca de 500.000 novos casos humanos anuais de leishmaniose visceral, 90% dos quais concentram-se no Brasil, Bangladesh, Nepal (BERN et al. 2005; DESJEUX, 2004), Índia e Sudão. No Brasil, a leishmaniose visceral está registrada em quatro regiões brasileiras (BRASIL, 2010), e já com alguns relatos de ocorrência na região Sul.

RESERVATÓRIOS E OS MORCEGOS

Muitas espécies de mamíferos constituem importantes reservatórios de *Leishmania* spp., sendo os principais para leishmaniose cutânea ou tegumentar espécies de roedores, marsupiais, edentatus e canídeos silvestres (ASHFORD, 2000; MARVULO et al., 2006; QUINNELL e COURTENAY, 2009; QUINTAL et al. 2010; SANTIAGO et al., 2007; TRAVI et al., 1998). Quanto à leishmaniose visceral algumas raposas e marsupiais são considerados reservatórios, no ambiente silvestre (BRASIL, 2006), entretanto, o cão doméstico (*Canis familiares*) é considerado o mais importante reservatório de *Leishmania chagasi* em ambientes urbanos e periurbanos (DEANE e DEANE, 1955).

A adequação de um determinado mamífero hospedeiro para a manutenção das populações de *Leishmania* spp. depende de muitos fatores como a densidade populacional e longevidade do hospedeiro, a duração da infecção, a localização dos parasitas no interior do hospedeiro, bem como o estado imunológico deste (ASHFORD, 2000).

A investigação de parasitas hemoflagelados em animais silvestres e domésticos tem sido foco de estudo em diferentes áreas geográficas. Nesse contexto, os morcegos vêm recebendo atenção já que atuam como reservatórios e transmissores de agentes de importância em saúde pública (FIELD et al., 2004; MESSENGER et al., 2003), como os tripanosomas (BARROS et al., 2008).

Os morcegos (Mammalia: Chiroptera) são a segunda maior ordem dos mamíferos, sendo reconhecidamente importantes na regulação dos ecossistemas tropicais representando, em algumas áreas, 40 a 50% das espécies de mamíferos (PATTERSON e PASCUAL, 1972, TIMM, 1994). Sua notável diversidade de formas, adaptações morfológicas e hábitos alimentares permitem a utilização dos mais variados nichos, em complexa relação de interdependência com o meio (FENTON et al. 1992, KALKO, 1997; PEDRO et al. 1995). No mundo existem cerca de 1000 espécies de morcegos, as quais ocupam os mais variados biomas nos diferentes continentes, sendo que a maior diversidade de espécies encontra-se na região neotropical (MICKLEBURGH et al., 2002; NOWAK 1994). No Brasil existem 9 famílias, 64 gêneros e 167 espécies de morcegos (REIS et al., 2007).

À medida que partilham recursos, em especial os alimentares, os quirópteros influenciam a dinâmica dos ecossistemas naturais, agindo como dispersores de sementes, polinizadores e reguladores de populações animais (GOODWIN e GREENHALL, 1961; KUNZ e PIERSON, 1994; RIDLEY, 1930; VAN DER PIJL, 1957). A sobrevivência dos morcegos é dependente, principalmente, da sua mobilidade na busca de comida e abrigo, portanto com a fragmentação de florestas, há redução da disponibilidade e alteração na distribuição dos recursos, o que os leva a empreenderem migrações de longa

distância para áreas urbanas (MENEZES et al., 2008), favorecendo a urbanização de agentes patogênicos ao homem (TAYLOR et al., 2001), como o histoplasma, o vírus da raiva e tripanosomatídeos, que reforça a importância de estudos envolvendo a infecção natural desses animais (BARROS et al., 2008).

Lutzomyia longipalpis, o vetor da leishmaniose visceral nas Américas, está presente de forma freqüente em cavernas e fendas habitadas por morcegos e estes podem servir como fonte de alimento em tais nichos (LAMPO et al., 2000). Os dados de literatura mostram que o caráter oportunista parece predominar na alimentação desses insetos que podem sugar ampla variedade de vertebrados (MORRISON et al., 1993; QUINNELL et al., 1992). Já foi demonstrado que *Lutzomyia longipalpis* é capaz de se alimentar de pelo menos 4 espécies de morcegos de três famílias diferentes: *Pteronotus parnellii* (*Mormoopidae*), *Glossophaga longirostris* (*Phyllostomidae*), *Carollia perspicillata* (*Phyllostomidae*), e *Myotis oxyotus* (*Vespertilionidae*) (LAMPO et al., 2000). A capacidade de dispersão dos morcegos e sua longevidade poderiam facilitar a dispersão e persistência de *Leishmania*, com importantes implicações para as medidas de prevenção e controle da doença (LAMPO et al., 2000; SAVANI et al., 2010).

Na Guiana Francesa, relatos de aumento dos casos de leishmaniose cutânea, principalmente em trabalhadores do interior das florestas densas e entre mamíferos não-voadores, levaram pesquisadores a avaliarem amostras de morcegos de diferentes espécies para a presença de DNA de *Leishmania* spp., porém, sem sucesso (ROTUREAU et al., 2006).

Por outro lado, De Lima et al. (2008) relatam o isolamento de *Leishmania* (L.) *chagasi* a partir de um morcego frugívoro, *Carollia perspicillata*, capturado em uma área livre de casos de leishmaniose visceral e com casos esporádicos de leishmaniose tegumentar, na Venezuela.

Savani et al. (2010) detectaram o DNA de *Leishmania* spp. em amostras de morcegos de regiões da Serra da Cantareira e Serra do Mar, em São Paulo, e observaram amostras positivas para *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* e para *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. Embora não seja área de transmissão

humana para leishmaniose visceral, a cidade de São Paulo já registrou dois casos autóctones de LV no passado, mas, nem cães infectados, nem os flebotomíneos foram encontrados para confirmar a transmissão na época (IVERSSON et al., 1979; 1982).

Determinar as populações de hospedeiros do parasita pode ser de primordial importância para o controle efetivo das leishmanioses (CABRERA et al., 2003). A existência de reservatórios silvestres ajuda na perpetuação do parasito de *Leishmania* spp. numa região endêmica, tendo em vista que seus hábitos sinantrópicos podem propiciar um elo entre o ciclo silvestre e doméstico (SILVA et al., 2005).

IDENTIFICAÇÃO DE *Leishmania* spp. EM HOSPEDEIROS

Para a identificação de *Leishmania* spp. em hospedeiro vertebrado, um dos métodos eleitos como padrão é o parasitológico, no qual se identifica diretamente o parasita nos tecidos infectados, porém, apresenta baixa sensibilidade devido a limitações como baixo parasitismo ou ausência dos mesmos nos materiais colhidos para análise (GOMES et al., 2008). O isolamento do agente etiológico é um método também preciso, ao identificar o parasita. De forma complementar ao método diagnóstico parasitológico, as técnicas imunohistoquímicas aumentam o contraste entre o parasita e a célula hospedeira, proporcionando maior sensibilidade e especificidade às técnicas parasitológicas (TAFURI, 2004), tendo sido empregados mais rotineiramente. Porém, os métodos diagnósticos mais comumente utilizados para inquéritos epidemiológicos caninos são os sorológicos, como a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e “Enzyme-Linked immunoabsorbent Assay” (ELISA), que expressa a quantidade de anticorpos circulantes (AMBROISE-THOMAS, 1976; BARBOSA-DE-DEUS et al., 2002; LUCIANO, et al., 2009). Além dos métodos moleculares, como a “Polymerase Chain Reaction” (PCR) utilizados desde a década de 80.

Entretanto, podem ocorrer reações cruzadas sorológicas entre espécies de *Leishmania* e outros tripanossomatídeos (FERREIRA EDE, et al., 2007; SAVANI, et al., 2005; TRONCARELLI, et al., 2009), dada a proximidade filogenética entre as espécies da família *Trypanosomatidae* (HUGHES e PIONTKIVSKA, et al., 2003), sendo importante a diferenciação destes parasitas.

Diferentes espécies de flagelados tripanossomatídeos já foram descritas em morcegos, sobretudo do gênero *Trypanosoma*, já relatados em mais de 70 espécies de morcegos (BARROS et al., 2008; BOWER e WOO, 1981; DEANE, 1961; HOARE, 1972; LIMA, et al., 2012; MARINKELLE, 1976; MOLYNEUX, 1991; STEINDEL et al., 1998). Nas Américas, sua importância aumenta devido à infecção natural por *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas (FUNAYAMA e BARRETO, 1970) e por *Trypanosoma evansi* (BARROS, et al., 2008) e *Trypanosoma equiperdum* (MOLYNEUX, 1991), muito embora seja desconhecido como esses animais atuam no ciclo desse protozoário em ambiente silvestre.

Na busca por diagnósticos de alta sensibilidade e especificidade surgiram os métodos moleculares e a PCR passou a ser amplamente utilizada em diagnósticos e estudos epidemiológicos (LIMA et al. 2012; COELHO et al. 2011; AKKAFA et al. 2008). Desde o advento da PCR, têm sido publicadas numerosas ferramentas moleculares para distinção de espécies e cepas de *Leishmania* (SCHÖNIAN et al., 2011).

Como vantagem, a PCR pode ser realizada a partir da extração de DNA de variados tecidos, fluidos biológicos, sangue ou mesmo de espécimes biológicas, e atualmente três técnicas são bastante utilizadas: a PCR convencional, a “nested”-PCR e a “real-time” PCR (SOLANO-GALEGO, et al., 2009). Para maior sensibilidade nos diagnósticos moleculares a “nested”-PCR ou “semi”-nested, que utilizam oligonucleotídeos internos ao primeiro fragmento gerado de DNA aumentam a sensibilidade da reação, assim como o uso de RFLP “Restriction fragment length polymorphism” por meio de enzimas de

restrição, aumentando a especificidade da técnica (GRAMICCIA, 2011) e permite a diferenciação das espécies.

As principais sequências de DNA utilizadas como alvo para identificação do gênero *Leishmania* spp. são DNA de kinetoplasto (kDNA) (RODGERS, et al., 1990; WIRTH e MCMAHON-PRATT, 1982) glucose-6-phosphate dehydrogenase (CASTILHO et al. 2003; CASTILHO et al., 2008) e DNA ribossomal (SAVANI et al. 2009; SAVANI et al. 2010; ULIANA et al. 1994).

A sequência de DNA do kinetoplasto (kDNA) da *Leishmania* apresenta cerca de 10^4 cópias por célula (BAKER et al., 1986; WIRTH e MCMAHON-PRATT, 1982). Rodgers et al. (1990), por meio de PCR, compararam as sequências de minicírculos de diferentes espécies de *Leishmania* revelando uma região de aproximadamente 200pb que é conservada entre as diversas espécies investigadas, portanto útil na identificação do gênero *Leishmania*. Desde então, o alvo kDNA é bastante utilizado nos diagnósticos moleculares (COELHO et al., 2011; QUINTAL, et al. 2010; SCHÖNIAN et al., 2003).

Sendo a distinção entre as espécies crucial em algumas situações como quando da necessidade de executar tratamentos assim como em estudos epidemiológicos para se determinar as medidas de controle (SCHÖNIAN, et al., 2003).

A distinção entre a maioria das espécies de *Leishmania* com importância médica tem sido realizada com base nas diferenças encontradas na amplificação da região “Internal Transcribed spacer 1” (ITS-1), uma região não codificadora e que esta localizada entre a subunidade menor (SSU “small subunit”) e os genes 5.8S do RNA ribossomal, conservada nas espécies de *Leishmania* e muito utilizada pela detecção das variações intra-específicas (EL TAI, et al., 2000). A amplificação desta região seguida da digestão com enzimas de restrição (PCR-RFLP) resulta na clivagem em diferentes tamanhos de fragmentos de DNA, permitindo a diferenciação de algumas espécies (CUPOLILLO et al., 1995; DAVILA e MOMEM, 2000; SCHÖNIAN et al., 2000 e 2003).

Por meio da técnica de “nested”-PCR, uma região SSU rDNA conservada nos tripanossomatídeos, é amplificada na primeira reação e, na segunda reação, amplifica-se uma região comum ao gênero *Leishmania*. Após o sequenciamento do produto originário da segunda reação é possível fazer a distinção entre parasitas do subgênero *Viannia*, *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (L.) chagasi* (LIMA, et al., 2011). Esta variação da técnica de PCR é utilizada também, com sucesso, para amplificação da região do gene 18S rRNA na identificação de *Trypanosoma* spp. (SMITH, et al., 2008).

Desde a introdução da leishmaniose visceral (LV) no Estado de São Paulo, em 1998, observa-se uma expansão na área de transmissão da doença. No período entre 1999 e 2009 foram confirmados 1.750 casos de leishmaniose visceral em humanos, totalizando 138 óbitos (SÃO PAULO, 2010). Araçatuba-SP, onde foi registrado o primeiro caso de leishmaniose visceral autóctone no Estado, é considerado município de transmissão intensa de leishmaniose visceral com transmissão canina e humana (SÃO PAULO, 2011). A ocorrência de outras espécies de *Leishmania* spp. em animais domésticos, como o relato de *L. amazonensis* em cães da cidade de Araçatuba (TOLEZANO, et al., 2007) onde ainda não haviam sido relatados casos humanos para tal espécie, reforçam a importância da investigação na região de estudo.

Os morcegos, por apresentarem a característica de potenciais reservatórios ou hospedeiros acidentais e transmissores de importantes agravos que afetam o homem e pela existência de estudos que detectaram a presença de *Leishmania* nos mesmos, merecem atenção quanto a seu papel no ciclo de transmissão da doença. A hipótese deste estudo é a de que os morcegos possam ser hospedeiros acidentais ou mesmo reservatórios de *Leishmania* spp. em áreas endêmicas. Assim objetivou-se avaliar a presença de DNA de *Leishmania* spp. em morcegos da região noroeste do Estado de São Paulo.

REFERÊNCIAS

- AMBROISE-THOMAS, P. Immunofluorescence in the diagnosis, therapeutic follow-up and seroepidemiological studies of some parasitic diseases. **Transactions of the Royal Society of Tropical and Medicine Hygiene**, v.70, p.107-112, 1976.
- AKKAFA, F.; DILMEE, F.; ALPUA, Z. Identification of *Leishmania* parasites in clinical samples obtained from cutaneous leishmaniasis patients using PCR-RFLP technique in endemic region, Sanliurfa province, in Turkey. **Parasitology Research**, v.103, p.583-586, 2008.
- ASHFORD, R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v.30, p.1269-1281, 2000.
- BAKER, D.C. Molecular approaches to DNA diagnosis. **Parasitology**, v.99, p.125-146, 1986.
- BANETH, G. Leishmaniasis. In: GREENE, C.E. **Infectious diseases of the dog and the cat**. 3^a ed. Philadelphia: Elsevier, p.685-698, 2006.
- BARBOSA-DE-DEUS, R.; MARES-GUIA, M.L.; NUNES, A.Z.; COSTA, K.M.; JUNQUEIRA, R.G.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; TAVARES, C.A. *Leishmania major*-like antigen for specific and sensitive serodiagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. **Clinical and Diagnosis Laboratory Immunology**, v.9, p.1361-1366, 2002.
- BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; GRIMALDI, G., Jr.; MOMEM, H.; MCMAHON-PRATT, D.; RIBEIRO DE JESUS, A.; ALMEIDA, R.; BADARO, R.; BARRAL-NETTO, M.; CARVALHO, E.M.; JOHNSON, W.D., JR. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v.44, p.536-546, 1991.

BARROS, J.H.S., ROMIJN, P.C.; BAPTISTA, C.; PINTO, A.G.S.; MADEIRA, M.F. Relato de infecção natural de morcegos por flagelados tripanosomatídeos em diferentes municípios do Estado do Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.41, p.683-685, Uberaba-MG, 2008.

BERN C.; HIGHTOWER, A. W.; CHOWDHURY, R.; ALI, M.; AMANN, J.; WAGATSUMA, Y.; HAQUE, R.; KURKJIAN, K.; VAZ, L. E.; BEGUM, M.; AKTER, T.; CETRE-SOSSAH, C. B.; AHLUWALIA, I. B.; DOTSON, E.; SECOR, W. E.; BREIMAN, R. F. MAGUIRE, J. H. Risk factors for Kala-azar in Bangladesh. **Emerging Infectious Disease**, v.11, p.655-662, 2005.

BOWER, S.M.; WOO, P.T.K.. Two new species of trypanosomes (subgenus *Schizotrypanum*) in bats from southern Ontario. **Canadian Journal of Zoology**, v.59, p.530-545, 1981.

BRASIL, 2006. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portal da Saúde** (Dados do SINAN). Disponível:<http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1560> 2010. Acesso em 12 de Março de 2012.

BRYCESON, A.D.M. Leishmaniasis. In **Manson's Tropical Disease**, 20th ed; Cook, C.C.; Ed.; W.B. Saunders Comp Ltd: London, Philadelphia, Toronto, Sydney and Tokyo, p.1213-1245, 1996.

CABRERA, M.A.A.; PAULA, A.A.; CAMACHO, L.A.B.; MARZOCHI, M.C.A.; XAVIER, S.C.; SILVA, A.V.M.; JANSEN, A.M. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: Assessment of risk factors. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.45, p.79-83, 2003.

CAMARGO, L.B.; LANGONI, H. Impact of leishmaniasis in public healthy. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical diseases**, v.12, p.527-548, 2006.

CASTILHO, T.M.; SHAW, J.J.; FLOETER-WINTER, L..New PCR assay using glucose-6-phosphate dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p.540–546, 2003.

CASTILHO, T.M.; CAMARGO, L.M.A., McMAHON-PRATT, D.; SHAW, J.J.; FLOETER-WINTER, L.M. A real-time polymerase chain reaction assay for the identification and quantification of American *Leishmania* species on the basis of glucose-6-phosphate-dehydrogenase. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.78, p.122-132, 2008.

COELHO, L.I.C; PAES, M.; GUERRA, J.A.; BARBOSA, M.G; COELHO, C.; LIMA, B.; BRITO, M.E; BRANDÃO FILHO, S.P. Characterization of *Leishmania* spp. causing cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas, Brazil. **Parasitology Research**, v.108, p.671-677, 2011.

CUPOLILLO, E.; GRIMALDIM JR, G.; MOMEN, H.; BEVERLEY, S.M. Intergenic region typing (ITR): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.73, p.145-155, 1995.

DAVILA, A.M.; MOMEN, H. Internal-transcribed-spacer (ITS) sequences used to explore phylogenetic relationships within *Leishmania*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.94, p.651-654, 2000.

DEANE, L.. Tripanosomatídeos de mamíferos da Região Amazônica I. Alguns flagelados encontrados no sangue de mamíferos silvestres do estado do Pará. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.3, p.15, 1961.

DEANE, L.M.; DEANE, M.P. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa *Lycalopex vetulus* como

reservatórios da *L. donovani* em área endêmica de calazar no Ceará. **Hospital**, v.48, p.61-70, 1955.

DE LIMA, H.; RODRÍGUEZ, N.; BARRIOS, M.A.; ÁVILA, A.; CAÑIZALES, I.; GUTIÉRREZ, S.; Isolation and molecular identification of *Leishmania chagasi* from a bat (*Carollia perspicillata*) in northeastern Venezuela. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.103, p.412–414, 2008.

DESJEUX, P. The increase of risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transactions of Royal Society and Tropical Medicine and Hygiene**, v.95, p.239-243, 2001.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.27, p.305-318, 2004.

EL TAI, N.O.; OSMAN, O.F.; EL FARI, M.; PRESBER, W.; SCHONIAN, G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer (its) in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper a revealed by single-strand conformation polymorphisms (sscp) and sequencing. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.94, p.1-5, 2000.

FENTON, M.B.; L. ACHARYA; D. AUDET; M.B.C. HICKEY; C. MERRIMAN; M.K. OBRIST; D.M. SYME. Phyllostomid bats (Chiroptera: Phyllostomidae) as indicators of habitat disruption in the Neotropics. **Biotropica**, Washington, v.24, p.440-446, 1992.

FERREIRA EDE, C.; DE LANA, M.; CARNEIRO, M.; REIS, A.B.; PAES, D.V.; DA SILVA, E.S.; SCHALLIG, H.; CONTIJO, C.M. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. **Veterinary Parasitology**, v.146, p.235-241, 2007.

FIELD H, MACKENZIE J, DASZAK P. Novel viral encephalitides associated with bats (Chiroptera) - host management strategies. **Archives of Virology**, v.18, p.113-121, 2004.

FUNAYAMA, G.K.; BARRETO, M.P. Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi* LIV- Infecção natural do morcego, *Epitesicus brasiliensis brasiliensis* (Desmarest, 1819) pelo *Trypanosoma cruzi*, **Revista Brasileira de Biologia**, v.33, p.439-444, 1973.

GOMES, Y.M.; CAVALCANTI, M.P.; LIRA, R.A.; ABATH, F.G.C; ALVES, L.C. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advantages. **The Veterinary Journal**, v.175, p.45-52, 2008.

GOODWIN, G.G. & A.M. GREENHALL. A review of the bats of Trinidad and Tobago: descriptions, rabies infection and ecology. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, New York, v.122, p.187-302, 1961.

GOSSAGE, S.M.; ROGERS, M.E.; BATES, P.A. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. **Internacional Journal for Parasitology**, v.33, p.1027-1034, 2003.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **International Journal for Parasitology**, v.35, p.1169-1180, 2005.

GRAMICCIA, M. Recent advances in leishmaniosis in pet animals: Epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. **Veterinary Parasitology**, v.181, p.23-30, 2011.

HANDMAN, E.; BULLEN, D.V.R. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. **Trends Parasitology**, v.18, p.332-334, 2002.

HOARE, C.A. The Trypanosomes of Mammals: a Zoological Monograph. **Blackwell Scientific Publications**, Oxford, UK, 1972.

HUGHES, A.L.; PIONTKIVSKA, H. Molecular phylogenetics of Trypanosomatidae: constrasting results from 18S rRNA and protein phylogenies. **Kinetoplastid Biology and Diseases**, v.1, p.1-10, 2003.

IVERSSON, L.B.; CAMARGO, M.E.; DA ROCHA E SILVA, E.O.; CHIEFFI, P.P.; DE BARROS, J.A. Investigação epidemiológica de um caso de leishmaniose visceral autóctone da Grande São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v.13, p.159-167, 1979.

IVERSSON, L.B.; PIRES, R.B.; RIBEIRO, M.A.; TAKEDA, A.K.; ESCRIVÃO JÚNIOR, A.; TOLEZANO, J.E.; BURALLI, G.M. Investigação epidemiológica de um novo caso de leishmaniose visceral ocorrido na Grande São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v.16, p.205-219, 1982.

KALKO, E.K.V. Diversity in tropical bats, p.13-43 *In*: H. ULRICH (Ed.). Tropical biodiversity and systematics. **Proceedings of the International Symposium on Biodiversity and Systematics in Tropical Ecosystems, Bonn, 1994**. Bonn, Zoologisches Forschungsinstitut und Museum Alexander Koenig, 1997.

KAMHAWAI, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? **Trends in Parasitology**, v.22, p.439-445, 2006.

KATO, H.; GOMEZ, E.A.; CÁCERES, A.G.; UEZATO, H.; MIMORI, T.; HASHIGUCHI, Y. Molecular epidemiology for Vector Research on Leishmaniasis. **International Journal of Environmental Research and Public Healthy**, v.7, p.814-826, 2010.

KILLICK-KENDRICK, R. The life cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. **Annual Parasitology Human Complete**, v.65, p.37-42, 1990.

KUNZ, T.H. & E.D. PIERSON. Bats of the World: an introduction, p.1-46. *In*: R.W. NOWAK (Ed.). **Walker's bats of the World**. Baltimore, The Johns Hopkins University Press, p.287, 1994.

LAINSON R.; SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W., Killick-Kendrich R. **The leishmaniasis in biology and medicine**, v.1, p.1-120, 1987.

LAINSON R.; SHAW, J.J. Observations on the development of *Leishmania* (L.) *chagasi* Cunha and Chagas, in the midgut of the sandfly vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva). **Annual Parasitology Human Complete**, v.62, p.134-145, 1988.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. New World leishmaniasis – the neotropical *Leishmania* species. In **Topley e Wilson's Microbiology and Microbial Infections** (ed. Cox, F.E.G.; KREIER, J.P.; WAKELIN, D.), p.241-266, 1998.

LAMPO, M.; FELICIANGELI, M.D.; MARQUEZ, L.M.; BASTIDAS, C.; LAU, P. A possible role of bats as a blood source for the *Leishmania* vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.62, p.718–719, 2000.

LEWIS, D.J.; WARD, R.D. Transmission and vectors. In PETERS, W.; KILLICH-KENDRICH, R. **The leishmaniasis in Biology and Medicine**, v.1, p.235-262, 1987.

LIMA, A.C.S.; ZAMPIERI, R.A.; TOMOKANE, T.Y.; LAURENTI, M.D.; SILVEIRA, F.D.; CORBETT, C.E.P.; FLOETER-WINTER, L.M.; GOMES, C.M.C. *Leishmania* sp. Identification by PCR associated with sequencing of target SSU rDNA in paraffin-embedded skin samples stores for more than 30 years. **Parasitology Research**, v.108, p.1525-1531, 2011.

LIMA, L.; DA SILVA, F.M.; NEVES, L.; ATTIAS, M.; TAKATA, C.S.A.; CAMPANER, M.; DE SOUZA, W.; HAMILTON, P.B; TEIXEIRA, M.M.G. Evolutionary insights from bats trypanosomas: 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**, Article in Press, 2012.

LUCIANO, R.M.; LUCHEIS, S.B.; TRONCARELLI, M.Z.; LUCIANO, D.M.; LANGONI, H. Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* na resposta sorológica de cães pela técnica de imunofluorescência indireta (RIFI). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.43, p.181-187, 2009.

MARINKELLE, C.J..The biology of the trypanosomes of bats. *In*: LUMDSEN, W.H.R.; EVANS, D.A. (eds) Biology of the Kinetoplastida. **Academic Press: New York**, p.175-216, 1976.

MARSDEN, P.D. Mucosal leishmaniasis (“espundia” Escomel, 1911). **Transactions of Royal Society and Tropical Medicine and Hygiene**, v.80, p.859-876, 1986.

MARVULO, M. F.V. **Zoonoses**. *In*: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. Tratado de Animais Selvagens – Medicina Veterinária. 1ª Edição. São Paulo: Rocca, p.1254, 2006.

MENEZES, L.F., FAÇANHA, A.C., PERACCHI, A.L., COSTA, L.M., FERNANDES, A.F.P.D.; ESBERARD, C.E.L. Deslocamento de *Artibeus lituratus* (Olfers,1818) (Mammalia, Chiroptera) entre ilha e continente no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Biota Neotropica**, v.8, p.243–245, 2008.

MESSENGER SL, RUPPRECHT CE, SMITH SJ. Chapter 14 - **Bats, emerging virus infections and the rabies paradigm**. *In*: Kunz TH, Fenton MB (eds) Bat Ecology. The University of Chicago Press, Chicago, p.622-679, 2003.

MICKLEBURGH, S.; A.M. PHUSTON & P.A. RACEY. A review of the global conservation status of bats. **Oryx**, Cambridge, v.36, p.18-34, 2002.

MOLYNEUX, D.H.; Trypanosomes of bats. *In*: Kreier JP, Baker JR (eds) **Parasitic protozoa**. Academic Press, San Diego, p.195-224, 1991.

MORRISON, A.C.; FERRO, C.; TESH, R.B. Host preferences of the sandfly at an endemic focus of American Visceral Leishmaniasis in Colombia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.49, p.68-75, 1993.

MURRAY, H.W.; BERMAN, J.D.; DAVIES, N.G.; SARAIVA, N.G. Advances in leishmaniasis. **Lancet Infectious Diseases**, v.366, p.1561 e 1577, 2005.

NAIFF, R.D.; TALHARI, S.; BARRETT, T.V. Isolation of *Leishmania guyanensis* from lesions of the nasal mucosa. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.83, p.529-530, 1988.

NOWAK, R.M. **Walker's bats of the world**. Chicago, The Johns Hopkins University Press, p.863, 1994.

OSORIO, L.E.; CASTILHO, C.M.; OCHOA, M.T. Mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) panamensis* in Colombia: clinical characteristics. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v.59, p.49-52, 1998.

PATTERSON, B. & R. PASCUAL. The fossil mammal fauna of South America, p. 247-309. In: A. KEAST; F.C. ERK & B. GLASS (Eds). **Evolution, mammals and southern continents**. Albany, State University New York Press, p.543, 1972.

PEDRO, W.A.; M.P. GERALDES; G.G. LOPEZ & C.J.R. ALHO. Fragmentação de hábitat e a estrutura de uma taxocenose de morcegos em São Paulo (Brasil). **Chiroptera Neotropical**, Brasília, v.1, p.4-6, 1995.

QUINNELL, R.J.; DYE, C.; SHAW, J.J. Host preferences of the sandfly *Lutzomyia longipalpis* in Amazonian Brazil. **Medicine and Veterinary Entomology**, v.6, p.195-200, 1992.

QUINNELL, R.J.; COURTENAY, O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasitology**, v.136, p.1915–1934, 2009.

QUINTAL, A.P.N.; RIBEIRO, E.S.; RODRIGUES, F.P.; ROCHA, F.S.; FLOETER-WINTER, L.M.; NUNES, C.M. *Leishmania* spp. in *Didelphis*

albiventris and *Micoureus paraguayanus* (Didelphimorphia: Didelphidae) of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.176, p.112-119, 2010.

REIS, N.R. DOS; PERACCHI, A.L.; PEDRO, W.A.; LIMA, I.P. **Morcegos do Brasil**, Editora UEL, Londrina-PR, p.253, 2007.

RIDLEY, H.N. **The dispersal of plants throughout the world**. Ashford, England, L. Reeve, p.744, 1930.

RODGERS, M.R.; POPPER, S.J.; WIRTH, D.F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. **Experimental Parasitology**, v.71, p.267-275, 1990.

ROTUREAU, B.; CATZEFLIS, F.; CARME, B. Short report: Absence of *Leishmania* in Guianan bats. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.74, p.318-321, 2006.

SANTIAGO, M.E.B.; VASCONCELOS, R.O.; FATTORI, K.R.; MUNARI, D.P.; MICHELIN, A.F.; LIMA, V.M.F. An investigation of *Leishmania* spp. in *Didelphis* ssp. from urban and peri-urban areas in Bauru (São Paulo, Brazil). **Veterinary Parasitology**, v.150, p.283-290, 2007.

SÃO PAULO, BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO PAULISTA. Classificação epidemiológica dos municípios segundo o Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo, atualizado em maio de 2010. **Bepa**, v.77, p.21-40, 2010.

SÃO PAULO, BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO PAULISTA. Classificação epidemiológica dos municípios segundo o Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo, atualizado em Novembro de 2011. **Bepa**, v.96, p.32-36, 2011.

SAVANI, E.S., NUNES, V.L, GALATI, E.A.; CASTILHO, T.M.; ARAUJO, F.S.; ILHA, I.M.; CAMARGO, M.C.; D'AURIA, S.R.; FLOETER-WINTER, L.M.: Occurrence of coinfection by *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* and

Trypanosoma (Trypanozoon) evansi in a dog in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.100, p.739-741, 2005.

SAVANI, E.S.; NUNES, V.L.; GALATI, E.A.; CASTILHO, T.M.; ZAMPIERI, R.A.; FLOETER-WINTER, L.M. The finding of *Lutzomyia almerioi* and *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania* spp. in a cutaneous and canine visceral leishmaniasis focus in Serra da Bodoquena, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.160, p.18-24, 2009.

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

SCHÖNIAN, G.; AKUFFO, H.; LEWIN, S.; MAASHO, K.; NYLÉN, S.; PRATLONG, F.; EISENBERGER, C.L.; SCHNUR, L.F.; PRESBER, W. Genetic variability within the species *Leishmania aethiopica* does not correlate with clinical variations of cutaneous leishmaniasis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.106, p.239-248, 2000.

SCHÖNIAN, G.; NASEREDDIN, A.; DINSE, N.; SHWEYNOCH, C.; SCHALLIG, H.D.F.H.; PRESBER, W.; JAFFE, C.L. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.47, p.349-358, 2003.

SCHÖNIAN, G.; KUHLS, K.; MAURICIO, I.L. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. Review article, **Parasitology**, v.138, p.405-445, 2011.

SILVA, E.S.; GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Contribution of molecular techniques to the epidemiology of neotropical *Leishmania* species. **Trends in Parasitology**, v.21, p.550-552, 2005.

SMITH, A.; CLARK, P.; AVERIS, S.; LYMBERY, A.J.; WAYNE, A.F.; MORRIS, K.D.; THOMPSON, R.C.A.. Trypanosomes in a declining species of threatened

Australian marsupial, the brush-tailed betong *Bettongia penicillata* (Marsupialia: Potoroidae). **Parasitology**, v.135, p.1329-1335, 2008.

SOLANO-GALEGO, L.; KOUTINAS, A.; MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M.G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v.165, p.1-18, 2009.

STEINDEL, M.; GRISARD, E.C.; PINTO, C.J.C.; CORDEIRO, F.D.; RIBEIRO-RODRIGUES, R.; ROMANHA, A.J. Characterization of trypanosomes from the the subgenus *Schizotrypanum* isolated from bats, *Eptesicus* sp. (Chiroptera: Vespertilionidae), captured in Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. **Journal of Parasitology**, v.84, p.601-607, 1998.

TAFURI, W.L.; SANTOS, R.L.; ARANTES, R.M.; GONÇALVES, R.; DE MELO, M.N.; MICHALICK, M.S. An antervative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **Journal of Immunological Methods**, v.292, p.17-23, 2004.

TAYLOR, L.H; LATHAM, S.M., WOLLHOUSE, M.E.J. Risk factors for human disease emergente. **Philosophical Transactions of the Royal Society London B**, v.356, p.983-989, 2001.

TIMM, R.M. The mammal fauna, p. 229-237. *In*: L.A. McDADE; K.S. BAWA; H.A. HESPENHEIDE & G.S. HARTSHORN (Eds). **La Selva: Ecology and natural history of a neotropical rain forest**. Chicago, University of Chicago Press, p.486, 1994.

TOLEZANO, J.E.; ULIANA, S.R.B. TANIGUSHI, H.H.; ARAUJO, M.F.L.; BARBOSA, J.A.R.; BARBOSA, J.E.R.; FLOETER-WINTER, L.M.; SHAW, J.J. The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.149, p.280-284, 2007.

TRAVI, B.L.; OSORIO, Y.; BECERRA, M. T.; ADLER, G. H. Dynamics of *Leishmania chagasi* infection in small mammals of the undisturbed and degraded tropical dry forest of northern Colombia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.92, p.275-278, 1998.

TRONCARELLI, M.Z.; CAMARGO, J.B.; MACHADO, J.G.; LUCHEIS, S.B.; LANGONI, H. *Leishmania* spp. and/or *Trypanosoma cruzi* diagnosis in dogs from endemic and nonendemic areas for canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v.64, p.118-123, 2009.

ULIANA, S.R.; NELSON, K.; BEVERLY, S.M.; CAMARGO, E.P.; FLOETER-WINTER, L.M. Discrimination amongst *Leishmania* by polymerase chain reaction and hybridization with small subunit ribosomal DNA derived oligonucleotides. **Journal of Eukaryote Microbiology**, v.41, p.324–330, 1994.

VAN DER PIJL, L. The dispersal of plants by bats (Chiropterochory). **Acta Botanica Neerlandica**, Amsterdam, v.6, p.291-315, 1957.

WHO, WORLD HEALTHY ORGANIZATION. General aspects of Leishmaniasis in the world. 2009. Site consultado: <<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>>. Acesso em: 30 de março de 2012.

WHO, WORLD HEALTHY ORGANIZATION. Control of the leishmaniasis. Report of a WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniases, **World Health Organization**, Geneva, Switzerland, 2010.

WIRTH, D.F.; MCMAHON-PRATT, D. Rapid identification of *Leishmania* species by specif hybridization of kinetoplast DNA in cutaneous lesions. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.79, p.6999-7003, 1982.

CAPÍTULO 2 – DETECÇÃO DE DNA DE *Leishmania (L.) chagasi* E *Leishmania (L.) amazonensis* EM MORCEGOS DE ÁREAS URBANAS ENDÊMICAS PARA LEISHMANIOSE VISCERAL

RESUMO - A leishmaniose visceral é uma doença em franca expansão no Brasil e que tem a participação de algumas espécies animais na manutenção de seu ciclo. Este trabalho objetivou investigar a presença de DNA de *Leishmania* spp. em morcegos de áreas urbanas endêmicas para leishmaniose visceral e investigar a participação destes animais como possíveis reservatórios desta zoonose. Avaliou-se a presença de DNA dos parasitas, por meio da reação em cadeia pela polimerase (PCR), em amostras de baço e pele de 375 quirópteros originários de 19 cidades do Estado de São Paulo, Brasil, áreas com transmissão intensa para leishmaniose visceral. A amplificação de kDNA de *Leishmania* spp. por PCR foi positiva em 4,5% dos quirópteros, sendo que a maior positividade foi observada em amostras de baço (94,1%) e dois animais foram positivos tanto para amostras de pele como de baço. Como diagnóstico diferencial, as mesmas amostras foram investigadas para a presença de DNA do gene SSU 18S rRNA de *Trypanosoma* spp., tendo sido positiva em 4,5% das amostras sendo 23,5% positivas somente na amostra de baço, 76,5% somente na amostra de pele. Um animal apresentou positividade tanto para *Leishmania* spp. como para *Trypanosoma* spp. A detecção destes parasitas em áreas endêmicas para leishmaniose visceral indica a ocorrência de *Leishmania* spp. em quirópteros, bem como a possibilidade de serem hospedeiros acidentais ou mesmo reservatórios desta zoonose.

Palavras-chave: leishmaniose, quirópteros, PCR, epidemiologia, reservatório.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose um importante problema de saúde pública, é uma zoonose endêmica de difícil controle e em franca expansão no Brasil (BRASIL, 2010). Causada por protozoários digenéticos pertencentes ao subreino Protozoa, ordem Kinetoplastida, família *Trypanosomidae*, gênero *Leishmania* (DESJEUX, 2004), tem como vetores os flebotomíneos, cujo gênero principal nas Américas é *Lutzomyia*. Na América do Sul, as leishmanias estão agrupadas em dois subgêneros *Leishmania* (*Leishmania*) e *Leishmania* (*Viannia*) (GRAMICCIA e GRADONI, 2005), sendo a *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* o principal agente da leishmaniose visceral (LV) e a *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* o principal responsável pela leishmaniose muco-cutânea (MCL), embora outras espécies também tenham sido relatadas na manifestação desta forma, como a *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* e *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* (BARRAL et al., 1991; BRASIL, 2006; KATO et al., 2010; NAIFF et al., 1988; OSORIO, et al., 1998).

Diversos mamíferos podem ser reservatórios de *Leishmania* spp., tais como roedores, carnívoros, primatas e marsupiais (COURTENAY et al., 1994; DEANE & DEANE, 1955; QUINTAL et al., 2010; SANTIAGO et al., 2007; TRAVI et al., 1998). Porém para o principal agente etiológico da LV nas Américas: *Leishmania chagasi*, o cão doméstico é considerado o reservatório mais importante no ambiente urbano. Os morcegos apresentam notável diversidade de formas, adaptações morfológicas e hábitos alimentares, além de abundância de espécies (REIS et al., 2007), podendo atuar como hospedeiros de diversos tripanossomatídeos (BARROS, et al., 2008; MOLYNEUX, 1991; SARAVIA et al., 1987).

Poucos estudos já relataram a presença de DNA de *Leishmania* spp. e o isolamento do parasita em quirópteros de áreas endêmicas e não endêmicas (DE LIMA et al., 2008; SAVANI et al., 2010). Por outro lado, já se observou a presença de flebotomíneos em morcegos (LAMPO et al., 2000). Na Venezuela, De Lima et al. (2008) isolaram *Leishmania infantum chagasi* a partir de uma

amostra de sangue de um morcego frugívoro (*Carollia perspicillata*) e Savani et al. (2010) detectaram a presença de DNA em amostras de sangue e baço positivas para *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* e para *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* em morcegos da Serra da Cantareira e Serra do Mar, em São Paulo, Brasil. O papel epidemiológico dos morcegos na transmissão da LV ainda não está esclarecido.

Vários municípios do Estado de São Paulo são classificados como área de transmissão intensa de leishmaniose visceral (SÃO PAULO, 2011). E a hipótese deste estudo é a de que os morcegos possam servir de reservatório de *Leishmania* spp. nestas áreas, visto que têm alta capacidade de dispersão e longevidade, podendo contribuir para a manutenção da zoonose, assim a presença de DNA do protozoário foi avaliada em quirópteros de áreas endêmicas do Estado de São Paulo.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo e coleta de amostras

O estudo foi realizado no Estado de São Paulo, abrangendo 19 cidades consideradas endêmicas para leishmaniose visceral. Foram utilizados morcegos predominantemente provenientes de área urbana, enviados congelados ou refrigerados ao Laboratório de Diagnóstico de Raiva da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), campus Araçatuba, no período de 2010 a 2012, para realização de pesquisa do vírus rábico. Foram colhidas 375 amostras de baço e de pele da região epigástrica (medindo cerca de 0,5 cm²), escolhida de forma arbitrária por ser de uma região com boa vascularização e, possivelmente, de fácil acesso para o repasto de flebotomíneos, sendo mantidas a -20°C até o processamento.

Amostras

Os quirópteros foram taxonomicamente identificados em família, gênero e espécie, segundo os critérios descritos por Vizotto e Taddei (1973), atualizada por Reis et al. (2007; 2011).

Extração e quantificação de DNA

Para extração de DNA de baço foram utilizadas 10 mg de cada amostra e, para pele, 25 mg, as quais foram lisadas e digeridas com proteinase K. O DNA de pele foi extraído com o kit comercial QIAamp DNA mini kit (Qiagen®), segundo instruções do fabricante; o DNA de baço foi extraído com fenol/clorofórmio/álcool Isoamílico (25:24:1) e precipitação com etanol absoluto (SAMBROOK, et al. 1989). O volume final foi de 50 µL para ambas extrações.

A qualidade e concentração de DNA foi avaliada com o auxílio do aparelho NanoDrop® (ND-100); as amostras quantificadas foram diluídas para a concentração de 20-30 ng/µL para uso.

Controles das reações de PCR

A amplificação de um fragmento de DNA mitocondrial de aproximadamente 359pb do citocromo B, utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores L14841 e H15149 (KOCHER et al., 1989) foi utilizada como controle de qualidade do DNA extraído (Quadro 1). Os resultados da amplificação foram visualizados em gel de agarose 1,5%, coradas com brometo de etídio.

Um controle positivo de DNA de *Leishmania* spp., cepa *Leishmania chagasi* (L579 MHOM/BR/1974/PP75) outro de DNA de *Trypanosoma* spp. mantidos em cultivo; dois controles negativos (uma amostra de quiróptero, proveniente da cidade de Iguape-SP, área não endêmica para LV até o momento, (SÃO PAULO, 2011) e um tubo com controle de reagentes (sem DNA), foram incluídos em todas as reações.

PCR convencional para identificação de DNA de *Leishmania* spp.

Um fragmento de 120pb DNA do kinetoplasto (kDNA) de *Leishmania* spp. foi amplificado a partir dos oligonucleotídeos iniciadores (Quadro 1) descritos por Rodgers et al. (1990). Esta reação é específica para *Leishmania* spp. não amplificando outros tripanosomatídeos (RODGERS et al. 1990), por se tratar da região conservada do gênero *Leishmania*. A reação foi realizada em volume de 25µL contendo 2µL de DNA genômico, 1,5mM de MgCl₂, 200mM de cada dNTP, 0,2µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 1U de “Taq polimerase Platinum” (Invitrogen®), no aparelho termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems®), com desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 34 ciclos de 95°C por 30 segundos, 65°C por 45 segundos, e 72°C por 30 segundos, e extensão final a 72°C, por 5 minutos.

Os resultados da amplificação foram visualizados em gel de poliacrilamida 8%, corado com nitrato de prata. As amostras com resultado positivo para *Leishmania* spp. foram posteriormente avaliadas para diferenciação de espécies.

“Nested”-PCR para identificação de DNA de *Trypanosoma* spp.

Foi utilizada a “nested”-PCR utilizando-se oligoiniciadores específicos para uma região variável do gene 18S rRNA de *Trypanosoma* spp. (TRY927F e TRY927R) descritos por Smith et al. (2008) e que amplificam fragmento de DNA de 927pb (Quadro 1). A amplificação foi realizada em volume de 50µL contendo 2µL de DNA genômico, 1,5mM de MgCl₂, 250mM de cada dNTP, 1,0µ M de cada oligonucleotídeo iniciador e 0,3 U de “Taq polimerase Platinum” (Invitrogen®), em aparelho termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems®), com desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 58,6°C por 60 segundos, e 72°C por 90 segundos, e extensão final a 72°C, por 5 minutos.

Dos produtos da primeira PCR, 1µL de cada amostra foi usado para a segunda reação, utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores SSU450F e

SSU450R (SMITH, et al., 2008) seguindo-se o mesmo protocolo descrito para a primeira reação, em volume final de 50µL. O resultado da amplificação do fragmento de DNA de aproximadamente 600pb (Quadro 1) foi visualizado em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio.

Quadro 1- Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR para amplificação de DNA de *Leishmania* spp. e *Trypanosoma* spp.

Oligonucleotídeos	Sequência	DNA alvo	Tamanho (pb)	Referências
L14841	5'-AAAAAGCTTCCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3'	DNA mitocondrial citocromo b	359 pb	KOCHER et al., 1989
H15149	5'-AAACTGCAGCCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3'			
13A	5' -GTGGGGGAGGGGCGTTCT -3'	kDNA minicírculos	120 pb	RODGERS, et.al.,1990
13B	5' -ATTTTACACCAACCCCCAGTT -3'			
TRY927F	5' -GAAACAAGAAACACGGGAG -3'	SSU gene 18S rRNA	927 pb	SMITH, et.al., 2008
TRY927R	5' -CTACTGGGCAGCTTGA -3'			
SSU450F	5' -TGGGATAACAAAGGAGCA -3'	SSU gene 18S rRNA	aprox. 600 pb	SMITH, et.al., 2008
SSU450R	5' -CTGAGACTGTAACTCAAAGC -3'			
S4	5' -GATCCAGCTGCAGGTTCAACC -3'	SSU rDNA	540 pb	ULIANA, et.al.,1994
S12	5' -GGTTGATTCCGTCACGGAC -3'			
S17	5' -CCAAGCTGCCCAGTAGAAT -3'	SSU rDNA	439 pb	LIMA, et.al., 2010
S18	5' - TGC GGCGGATAAAACACC -3'			
LITSR	5'- CTGGATCATTTTCCGAT-3'	ITS1	300-350 pb	EL TAI, et al., 2000
L5.8S	5'- TGATACCACTTATCGCACTT-3'			

Diferenciação das espécies de *Leishmania* spp.

“Nested” SSU rDNA PCR

Inicialmente foi realizada a PCR com os oligonucleotídeos iniciadores S4 e S12 (ULIANA et al., 1994) que resultam na amplificação de fragmento de DNA de 540pb (Quadro 1). A reação foi realizada em volume final de 25µL, contendo 2µL de DNA genômico, 12,5µL de “HotStar Taq Plus Master mix kit” (Qiagen®); 0,25µL de oligoiniciadores a 20mM; 2,5µL de “Coral load” PCR buffer 10X (Qiagen®).

A segunda reação foi realizada com 1µL de DNA de produto amplificado de DNA da primeira reação, utilizando os oligoiniciadores internos S17-S18 (LIMA, 2011) com as mesmas condições e protocolo descritos para a primeira reação e que resultam num fragmento de 439pb (Quadro 1). Os resultados foram visualizados em gel de agarose 1,5%, coradas com brometo de etídio. Esta abordagem permite a diferenciação entre os subgêneros *L. Leishmania* e *L. Viannia*, uma vez sequenciado o fragmento amplificado.

ITS-PCR -RFLP

Outra abordagem para a diferenciação das espécies de *Leishmania* (*Leishmania*) foi realizada com a utilização dos oligonucleotídeos iniciadores LITSR e L5.8S (Quadro 1), descritos por El Tai et al. (2000), seguindo-se o protocolo de Schönián et al. (2003), que amplifica a região espaçadora interna transcrita (ITS1) situada entre os genes SSU e 5.8S rRNA. Após a amplificação, utilizou-se a enzima de restrição *HaeIII*, para a distinção entre a maioria das espécies de *Leishmania* com importância médica, tais como *Leishmania* (*L.*) *chagasi*, *Leishmania* (*V.*) *braziliensis* (CUPOLILLO et al., 1995; DAVILA & MOMEM, 2000; SCHÖNIAN et al., 2000; SCHÖNIAN et al, 2003) por “Restriction fragment length polymorphism”- PCR (PCR-RFLP). Com esta enzima os fragmentos gerados para *Leishmania* (*L.*) *chagasi* e a *Leishmania*

(*L.*) *infantum* apresentam fragmentos de 55, 72 e 187pb; já para *Leishmania* (*L.*) *amazonensis* os fragmentos grados são de aproximadamente 140 e 187pb e para *Leishmania* (*V.*) *braziliensis* os fragmentos são de 140 e 160pb (SCHÖNIAN et al, 2003).

A amplificação foi realizada com volume final de 50µL, contendo 1,5µL MgCl₂; 250mM de cada dNTP; 2,5µL de cada oligonucleotídeos iniciadores a 20mM; 5,0µL PCR buffer 10X (Qiagen®); 5µL de DNA genômico (20ng /µL) e 2U de “Taq polimerase Platinum” (Invitrogen®). As amostras foram amplificadas em aparelho termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems®) com desnaturação inicial de 94°C por 5min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30s, 53°C por 1 min, 72°C por 60s, e 72°C por 5 min para extensão final. Para o RFLP, foi utilizado 12µL do produto da PCR, adicionado 1µL da enzima *HaeIII*, mais 2µL de buffer 10X e água ultra-pura até completar o volume de 20µL, em seguida incubado a 37°C por uma hora e 80°C por vinte minutos. Os resultados foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, corados com nitrato de prata, o padrão de corte foi comparado ao padrão das amostras de referência.

Análise estatística

Foi realizado teste do Qui-quadrado para avaliar a associação entre o município de origem ou o hábito alimentar dos quirópteros e a presença do DNA de *Leishmania* spp. ou *Trypanosoma* spp. Adotou-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Os 375 quirópteros avaliados eram de 18 espécies, pertencentes a quatro diferentes famílias e com hábitos alimentares diversos (Tabela 1). Todas

as amostras foram amplificadas nas reações de controle interno para citocromo B, assim sendo consideradas adequadas para as demais etapas.

À PCR convencional, 4,5% (17/375) das amostras analisadas foram positivas para presença de kDNA de *Leishmania* spp., sendo 14 quirópteros exclusivamente positivos na amostra de baço, um somente na de pele e dois positivos em ambos os tecidos. A identificação de DNA genômico de *Trypanosoma* spp. ocorreu em 4,5% das amostras, 4 foram exclusivamente positivas na amostra de baço e 13 somente na de pele. Um dos quirópteros (*Molossus rufus*) apresentou positividade concomitante para ambos protozoários estudados.

Os quirópteros positivos para a presença de kDNA *Leishmania* spp. pertenciam a sete espécies diferentes (Tabela 1), sendo 76% insetívoros e 24% frugívoros. Quanto às amostras positivas para *Trypanosoma* spp. 9 espécies foram positivas (Tabela 1), sendo a maior representatividade entre os insetívoros (70,6%), seguida dos frugívoros (17,6%) e 11,8% eram hematófagos. Não se observou associação significativa entre o hábito alimentar e a presença de DNA dos protozoários avaliados.

Dentre os municípios analisados, seis tiveram resultados positivos para a presença de kDNA de *Leishmania* spp. (Figura 1): 9% (1/11) dos quirópteros eram provenientes do município de Guararapes, 6,7% (5/74) do município de Penápolis, 6,7% (3/17) de Ilha Solteira, 6,25% (1/16) de Pereira Barreto, 5,2% (2/38) de Birigui e 4,1% (5/121) de Araçatuba, cidades endêmicas para leishmaniose visceral com transmissão canina e humana (SÃO PAULO, 2011).

Quanto à presença de DNA genômico de *Trypanosoma* spp., 20% (1/5) dos quirópteros originários de Valparaíso eram positivos, 10% (1/10) de Castilho, 9,1% (1/11) de Panorama, 8,7% (2/23) de Andradina, 7,9% (3/38) de Birigui, 6,25% (1/16) de Pereira Barreto, 5,4% (4/74) de Penápolis e 3,3% (4/121) de Araçatuba.

Não se observou associação significativa entre o município de origem das amostras e o resultado da pesquisa de *Leishmania* spp. e o resultado da pesquisa de *Trypanosoma* spp.

Tabela 1. Espécies de quirópteros, hábitos alimentares e a positividade para a presença de DNA de kinetoplasto de *Leishmania* spp. ou DNA de *Trypanosoma* spp.

Características dos quirópteros				Positivos para <i>Leishmania</i> spp.				Positivos para <i>Trypanosoma</i> spp.			
Família	Espécie	Hábito alimentar	n (%)	baço	pele	ambos	Total	baço	pele	ambos	Total
Molossidae	<i>Eumops glaucinus</i>	insetívoro	29 (7,73)	2			2				
	<i>Eumops perotis</i>	insetívoro	1 (0,27)								
	<i>Molossus molussus</i>	insetívoro	75 (20)	1			1	3			3
	<i>Molossus rufus</i>	insetívoro	102 (27,20)	6	1	2	9		6		6
Noctilionidae	<i>Noctilio albiventris</i>	insetívoro e piscívoro	7 (1,87)								
	<i>Artibeus jamaicensis</i>	frugívoro	32 (8,53)								
	<i>Artibeus lituratus</i>	frugívoro	21 (5,6)						1		1
	<i>Artibeus planirostris</i>	frugívoro	1 (0,27)								
Phyllostomidae	<i>Carollia perpicillata</i>	frugívoro	23 (6,13)	1			1	1			1
	<i>Desmodus rotundus</i>	hematófago	21 (5,6)						2		2
	<i>Glossophaga soricina</i>	frugívoro	11 (2,93)	1			1		1		1
	<i>Phyllostomus hastatus</i>	frugívoro, insetívoro	4 (1,07)								
	<i>Platyrrhinus lineatus</i>	frugívoro	15 (4,0)	2			2				
	<i>Sturnira lirim</i>	frugívoro	1 (0,27)								
	<i>Eptesicus furinalis</i>	insetívoro	3 (0,80)						1		1
Vespertilionidae	<i>Lasiurus blossevillei</i>	insetívoro	1 (0,27)						1		1
	<i>Lasiurus ega</i>	insetívoro	9 (2,40)								
	<i>Myotis nigricans</i>	insetívoro	19 (5,07)	1			1		1		1
TOTAL			375 (100)	14	1	2	17	4	13		17

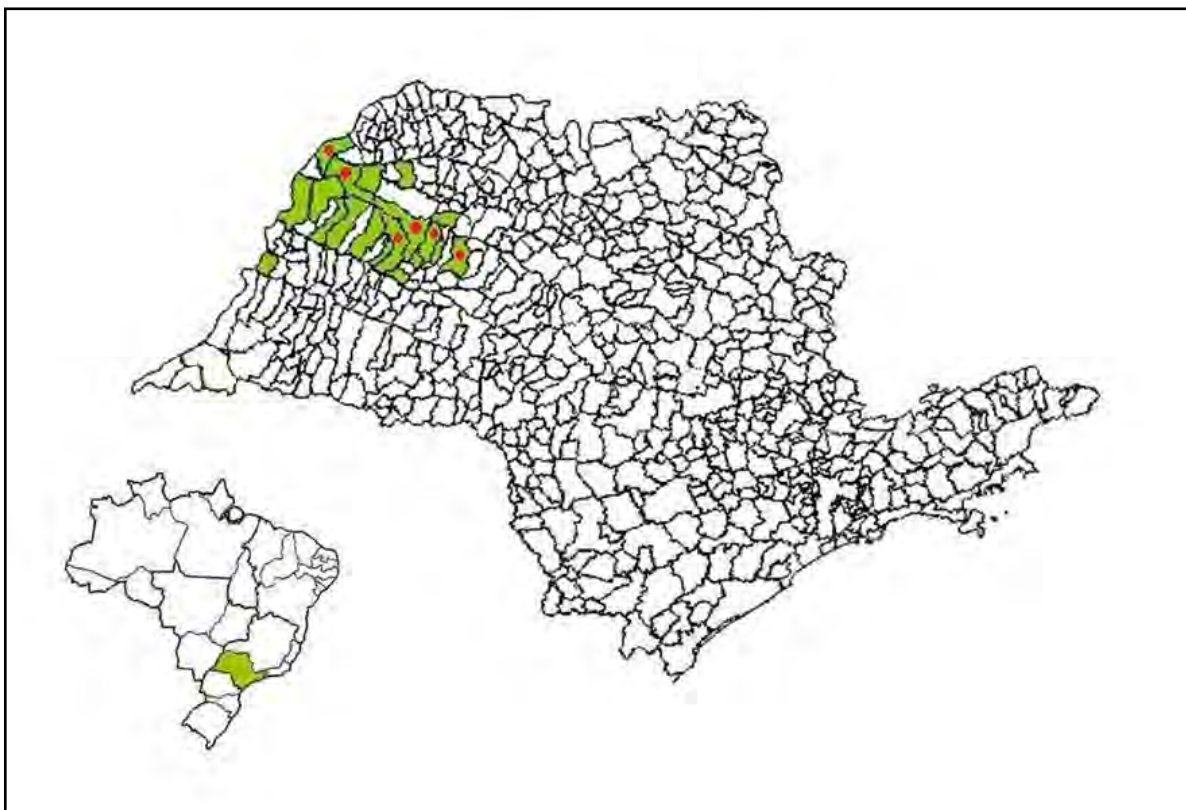


Figura 1. Localização dos municípios de origem dos quirópteros, do Estado de São Paulo, Brasil (destacados em verde). Municípios com amostras positivas para *Leishmania* spp. (destacados em vermelho).

Diferenciação das espécies de *Leishmania*

Por meio das técnicas de “nested”-PCR SSU rDNA que diferencia os subgêneros *L. Leishmania* e *L. Viannia*, oito amostras resultaram em amplificação de fragmento de DNA de 439pb, por se tratar de uma região de amplificação que apresenta baixo número de cópias, de 40-200 cópias por célula (SCHÖNIAN et al., 2011) poucas amostras foram positivas com esta abordagem. Esses fragmentos serão sequenciados para posterior análise de diferenças entre suas sequências.

A amplificação, por PCR, de fragmento de 300-350pb de DNA da região espaçadora interna transcrita (ITS-1) foi positiva em 14 amostras. Após a digestão com a enzima *HaeIII*, duas das amostras dos quirópteros apresentaram padrão idêntico a *Leishmania (L.) chagasi* e a *Leishmania (L.) infantum*, com fragmentos de 55, 72 e 187pb (Figura 2, amostra 4). Para as demais amostras, nove apresentaram padrão de *Leishmania (L.) amazonensis* com fragmentos digeridos de aproximadamente 140 e 187pb (Figura 2 – amostras de 2-10).

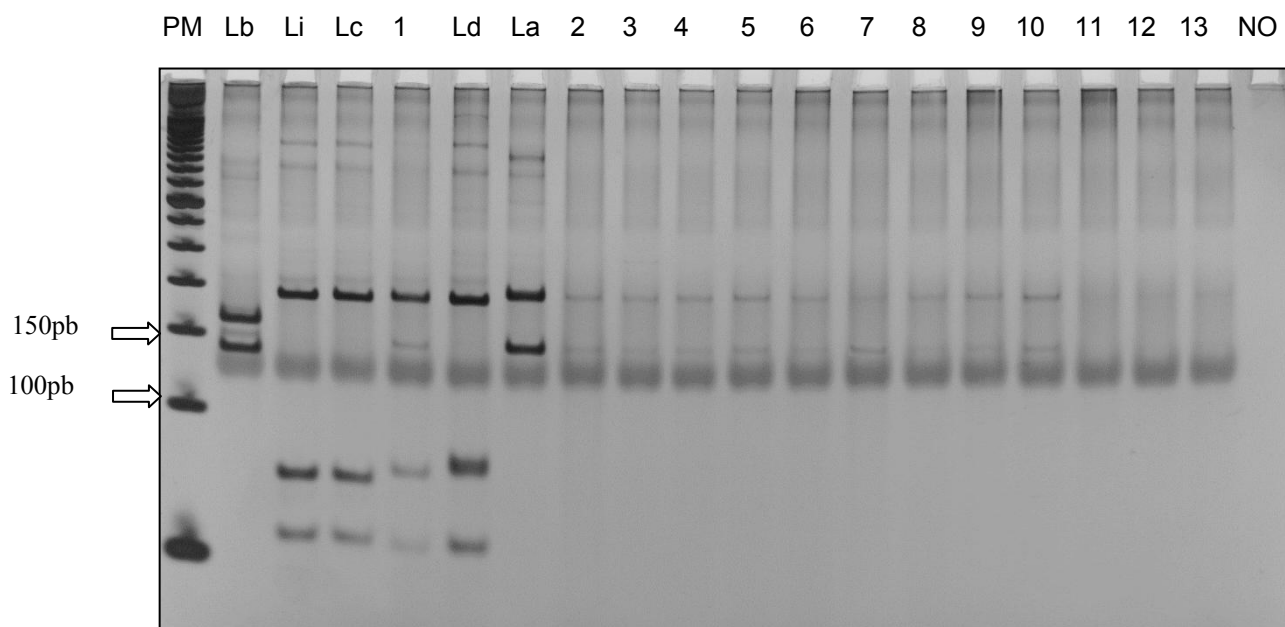


Figura 2. Eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, corado com nitrato de prata. Produtos de amplificação de DNA, por PCR-RFLP. (Lb) – *Leishmania (Viannia) braziliensis* (L566 MHOM/BR/1974/M2903); (Li)- *Leishmania (Leishmania) infantum*; (Lc)- *Leishmania (L.) chagasi* (L579 MHOM/BR/1974/PP75); (1)- Amostra de quiróptero; (Ld)- *Leishmania (L.) donovani*; (6)- *Leishmania (L.) amazonensis* (L575 MHOM/BR/2001/JLM); (2-13) amostras de morcegos; NO amostra sem DNA. PM marcador de peso molecular em escada de 50pb.

DISCUSSÃO

Neste estudo observou-se a presença de kDNA de *Leishmania* spp. em 4,5% dos quirópteros oriundos da região urbana do oeste do Estado de São Paulo. Savani et al. (2010) detectaram a presença de DNA de *Leishmania* spp. em 3,2% dos morcegos do município de São Paulo, porém as amostras eram predominantemente de áreas não urbanas.

Os quirópteros do presente estudo eram provenientes de áreas urbanizadas, porém endêmicas para leishmaniose visceral, diferentemente dos avaliados por Savani et al. (2010), os quais eram predominantemente oriundos de regiões de mata (Serra da Cantareira e Serra do Mar) onde há raros casos de leishmaniose tegumentar americana, área não endêmica para leishmaniose visceral.

Além da importância de se detectar a ocorrência de DNA de *Leishmania* spp. nos animais investigados, a identificação das espécies do protozoário é fundamental para estabelecer a possibilidade de serem hospedeiros da doença.

A ocorrência das espécies de *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) amazonensis* em quirópteros foi observada por Savani et al. (2010) tal qual no presente estudo, reforçando o fato de albergarem *Leishmania* spp. e, em maior ocorrência do agente causador da leishmaniose cutânea. A presença de *L. (L.) amazonensis* já havia sido diagnosticada num cão na cidade de Araçatuba-SP (TOLEZANO, et al., 2007), que confirma a ocorrência da espécie em questão na região.

A presença de DNA de *Leishmania* spp. em amostras de pele e baço de quirópteros difere dos resultados de Rotureau et al. (2006) que analisaram 216 morcegos provenientes de florestas primárias e secundárias na Guiana Francesa, onde existiam casos de leishmaniose tegumentar e não observaram amplificação de DNA de *Leishmania* spp. Essa diferença pode estar relacionada ao gene alvo utilizado para a detecção de parasitas, esses autores utilizaram o gene que codifica para RNA ribossomal, presente em menor número de cópias que o DNA de cinetoplasto utilizado. De forma semelhante à

observada no presente estudo, em que a detecção de DNA de *Leishmania* spp. na abordagem de diferenciação que amplificava a região do rRNA teve menor detecção comparada à de amplificação da região do cinetoplasto.

Já a presença de *Leishmania chagasi* em um morcego frugívoro (*Carollia perspicillata*), oriundo de área livre de casos de leishmaniose visceral, mas com alguns casos esporádicos de leishmaniose cutânea, foi observada em zona de mata da Venezuela (DE LIMA, et al., 2008), o que difere da presente pesquisa realizada em área endêmica urbana para leishmaniose visceral.

Neste estudo, 76,5% dos quirópteros positivos para *Leishmania* spp. eram espécies insetívoras, tal qual observado no estudo de Savani et al. (2010), tais resultados podem ser devido a viés de amostragem já que a maioria dos morcegos avaliados, em ambos estudos, era *Molossus molossus* e *Molossus rufus*, espécies comumente encontradas na região de São Paulo.

As amostras analisadas nesta pesquisa eram originárias de dezenove municípios, entretanto, a positividade para *Leishmania* spp. foi observada em quirópteros de apenas seis municípios (Figura 1), os quais são epidemiologicamente classificados como de transmissão intensa para leishmaniose visceral, em cães e humanos, nestas seis localidades houve registros de casos humanos em 2011 (SÃO PAULO, 2011). A maior incidência de leishmaniose visceral em humanos nessas localidades pode, de fato, estar relacionada à detecção de morcegos positivos nestes municípios, porém tal associação não pode ser afirmada com o presente estudo, mesmo porque a maior ocorrência foi de *Leishmania amazonensis*, agente causador da leishmaniose tegumentar.

A ocorrência de *Trypanosoma* spp. em 4,5% dos quirópteros da presente pesquisa também já foi relatada por outros autores (BARROS et al., 2008; BOWER & WOO et al., 1981; MARINKELLE et al., 1976; STEINDEL et al., 1998). Entretanto, dada a diversidade de espécies observadas em morcegos, a diferenciação destas não foi objeto desta pesquisa. No presente estudo, a maioria dos quirópteros era de áreas urbanas, à semelhança dos

avaliados por Barros et al. (2008) que observaram ocorrência de *Trypanosoma* spp. (25,6%) em morcegos de municípios do Rio de Janeiro.

A co-infecção de *Leishmania* spp. e *Trypanosoma* spp. observada na presente pesquisa também foi observada no estudo de Savani et al. (2010), embora os quirópteros tenham sido avaliados apenas sorologicamente para *Trypanosoma cruzi* naquele estudo.

A evidência da presença de DNA de *Leishmania* spp. em quirópteros originários de região endêmica para leishmaniose visceral no Estado de São Paulo, Brasil, indica que esses animais silvestres e abundantes na natureza podem ser capazes de albergar *Leishmania* spp. e podem atuar como potenciais reservatórios, devido a longevidade e grande capacidade de dispersão que apresentam, fatores que podem colaborar para a atuação como reservatórios, e assim favorecer a manutenção do ciclo das leishmanioses nestas áreas.

CONCLUSÃO

Há ocorrência de *Leishmania chagasi* e *Leishmania amazonensis* em morcegos de áreas endêmicas para leishmaniose visceral. Tal resultado alerta para o fato de que estes possam ser hospedeiros acidentais ou até mesmo reservatórios de leishmaniose, podendo contribuir para a manutenção desta zoonose.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Eloy Pereira por ter gentilmente cedido exemplares de quirópteros da cidade de Iguape-SP; ao Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares por ter cedido amostras de DNA de *Leishmania* do painel da FIOCRUZ e à Profa. Valéria Marçal Felix de Lima por ter cedido amostras de *Trypanosoma cruzi* e de *Leishmania (L.) chagasi* mantidas em cultivo. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo suporte financeiro (Processo nº 2011/19087-3).

REFERÊNCIAS

BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; GRIMALDI, G., Jr.; MOMEM, H.; MCMAHON-PRATT, D.; RIBEIRO DE JESUS, A.; ALMEIDA, R.; BADARO, R.; BARRAL-NETTO, M.; CARVALHO, E.M.; JOHNSON, W.D., JR. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v.44, p.536-546, 1991.

BARROS, J.H.S., ROMIJN, P.C.; BAPTISTA, C.; PINTO, A.G.S.; MADEIRA, M.F. Relato de infecção natural de morcegos por flagelados tripanosomatídeos em diferentes municípios do Estado do Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.41, p.683-685, 2008.

BOWER, S.M.; WOO, P.T.K.. Two new species of trypanosomes (subgenus *Schizotrypanum*) in bats from southern Ontário. **Canadian Journal of Zoology**, v.59, p.530-545, 1981.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria De Vigilância em Saúde. Departamento de vigilância epidemiológica. **Manual de Vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portal da Saúde** (Dados do SINAN). Disponível:<http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1560> 2010. Acesso em 18 de Janeiro de 2011.

COURTENAY, O.; MACDONALD, D.W.; LAINSON, R.; SHAW, J.J.; DYE, C. Epidemiology of canine leishmaniasis: a comparative serological study of dogs and foxes in Amazon Brazil. **Parasitology**, v.109, p.273-279, 1994.

CUPOLILLO, E.; GRIMALDIM JR, G.; MOMEN, H.; BEVERLEY, S.M. Intergenic region typing (ITR): a rapid molecular approach to the

characterization and evolution of *Leishmania*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.73, p.145-155, 1995.

DAVILA, A.M.; MOMEN, H. Internal-transcribed-spacer (ITS) sequences used to explore phylogenetic relationships within *Leishmania*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.94, p.651-654, 2000.

DEANE, M.P.; DEANE, L.M. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios da *Leishmania donovani*, em área endêmica de Calazar, no Ceará. **O Hospital**, v.48, p.79-98, 1955.

DE LIMA, H.; RODRÍGUEZ, N.; BARRIOS, M.A.; ÁVILA, A.; CAÑIZALES, I.; GUTIÉRREZ, S.; Isolation and molecular identification of *Leishmania chagasi* from a bat (*Carollia perspicillata*) in northeastern Venezuela. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v.103, p.412-414, 2008.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.27, p.305-318, 2004.

EL TAI, N.O.; OSMAN, O.F.; EL FARI, M.; PRESBER, W.; SHONIAN, G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer (its) in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper a revealed by single-strand conformation polymorphisms (sscp) and sequencing. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.94, p.1-5, 2000.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. **International Journal for Parasitology**, v.35, p.1169-1180, 2005.

KATO, H.; GOMEZ, E.A.; CÁCERES, A.G.; UEZATO, H.; MIMORI, T.; HASHIGUCHI, Y. Molecular epidemiology for vector research on leishmaniasis. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v.7, p.814-826, 2010.

KOCHER, T.D.; THOMAS, W.K.; MEYER, A. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**, v.86, p.6196-6200, 1989.

LAMPO, M.; FELICIANGELI, M.D.; MARQUEZ, L.M.; BASTIDAS, C.; LAU, P. A possible role of bats as a blood source for the *Leishmania* vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.62, p.718–719; 2000.

LIMA, A.C.S.; ZAMPIERI, R.A.; TOMOKANE, T.Y.; LAURENTI, M.D.; SILVEIRA, F.D.; CORBETT, C.E.P.; FLOETER-WINTER, L.M.; GOMES, C.M.C. *Leishmania* sp. Identification by PCR associated with sequencing of target SSU rDNA in paraffin-embedded skin samples stores for more than 30 years. **Parasitology Research**, v.108, p.1525-1531, 2011.

MARINKELLE, C.J..The biology of the trypanosomes of bats. *In*: LUMDSEN, W.H.R.; EVANS, D.A. (eds) Biology of the Kinetoplastida. **Academic Press: New York**, p.175-216, 1976.

MOLYNEUX, D.H.; Trypanosomes of bats. *In*: Kreier JP, Baker JR (eds) **Parasitic protozoa**. Academic Press, San Diego, p. 195-224, 1991.

NAIFF, R.D.; TALHARI, S.; BARRETT, T.V. Isolation of *Leishmania guyanensis* from lesions of the nasal mucosa. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.83, p.529-530, 1988.

OSORIO, L.E.; CASTILHO, C.M.; OCHOA, M.T. Mucosal leishmaniasis due to *Leishmania* (*Viannia*) *panamensis* in Colombia: clinical characteristics. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v.59, p.49-52, 1998.

QUINTAL, A.P.N.; RIBEIRO, E.S.; RODRIGUES, F.P.; ROCHA, F.S.; FLOETER-WINTER, L.M.; NUNES, C.M. *Leishmania* spp. in *Didelphis albiventris* and *Micoureus paraguayanus* (Didelphimorphia: Didelphidae) of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.176, p.112-119, 2010.

REIS, N.R. DOS; PERACCHI, A.L.; PEDRO, W.A.; LIMA, I.P. **Morcegos do Brasil**, Editora UEL, Londrina-PR, p.253, 2007.

REIS, N.R.; PERACCHI, A.L.; PEDRO, W.A. & LIMA, I.P. (Orgs). **Mamíferos do Brasil**, 2ª Edição, p.435, 2011.

RODGERS, M.R.; POPPER, S.J.; WIRTH, D.F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. **Experimental Parasitology**, v.71, p.267-275, 1990.

ROTUREAU, B.; CATZEFLIS, F.; CARME, B. Short report: absence of *Leishmania* in Guianan Bats. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.74, p.318-321, 2006.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: a laboratory manual, 2nd Ed. N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, p.1659, 1989.

SANTIAGO, M.E.B.; VASCONCELOS, R.O.; FATTORI, K.R.; MUNARI, D.P.; MICHELIN, A.F.; LIMA, V.M.F. An investigation of *Leishmania* spp. in *Didelphis* ssp. from urban and peri-urban areas in Bauru (São Paulo, Brazil). **Veterinary Parasitology**, v.150, p.283-290, 2007.

SÃO PAULO, BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO PAULISTA. Classificação epidemiológica dos municípios segundo o Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo, atualizado em Novembro de 2011. **Bepa**, v.96, p.32-36, 2011.

SARAVIA, N.G.; HOLGUÍN, A.F.; CIBULSKIS, R.E.; D'ALESSANDRO, A. Divergent isoenzyme profiles of sylvatic and domiciliary *Trypanosoma cruzi* in the eastern plains, piedmont, and highlands of Colômbia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** v.36, p.59-69, 1987.

SAVANI, E.S.M.M.; ALMEIDA, M.F.; CAMARGO, M.C.G.O.; DAURIA, S.R.N; SILVA, M.M.S.; OLIVEIRA, M.L.; SACRAMENTO, D.R.V.. Detection of

Leishmania (Leishmania) amazonensis and *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in Brazilian bats. **Veterinary Parasitology**, v.168, p.5-10; 2010.

SCHÖNIAN, G.; AKUFFO, H.; LEWIN, S.; MAASHO, K.; NYLÉN, S.; PRATLONG, F.; EISENBERGER, C.L.; SCHNUR, L.F.; PRESBER, W. Genetic variability within the species *Leishmania aethiopica* does not correlate with clinical variations of cutaneous leishmaniasis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 106, p.239-248, 2000.

SCHÖNIAN, G.; NASEREDDIN, A.; DINSE, N.; SHWEYNOCH, C.; SCHALLIG, H.D.F.H.; PRESBER, W.; JAFFE, C.L. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.47, p.349-358, 2003.

SCHÖNIAN, G.; KUHLS, K.; MAURICIO, I.L. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. Review article, **Parasitology**, v.138, p.405-145, 2011.

SMITH, A.; CLARK, P.; AVERIS, S.; LYMBERY, A.J.; WAYNE, A.F.; MORRIS, K.D.; THOMPSON, R.C.A.. Trypanosomes in a declining species of threatened Australian marsupial, the brush-tailed betong *Bettongia penicillata* (Marsupialia: Potoroidae). **Parasitology**, v.135, p.1329-1335; 2008.

STEINDEL, M.; GRISARD, E.C.; PINTO, C.J.C.; CORDEIRO, F.D.; RIBEIRO-RODRIGUES, R.; ROMANHA, A.J.. Characterization of trypanosomes from the the subgenus *Schizotrypanum* isolated from bats, *Eptesicus* sp. (Chiroptera: Vespertilionidae), captured in Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. **Journal of Parasitology**, v.84, p.601-607, 1998.

TOLEZANO, J.E.; ULIANA, S.R.B. TANIGUSHI, H.H.; ARAUJO, M.F.L.; BARBOSA, J.A.R.; BARBOSA, J.E.R.; FLOETER-WINTER, L.M.; SHAW, J.J. The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from

Araçatuba County, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.149, p.280-284, 2007.

TRAVI, B.L.; OSORIO, Y.; GUARÍN, N.; CADENA, H. *Leishmania (Leishmania) chagasi*: clinical and parasitological observations in experimentally infected *Didelphis marsupialis*, reservoir of New World visceral leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v.88, p.73-75, 1998.

ULIANA, S.R.; NELSON, K.; BEVERLY, S.M.; CAMARGO, E.P.; FLOETER-WINTER, L.M. Discrimination amongst *Leishmania* by polymerase chain reaction and hybridization with small subunit ribosomal DNA derived oligonucleotides. **Journal of Eukaryote Microbiology**, v.41, p.324–330, 1994.

VIZOTTO, L.D.; TADDEI, V.A. Chave para a determinação de quirópteros brasileiros. **Boletim de Ciências**, São José do Rio Preto, v.1, p.1-72, 1973.