

Identificação de espécies de *Leishmania* isoladas de casos humanos em Mato Grosso do Sul por meio da reação em cadeia da polimerase

Identification of *Leishmania* species isolated in human cases in Mato Grosso do Sul, by means of the polymerase chain reaction

Manoel Sebastião da Costa Lima Junior¹, Renato Andreotti², Maria Elizabeth Moraes Cavalheiros Dorval³, Elisa Teruya Oshiro³, Alessandra Gutierrez de Oliveira³ e Maria de Fatima Cepa Matos⁴

RESUMO

As leishmanioses são zoonoses endêmicas em Mato Grosso do Sul e têm por agentes etiológicos nessa região *Leishmania (Leishmania) chagasi*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Como método para identificação de espécies de *Leishmania*, a reação em cadeia da polimerase é uma ferramenta com elevada especificidade e sensibilidade. Analisaram-se 39 isolados de *Leishmania* criopreservados, obtidos por meio de aspirado medular e/ou biópsia de lesão, conforme a suspeita clínica. Os isolados foram submetidos à extração de DNA e à reação em cadeia da polimerase com os iniciadores: RV1/RV2 para *Leishmania (Leishmania) chagasi*, a1/a2 para a identificação de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e b1/b2 para *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Leishmania (Leishmania) chagasi* foi a única espécie identificada em 37 casos de leishmaniose visceral. *Leishmania (Leishmania) amazonensis* foi identificada em dois isolados de pacientes com diagnóstico de leishmaniose tegumentar. Os resultados obtidos confirmam a possibilidade do uso dos três pares de iniciadores como uma ferramenta na caracterização de isolados de *Leishmania*.

Palavras-chaves: *Leishmania*. Leishmaniose visceral. Leishmaniose tegumentar. Reação em cadeia da polimerase. Mato Grosso do Sul.

ABSTRACT

Leishmaniasis are endemic zoonoses in the State of Mato Grosso do Sul. Their etiological agents in this region of Brazil are *Leishmania (Leishmania) chagasi*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. The polymerase chain reaction (PCR) is a tool with high specificity and sensitivity for identifying *Leishmania* species. This study examined 39 cryopreserved isolates of *Leishmania* that had been collected by bone marrow aspiration and/or lesion biopsy, depending on the clinical suspicion. The isolates were subjected to DNA extraction and PCR using the following primers: RV1/RV2 for identifying *Leishmania (Leishmania) chagasi*, a1/a2 for *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and b1/b2 for *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Leishmania (Leishmania) chagasi* was the only species identified in the 37 cases of visceral leishmaniasis. *Leishmania (Leishmania) amazonensis* was identified in two isolates from patients with a diagnosis of cutaneous leishmaniasis. The results obtained confirm that it is possible to use these three pairs of primers as a tool for characterizing *Leishmania* isolates.

Key-words: *Leishmania*. Visceral leishmaniasis. Cutaneous leishmaniasis. Polymerase chain reaction. Mato Grosso do Sul.

1. Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS. 2. Embrapa Gado de Corte, Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS. 3. Departamento de Patologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS. 4. Departamento de Farmácia-Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS.

Apoio financeiro: Fundect/MS.

Endereço para correspondência: Dra. Maria de Fátima Cepa Matos. Dept^o de Farmácia-Bioquímica/CCBS/UFMS. Caixa Postal 549, 79070-900 Campo Grande, MS.

Tel: 55 67 3345-7358

e-mail: mfcmatos@nin.ufms.br

Recebido para publicação em 17/12/2008

Aceito em 03/04/2009

As leishmanioses são zoonoses que se apresentam sob diferentes formas clínicas, a leishmaniose tegumentar cutânea, mucocutânea e cutânea difusa, e a leishmaniose visceral^{27,28}.

A identificação das espécies de *Leishmania* que circulam em determinado foco de transmissão, particularmente em regiões onde as diferentes formas clínicas ocorrem simultaneamente, é muito importante para o conhecimento da epidemiologia das leishmanioses e planejamento de estratégias de controle².

Tratando-se de leishmaniose visceral nas Américas, a única espécie considerada responsável pela doença é *Leishmania (Leishmania) chagasi*, embora já se tenha descrito *Leishmania (Leishmania) amazonensis*⁵ e *Leishmania (Viannia) braziliensis*⁴⁸ como

agentes de leishmaniose visceral, destacando-se, portanto, a importância da identificação do agente causal por métodos específicos e não por correlação sintomatológica à espécie usualmente conhecida.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica altamente sensível e específica, e pode detectar o DNA ou RNA do parasita⁴⁹⁻⁵², em diagnóstico humano⁴⁷, canino²⁰⁻⁴⁴ e em flebotomíneos²⁴⁻³⁵⁻³⁶, sendo também útil na caracterização de isolados humanos³⁷.

O DNA de cinetoplasto (kDNA) de *Leishmania* tem sido utilizado como uma ferramenta de diagnóstico pela PCR, devido a capacidade de detectar pequenas quantidades de DNA do parasito em materiais biológicos, o que se deve à abundância de minicírculos²⁻⁴⁻⁷⁻¹².

O alto grau de polimorfismo do kDNA juntamente com regiões conservadas¹⁰⁻¹²⁻¹⁴⁻¹⁷ favorecem a sua utilização para fins taxonômicos e genéticos². Por essa razão, os iniciadores utilizados neste trabalho possuem como alvo sequências do minicírculo, possibilitando a distinção entre *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis*⁸⁻²⁶.

Os iniciadores RV1 e RV2 têm sido utilizados com sucesso na identificação de *Leishmania (Leishmania) chagasi* em sangue e urina de humanos¹⁵⁻²⁹⁻⁴⁷, cães¹⁵⁻¹⁸⁻²⁰, e em flebotomíneos de Mato Grosso do Sul⁴⁶, enquanto a1/a2 e b1/b2 são os iniciadores que permitem, respectivamente, a identificação de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* em amostras provenientes de biópsia de lesão em humanos²³⁻²⁶⁻³⁷.

A utilização destes iniciadores na identificação de espécies de *Leishmania* em isolados humanos criopreservados, por meio da reação em cadeia da polimerase constitui o objetivo deste trabalho.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolados. Trata-se de um estudo com 39 isolados de *Leishmania sp* criopreservados no Laboratório de Parasitologia do Departamento de Patologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), coletados no período de janeiro de 2007 a janeiro de 2008, à exceção de uma amostra do ano de 2003. Amostras de sangue medular ou de tecido da borda da lesão foram coletadas de pacientes com leishmaniose visceral e tegumentar, provenientes de diferentes instituições de saúde de Mato Grosso do Sul, e encaminhadas ao Laboratório de Parasitologia para diagnóstico, caracterizando-as como amostras de conveniência. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética para Pesquisa em Seres Humanos (CEP) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Cultura. As amostras foram cultivadas em meio Nicolle, Novy e McNeal (NNN) com fase líquida Schneider's medium, pH 7.2 e 20% soro fetal bovino. Após o isolamento e crescimento, para a obtenção de massa parasitária, a mesma foi armazenada com glicerol em nitrogênio líquido.

Extração de DNA. As extrações de DNA a partir das formas promastigotas em cultura foram realizadas pelo método de fenol-clorofórmio¹.

Reação em cadeia da polimerase. A reação foi padronizada com os DNAs controle fornecidos pelo Laboratório de Leishmanioses do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ (Belo Horizonte, Brasil): *Leishmania (Leishmania) chagasi* (MHOM/BR/74/PP/75), *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IPLA/BR/67/PH8), levando-se em consideração o tamanho do produto esperado e as temperaturas de anelamento dos *primers*.

Para *Leishmania (Leishmania) chagasi* foram utilizados os iniciadores RV1- CTTTCTGGTCCCGCGGTAGG e RV2- CACCTGGCCTATTTCACCA com produto esperado de 145pb²⁰, para *Leishmania (Leishmania) amazonensis* os iniciadores a1- TGCGAGGATAAAGGGAAAGAA e a2- TGCCCTGACTTGCATGTCTA com produto esperado de 62pb²⁶, e para *Leishmania (Viannia) braziliensis*, os iniciadores b1- GTGGGCGTATCTGCTGATGAC e b2 - CAAAAAGCGAGGGACTGCGGA com produto esperado de 103pb²⁶.

Condições das PCR: a) RV1/RV2 com volume de 25µL: tampão 2X Phoeutria, dNTPs 0,2mM, MgCl₂ 0,3mM, iniciadores 0,16pmol, Taq polimerase Phoeutria 4U, DNA 0,5µL, água 19,4µL e termociclador BIOER modelo XP cycler. Os ciclos foram de 95°C - 5min, 40 ciclos de: 94°C - 30 seg, 70°C - 1 min, 72°C - 1 min e extensão final de 72°C - 10 min. b) a1/a2 com volume de 25µL: tampão 2X Phoeutria (Belo Horizonte, MG), dNTPs 0,2 mM, MgCl₂ 0,3mM, iniciadores a1/a2 0,4pmol, Taq polimerase 4U Phoeutria, DNA 0,5µL, água 18,8µL e termociclador BIOER modelo XP cycler. Os ciclos foram de 95°C - 5min, 35 ciclos de: 95°C - 30 seg, 55°C - 1 min e 30 seg, 72°C - 1 min/ 30 seg e extensão final de 72°C - 10 min. c) b1/b2 com volume de 25µL: tampão 2X Phoeutria, dNTPs 0,2mM, MgCl₂ - 0,3mM, iniciadores a1/a2 1 pmol, Taq polimerase 4U Phoeutria, DNA 0,5µL, água 17,3µL e termociclador BIOER modelo XP cycler. Os ciclos foram de 95°C - 5 min, 35 ciclos de: 95°C - 30 seg, 70°C - 1 min e 30 seg, 72°C - 1 min/30 seg e extensão final de 72°C - 10 min.

Eletroforese em gel de agarose. Realizou-se a eletroforese submarina horizontal em gel de agarose a 2% com tampão tris-EDTA-acetato (TAE) 1X pH 8,0 a 80v e 400mA (tris-acetato 0,04M, EDTA 0,001M⁴²). Os géis foram corados com brometo de etídeo (0,5µg/mL) e visualizados em luz ultravioleta. Para a análise dos produtos da PCR a1/a2, o gel foi de 3% em tampão TBE (tris base, ácido bórico e EDTA).

RESULTADOS

Os resultados da amplificação dos DNAs das cepas referência para as três espécies de *Leishmania* com os iniciadores RV1/RV2, a1/a2 e b1/b2 estão apresentados nas **Figuras 1, 2 e 3**, respectivamente, junto a alguns isolados do presente estudo.

Foram avaliados pela PCR 39 isolados humanos, sendo que 37 foram positivos para *Leishmania (Leishmania) chagasi* e dois para *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (**Tabela 1**). Não se identificou *Leishmania (Viannia) braziliensis* nas amostras analisadas.

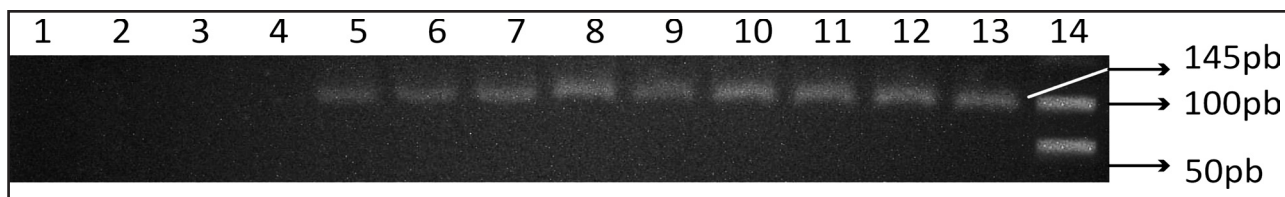


FIGURA 1

Produtos de amplificação da PCR com os iniciadores RV1/RV2: 1- Cepa-referência *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), 2- Cepa-referência *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IPLA/BR/67/PH8), 3- Controle negativo, 4- MHOM/BR/2007/WP, 5- MHOM/BR/2007/TJAJ, 6- Cepa-referência *Leishmania (Leishmania) chagasi* (MHOM/BR/74/PP/75), 7- MHOM/BR/2007/JTN, 8- MHOM/BR/2007/WLN, 9- MHOM/BR/2007/JRC, 10- MHOM/BR/2007/DBA, 11- MHOM/BR/2007/CR, 12- MHOM/BR/2007/ MAN, 13- MHOM/BR/2007/LSB, 14- Marcador de 50pb.



FIGURA 2

Produtos de amplificação da PCR com os iniciadores a1/a2: 1- Cepa-referência *Leishmania (Leishmania) chagasi* (MHOM/BR/74/PP/75), 2- Cepa-referência *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) 3- Controle negativo, 4- Cepa-referência *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IPLA/BR/67/PH8), 5- MHOM/BR/2007/WP, 6- MHOM/BR/2007/TJAJ, 7-, MHOM/BR/2007/JTN, 8- MHOM/BR/2007/WLN, 9- MHOM/BR/2007/JRC, 10- MHOM/BR/2007/DBA, 11- MHOM/BR/2007/CR, 12- MHOM/BR/2007/ MAN, 13- MHOM/BR/2007/LSB, 14- Marcador de 50pb.

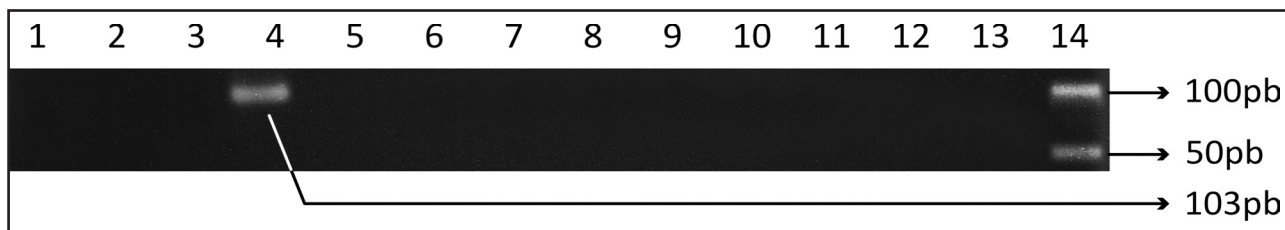


FIGURA 3

Produtos de amplificação da PCR com os iniciadores b1/b2: 1- Cepa-referência *Leishmania (Leishmania) chagasi* (MHOM/BR/74/PP/75), 2- Cepa-referência *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IPLA/BR/67/PH8), 3- Controle negativo, 4- Cepa-referência *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) 5- MHOM/BR/2007/ WP, 6- MHOM/BR/2007/TJAJ, 7-, MHOM/BR/2007/JTN, 8- MHOM/BR/2007/WLN, 9- MHOM/BR/2007/JRC, 10- MHOM/BR/2007/DBA, 11- MHOM/BR/2007/CR, 12- MHOM/ BR/2007/MAN, 13- MHOM/BR/2007/LSB, 14- Marcador de 50pb.

TABELA 1

Resultados das amplificações por PCR em isolados de *Leishmania* no Estado de Mato Grosso do Sul.

Isolados	RV1/ RV2	a1/a2	b1/b2	Procedência	Forma clínica	Isolados	RV1/RV2	a1/a2	b1/b2	Procedência	Forma clínica
MHOM/BR/2007/JTN	+	-	-	Campo Grande	IV	MHOM/BR/2007/FFF	+	-	-	Campo Grande	IV
MHOM/BR/2007/WLN	+	-	-	Campo Grande	IV	MHOM/BR/2007/RM	+	-	-	Campo Grande	IV
MHOM/BR/2007/JRC	+	-	-	Glória de Dourados	IV	MHOM/BR/2007/SALG	+	-	-	Campo Grande	IV
MHOM/BR/2007/DBA	+	-	-	Campo Grande	IV	MHOM/BR/2007/JGO	+	-	-	Campo Grande	IV
MHOM/BR/2007/CR	+	-	-	Campo Grande	IV	MHOM/BR/2007/MC	+	-	-	Campo Grande	IV
MHOM/BR/2007/MAN	+	-	-	Campo Grande	IV	MHOM/BR/2007/JCDS	+	-	-	Bodoquena	IV
MHOM/BR/2007/LSB	+	-	-	Ponta Porã	IV	MHOM/BR/2007/JFVL	+	-	-	Campo Grande	IV
MHOM/BR/2007/JVCS	+	-	-	Campo Grande	IV	MHOM/BR/2007/PHTS	+	-	-	Anastácio	IV
MHOM/BR/2007/SALS	+	-	-	Campo Grande	IV	MHOM/BR/2007/LPS	+	-	-	Campo Grande	IV
MHOM/BR/2007/WMS	+	-	-	Campo Grande	IV	MHOM/BR/2007/LBO	+	-	-	Campo Grande	IV
MHOM/BR/2007/SMA	+	-	-	Aquidauana	IV	MHOM/BR/2007/JVF	+	-	-	Rochedo	IV
MHOM/BR/2007/FSB	+	-	-	Campo Grande	IV	MHOM/BR/2007/WCS	+	-	-	Campo Grande	IV
MHOM/BR/2007/HRP	+	-	-	Terenos	IV	MHOM/BR/2007/VL	+	-	-	Campo Grande	IV
MHOM/BR/2007/KSG	+	-	-	Campo Grande	IV	MHOM/BR/2007/ACB	+	-	-	Campo Grande	IV
MHOM/BR/2007/ARL	+	-	-	Campo Grande	IV	MHOM/BR/2007/WP	-	+	-	Chapadão do Sul	IT
MHOM/BR/2007/ES	+	-	-	Campo Grande	IV	MHOM/BR/2008/IGS	+	-	-	Campo Grande	IV
MHOM/BR/2007/AMC	+	-	-	Campo Grande	IV	MHOM/BR/2003/TKV	+	-	-	Campo Grande	IV
MHOM/BR/2007/NPN	+	-	-	Campo Grande	IV	MHOM/BR/2008/GRN	+	-	-	Campo Grande	IV
MHOM/BR/2007/LFSP	+	-	-	Campo Grande	IV	MHOM/BR/2007/TJAJ	-	+	-	Amazonas	IT

IV: leishmaniose visceral, IT: leishmaniose tegumentar, RV1/RV2: iniciadores utilizados na identificação de *Leishmania (Leishmania) chagasi*. a1/a2: iniciadores utilizados na identificação de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, b1/b2: iniciadores utilizados na identificação de *Leishmania (viannia) braziliensis*.

DISCUSSÃO

A leishmaniose visceral em Mato Grosso do Sul encontra-se em franco processo de expansão, ocorrendo em 48 de seus 78 municípios, com crescente aumento no número de casos, e a confirmação de 1.519 casos, durante o período de 2000 a setembro de 2008. Destes, 258 ocorreram no ano de 2007, mantendo-se a morbidade como importante motivo de preocupação para a saúde pública⁴⁵.

A leishmaniose tegumentar é endêmica no estado, com registro de casos desde 1975, atingindo o homem quando este entra em contato com o foco natural da parasitose, demonstrando, até o momento, um padrão de transmissão de caráter ocupacional^{13 30}.

Embora a presença de *Leishmania (Leishmania) chagasi*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* já tenha sido constatada na população humana^{13 31 33}, canina^{9 43} e em flebotomíneos^{32 43 46} do estado ainda são escassos os estudos sobre a identificação específica dos agentes de leishmanioses em suas áreas de ocorrência.

No presente estudo, 37 isolados regionais eram de pacientes portadores de leishmaniose visceral e foram positivos para os iniciadores RV1/RV2 na reação em cadeia da polimerase, o que permitiu, mais uma vez, a identificação de *Leishmania (Leishmania) chagasi* como agente etiológico da parasitose, corroborando ainda, as citações da literatura quanto à utilização desses iniciadores na caracterização específica de *Leishmania*^{15 20}.

Estes mesmos iniciadores também foram úteis para a detecção dessa espécie de parasito em flebotomíneos capturados na área urbana de Campo Grande⁴⁶, município considerado de transmissão intensa, responsável por 55% dos casos confirmados no ano de 2007⁴⁵, e detentor do maior (29) número de amostras no presente trabalho.

Leishmania (Leishmania) amazonensis foi identificada em um paciente com a forma cutânea de leishmaniose tegumentar, com local de infecção em um município do interior do estado. Essa espécie já foi encontrada em outros casos humanos da parasitose¹³, além de já ter sido observada em felino⁵⁰, cães⁴³, e flebotomíneos^{43 46}, demonstrando que sua circulação e distribuição geográfica, podem ser mais amplas do que se supõe, considerando que os casos são procedentes de diferentes regiões do Estado.

O outro caso trata-se de paciente procedente do Estado do Amazonas, com a forma cutânea da parasitose, que teve como local de diagnóstico Campo Grande. Essa espécie de parasito é frequentemente relatada na região da Amazônia legal, juntamente com *Leishmania (Viannia) guyanensis*^{21 41}.

Assim, com os três pares de iniciadores, foi possível a identificação de duas espécies de *Leishmania*, tendo em vista a detecção de *Leishmania (Leishmania) chagasi* por meio de RV1/RV2, o encontro de dois isolados positivos para *Leishmania (Leishmania) amazonensis* quando da utilização de a1/a2, e a ausência de *Leishmania (Viannia) braziliensis* com b1/b2.

A ausência dessa espécie de parasito pode ter ocorrido pelo reduzido número de amostras analisadas, uma vez que, na maioria das vezes, o diagnóstico da leishmaniose tegumentar é realizado no município de origem do paciente, onde a infraestrutura laboratorial não possibilita o isolamento do parasito para posterior identificação específica do agente etiológico.

No caso da leishmaniose visceral, embora o número de amostras analisadas (37), possa parecer reduzido, vem contribuir no processo de diagnóstico da parasitose, tendo em vista que com sua recente introdução no estado, e as dificuldades ainda existentes no diagnóstico clínico e laboratorial, o Laboratório de Parasitologia, além de ser referência para a confirmação dos casos, vem realizando o isolamento e a criopreservação das amostras, possibilitando a ampliação dos estudos clínicos e epidemiológicos sobre essa parasitose no estado.

É importante ressaltar que outras técnicas, além da PCR, podem ser utilizadas para a identificação de espécies de *Leishmania*, tais como, eletroforese de enzimas¹⁶, considerada padrão ouro¹¹, anticorpos monoclonais^{25 40}, métodos moleculares como PCR multiplex^{19 38 39}, PCR-RFLP (PCR-polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição)^{6 22} e RAPD (polimorfismo de DNA amplificado ao acaso)^{3 34}.

Enquanto o método de eletroforese de enzimas requer o cultivo e isolamento do parasito, a técnica de anticorpos monoclonais é limitada pela possibilidade de reações cruzadas. Já os testes moleculares baseados na PCR e variantes, exigem laboratórios equipados, reagentes de alto custo como enzimas de restrição no caso de PCR-RFLP, e a RAPD apresenta pouca reprodutibilidade. Por outro lado, a PCR padrão apresenta elevada sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade^{2 52}.

A escolha, neste trabalho, de três alvos de amplificação em separado, ao contrário da PCR multiplex, foi conseqüência da experiência anterior com os iniciadores RV1/RV2 por meio da PCR padrão, cuja utilização possibilitou a identificação de *Leishmania (Leishmania) chagasi*, em flebotomíneos na região⁴⁶. A padronização de um teste multiplex com os três pares de iniciadores testados poderá ser realizada em estudos posteriores.

Desta forma, a maior contribuição do trabalho é a descrição de *Leishmania (Leishmania) chagasi*, como o agente detectado nos casos de leishmaniose visceral, em Mato Grosso do Sul, além de possibilitar a implantação da PCR para no futuro permitir a identificação molecular das espécies que ocorrem em diferentes hospedeiros de *Leishmania* no estado, abrindo ainda a perspectiva de utilização desta técnica no diagnóstico individual das leishmanioses, possibilitando adequada conduta clínica e terapêutica dos pacientes.

AGRADECIMENTOS

À Fundect/MS pelo apoio financeiro e concessão de bolsa de pesquisa, à Embrapa Gado de Corte pelo apoio laboratorial, e ao Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz (Belo Horizonte, Brasil), pela doação das cepas referência.

REFERÊNCIAS

- Bañuls AL, Brisse S, Sidibe I, Noël S, Tibayrenc M. A phylogenetic analysis by multilocus enzyme electrophoresis and multiprimer random amplified polymorphic DNA fingerprinting of the *Leishmania* genome project Friedlin reference strain. *Folia Parasitologica* 46:10-14, 1999.
- Bañuls A, Hide M, Prugnolle F. *Leishmania* and the Leishmaniases: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. *Advances in Parasitology* 64:1-109, 2007.
- Baptista C, Schubach AO, Madeira MF, Leal CA, Pires MQ, Oliveira FS, Conceição-Silva F, Rosalino CM, Salgueiro MM, Pacheco RS. *Leishmania (Viannia) braziliensis* genotypes identified in lesions of patients with atypical or typical manifestations of tegumentary leishmaniasis: evaluation by two molecular markers. *Experimental Parasitology* 121:317-322, 2009.
- Barker DC. Molecular approaches to DNA diagnosis. *Parasitology* 99:125-146, 1989.
- Barral A, Pedral Sampaio D, Grimaldi Jr G, Momen H, McMahon-Pratt D, Jesus AR, Almeida R, Badaró R, Barral Neto M, Carvalho EM, Johnson WD. Leishmaniasis in Bahia, Brazil; evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 44:536-546, 1991.
- Botilde Y, Laurent T, Tintaya WQ, Chicharro C, Cañavate C, Cruz I, Kuhls K, Schönián G, Dujardin JC. Comparison of molecular markers for strain typing of *Leishmania infantum* infection. *Genetics and Evolution* 6:440-446, 2006.
- Bracho CO, Quintana LP, Arenas SM, Parra MR. Polymerase chain reaction with two molecular targets in mucosal leishmaniasis diagnosis: a validation study. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 102:549-554, 2007.
- Brewster S, Barker DC. Analysis of minicircle classes in *Leishmania (Viannia)* species. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 96:55-63, 2002.
- Cortada VM, Dorval ME, Souza Lima MA, Oshiro ET, Meneses CR, Abreu-Silva AL, Cupolillo E, Souza CS, Cardoso FO, Zaverucha do Valle T, Brazil RP, Calabrese KS, Gonçalves da Costa SC. Canine visceral leishmaniasis in Anastácio, Mato Grosso do Sul State Brazil. *Veterinary Research* 28:365-474, 2004.
- Cortes S, Rolão N, Ramada J, Campino L. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* specific kinetoplastid primers. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 98:12-17, 2004.
- Cupolillo E, Grimaldi Jr G, Momen H. A general classification of the New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 50:296-311, 1994.
- Degrave W, Fernandes O, Campbell D, Bozza M, Lopes U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* a mini-review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 89:463-469, 1994.
- Dorval MEC, Oshiro ET, Cupolillo E, Castro ACC, Alves T. Ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Estado Mato Grosso do Sul associada à infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39:43-46, 2006.
- Fernandes O, Catanho MP, Segura I, Labrada LA, Derre R, Saraiva N, Degrave W. Minicircle variable region probes for characterization of *Leishmania (Viannia)* species. *The Journal of Parasitology* 85:563-568, 1999.
- Ferroglio A, Romano A, Triscioglio AM, Poggib E, Ghiggic P, Sacchia A, Biglino D. Characterization of *Leishmania infantum* strains in blood samples from infected dogs and humans by PCR-RFLP. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 100:636-641, 2006.
- Figueira LP, Pinheiro FG, Nogueira RW, Nery LCR, Mota KC, Franco AMR. Dinâmica da Leishmaniose Tegumentar no assentamento Iporá-AM, BR: II – Caracterização isoenzimática de isolados humanos humanos de *Leishmania* spp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 41:194, 2008.
- Franco AM, Machado GM, Moreira CF, Grimaldi Jr G. Minicircle kDNA microheterogeneity in *Endotrypanum* indicate diversity within this genus. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 95:189-191, 2000.
- Gomes AHS, Ferreira, IMR, Lima, MLSR, Cunha, EA, Garcia AS, Araújo MFL, Pereira-Chioccola VL. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis. *Veterinary Parasitology* 144:234-241, 2007.
- Harris E, Kropp G, Belli A, Rodriguez B, Agabian N. Single-Step Multiplex PCR Assay for Characterization of New World *Leishmania* Complexes. *Journal of Clinical Microbiology* 36:1989-1995, 1998.
- Lachaud L, Marchegui-hammami S, Chabbert E, Dereure J, Dedet JP, Bastien P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral Leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology* 40:210-215, 2002.
- Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT, Souza AAA, Braga RR, Ishikawa EAY. The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the ecoepidemiology of the disease in Amazônia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 89:435-443, 1994.
- Luz ZM, Silva AR, Silva FO, Caligiorme RB, Oliveira E, Rabello A. Lesion aspirate culture for the diagnosis and isolation of *Leishmania* spp. from patients with cutaneous leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104:62-66, 2009.
- Marco JD, Uezato H, Mimori T, Barroso PA, Korenaga M, Nonaka S, Basombrío MA, Taranto NJ, Hashiguchi Y. Are cytochrome *b* gene sequencing and polymorphism-specific polymerase chain reaction as reliable as multilocus enzyme electrophoresis for identifying *Leishmania* spp. from Argentina? *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene* 75:256-260, 2006.
- Michalsky EM, Fortes-Dias CI, Pimenta PFP, Secundino NFG, Dias E. Assessment of PCR in the detection of *Leishmania* spp in experimentally infected individual phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 5:255-259, 2002.
- Mimori T, Grimaldi Jr G, Kreutz RD, Gomez EA, McMahon-Pratt D, Tesh RB, Hashiguchi Y. Identification, using isoenzyme electrophoresis and monoclonal antibodies, of *Leishmania* isolated from humans and wild animals of Ecuador. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 40:154-158, 1989.
- Mimori T, Sasaki J, Nakata M, Gomez EA, Uezato H, Nonaka S, Hashiguchi Y, Furuya M, Saya H. Rapid identification of *Leishmania* species from formalin-fixed biopsy samples by polymorphism-specific polymerase chain reaction. *Gene* 210:179-186, 1998.
- Ministério da Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Brasília, 2006.
- Ministério da Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose tegumentar. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Brasília, 2007.
- Motazedian M, Fakhar M, Motazedian MH, Hatam G, Mikaeili F. A urine-based polymerase chain reaction method for the diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompetent patients. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 60:151-154, 2008.
- Nunes VLB. Condicionantes para a transmissão de leishmanioses em assentamento agrícola do INCRA e adjacências, Planalto da Bodoquena, Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil, 1998, 1999. Doutorado [Tese de Doutorado em Saúde Pública]. Faculdade de Saúde Pública. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2001.
- Nunes VLB, Dorval MEC, Oshiro ET, Noguchi RC, Arão LB, Hans Filho G, Espíndola MA, Cristaldo G, Rocha HC, Serafine LN, Santos D. Estudo epidemiológico sobre Leishmaniose Tegumentar (LT) no município de Corguinho, Mato Grosso do Sul - estudos na população humana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 28:185-193, 1995.
- Nunes VLB, Galati EAB, Cardozo C, Rocca MEG, Andrade ARO, Santos MFC, Aquino RB, Rosa D. Estudo de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em área urbana do município de Bonito, Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia* 52:446-451, 2008.
- Oliveira ALL, Paniago, AMM, Dorval MEC, Oshiro ET, Leal CR, Sanches M, Cunha RV, Bóia, MN. Foco emergente de leishmaniose visceral em Mato Grosso do Sul. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39:446-450, 2006.
- Oliveira JP, Fernandes F, Cruz AK, Trombela V, Monteiro E, Camargo AA, Barral A, Oliveira CI. Genetic diversity of *Leishmania amazonensis* strains isolated in northeastern Brazil as revealed by DNA sequencing, PCR-based analyses and molecular karyotyping. *Kinetoplastid Biology and Disease* 6: 5-8, 2007.
- Paiva BR, Passos LN, Falqueto A, Malafrente RS, Andrade HF. Single step polymerase chain reaction (PCR) for the diagnosis of the *Leishmania (Viannia)* subgenus. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 46:335-338, 2004.
- Paiva BR, Secundino NF, Pimenta PF, Galati EAB, Malafrente RS. Standardization of conditions for PCR detection of *Leishmania* spp. DNA in sandflies (Diptera, Psychodidae). *Cadernos de Saúde Pública* 23:87-94, 2007.

37. Pereira EF, Thomaz-Soccol V, Lima HC, Thomaz-Soccol A, Castro EA, Mulinari-Brenner F, Queiroz-Telles F, Luz E. Molecular diagnosis of leishmaniasis in the Parana state of southern Brazil. *Experimental Dermatology* 17:1024-1030, 2008.
38. Pita-Pereira D, Alves CR, Souza MB, Brazil RP, Bertho AL, Figueiredo Barbosa AF, Brito CC. 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 hybridisation assay *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 99:905-913, 2005.
39. Pita-Pereira D, Cardoso MA, Alves CR, Brazil RP, Brito 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* 107:66-69, 2008.
40. Rodríguez-Barraquer I, Góngora R, Prager M, Pacheco R, Montero LM, Navas A, Ferro C, Miranda MC, Saravia NG. Etiologic Agent of an Epidemic of Cutaneous Leishmaniasis in Tolima, Colombia. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene* 78:276-282, 2008.
41. Romero GAS, Guerra MVE, Paes MG, Macêdo VO. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: clinical findings and diagnostic approach. *Clinical Infectious Diseases* 32:1304-1312, 2001.
42. Sambrook J, Fritsch WF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual* New York, Cold Spring Harbour Laboratory, 1989.
43. Savani ESMM, Nunes VLB, Galati EAB, Castilho TM, Zampieri RA, Floeter-Winter LM. 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* 160: 18-24, 2009.
44. Schallig HDFH, Oskam L. Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. *Tropical Medicine & International Health* 7:641-651, 2002.
45. Secretaria de Estado de Saúde, Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN) Campo Grande, MS, 2009.
46. Silva EA, Andreotti R, Dias ES, Barros JCM, Brazuna JC. Detection of *Leishmania* DNA in phlebotomines captured in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Experimental Parasitology* 119:343-348, 2008.
47. Silva ES, Gontijo CMF, Pacheco RS, Brazil RP. Diagnosis of human visceral leishmaniasis by PCR using blood samples spotted on filter paper. *Genetics and Molecular Research* 2:251-257, 2004.
48. Silva ES, Pacheco RS, Gontijo CMF, Carvalho IR, Brazil RP. Visceral Leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a patient infected with human immunodeficiency virus. *Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo* 44:145-149, 2002.
49. Singh S, Sivakumar, R. Recent Advances in the Diagnosis of leishmaniasis. *Journal of Postgraduate Medicine* 49:55-60, 2003.
50. Souza AI, Barros EM, Ishikawa E, Ilha IM, Marin GR, Nunes VL. Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Veterinary Parasitology* 128:41-45, 2005.
51. Volpini AC, Passos VMA, Oliveira GC, Romanha AJ. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. *Acta Tropica* 90:31-37, 2004.
52. Wilson SM. DNA-based methods in the detection of *Leishmania* parasites: field applications and practicalities. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 89: 95-100, 1995.