

Diagnóstico molecular das leishmanioses: contribuição ao Programa de Vigilância e Controle da LVA no Estado de São Paulo

Molecular diagnosis of leishmaniasis: contribution to the American Visceral Leishmaniasis Surveillance Program in Sao Paulo State

Vera Lucia Pereira-Chioccola

Laboratório de Biologia Molecular de Fungos e Parasitas. Diretoria de Parasitologia. Instituto Adolfo Lutz. Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo, SP, Brasil

RESUMO

Este estudo avaliou a habilidade da reação da polimerase em cadeia (PCR) em diagnosticar a leishmaniose visceral americana (LVA) e distinguir *L. (L.) chagasi* de outras espécies. Amostras de 114 cães foram divididas em dois grupos: 44 sintomáticos e 70 assintomáticos, analisadas pelos métodos parasitológicos (cultura e exame direto) e PCR para *L. (L.) chagasi*, *L. (V.) braziliensis* e, em alguns casos, *Leishmania spp.* Os testes parasitológicos e PCR-*L. chagasi* foram concordantes em 105 amostras (92%). A infecção foi diagnosticada em 49 cães. Das 114 amostras, 9 tiveram resultados discordantes e foram reanalisadas por PCR-*Leishmania spp.* com resultados positivos. A LVA também foi confirmada em quatro cães com testes parasitológicos negativos e PCR-*L. chagasi* positivos. Consequentemente, PCR foi positiva em 100% (53/49) dos cães com parasitas detectados nos testes parasitológicos. PCR apresentou alta especificidade, detectando 61 cães negativos. Desses, 5 tinham cultura e PCR-*Leishmania spp.* positivas e PCR-*L. braziliensis* positivos, definindo o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana (LTA). Este estudo mostra a importância de incluir a PCR no diagnóstico das leishmanioses pelo diagnóstico diferencial, contribuindo para Programas Estadual de Vigilância e Controle da LVA.

PALAVRAS-CHAVE: leishmaniose visceral americana; diagnóstico molecular.

ABSTRACT

This study evaluated the ability of PCR to diagnose VL and distinguish *L. (L.) chagasi* from other *Leishmania* species. Samples from 114 dogs were divided into two groups: 44 symptomatic and 70 asymptomatic. They were assayed by parasitological methods (culture and microscopic examination) and PCR to *L. (L.) chagasi*, *L. (V.) braziliensis*; and in some cases, *Leishmania* spp. Parasitological tests and PCR-*L. chagasi* were concordant in 105 samples (92%). VL was confirmed in 49 dogs, while 56 had negative results. Of the 114 samples, 9 had discordant results but were further tested by PCR-*Leishmania* spp with positive results. VL was also confirmed in 4 dogs having negative parasitological tests and positive PCR-*L. chagasi*. Consequently, this PCR was positive for 100% (53/49) of dogs with parasites detected in parasitological tests. Also, PCR demonstrated high specificity detecting 61 dogs negative. *Leishmania* infection was negative in 56 dogs, and 5 with positive culture and PCR-*Leishmania* spp had CL since they were positive in PCR-*L. braziliensis*. This study shows the importance of including PCR in diagnosis of leishmaniasis by differential diagnosis contributing to the surveillance and control of VL programs.

KEY WORDS: american visceral leishmaniasis; molecular diagnosis.

INTRODUÇÃO

O gênero *Leishmania* causa um amplo espectro de doenças, desde lesões cutâneas simples a severas como formas viscerais.^{1,2} As leishmanioses são amplamente distribuídas em mais de 80 países, atingindo principalmente as regiões tropicais e subtropicais, como Índia, Sudão, Bangladesh, Nepal e Brasil. Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) indicam que 12 milhões de pessoas vivem nessas áreas de risco e cerca de 500.000 são infectadas por ano.³

As espécies causadoras das leishmanioses na América Latina são divididas em dois grupos taxonômicos. Um é o subgênero *Viannia*, que compreende principalmente as espécies *L. braziliensis*, *L. panamensis* e *L. guyanensis*, responsáveis pelas lesões cutâneas ou mucocutâneas. O outro é o subgênero *Leishmania*, que compreende as espécies *L. mexicana* e *L. amazonensis*, responsáveis por lesões cutâneas localiza-

das ou difusas, e *L. chagasi*, causadora da leishmaniose visceral americana (LVA).^{4,2}

A LVA é endêmica em quatro das cinco regiões brasileiras, sendo que a região Nordeste apresenta o maior número de casos registrados por ano.^{5,6} Nos últimos anos, a dispersão da infecção tem sido rápida; novos casos são registrados em áreas consideradas livres da doença e com destaque para regiões urbanas. Já foram registrados casos autóctones em grandes centros urbanos como São Luís, Teresina, Fortaleza, Natal, Belo Horizonte, Palmas, Campo Grande, Araçatuba (SP) e Corumbá (MS).^{6,7}

No Estado de São Paulo, desde os primeiros casos humanos autóctones notificados em 1999, na cidade de Araçatuba, verifica-se que a doença está em franca expansão. Até 2007, o parasita já havia sido detectado em 55 municípios paulistas e os índices de mortalidade estão em torno de 10% (1999-2005).^{8,9,7}

Os programas de vigilância e controle da LVA (PVCLVA) baseiam-se em ações que atuam: (i) no inseto vetor, (ii) no reservatório doméstico (o cão) e (iii) no diagnóstico e tratamento de casos humanos.⁸ Nesse contexto, o diagnóstico laboratorial constitui uma ferramenta importante para que seja realizada a identificação do parasito em cães sintomáticos ou assintomaticamente infectados, para a sua subsequente eliminação.

Para o diagnóstico, são utilizados exames parasitológicos (microscópico direto após a coloração por Giemsa e cultura *in vitro*), sorológico (ELISA e imunofluorescência) e técnicas histopatológicas.^{1,6,8} No entanto, o diagnóstico laboratorial apresenta sérias dificuldades no que tange à sensibilidade e especificidade.⁸ Dentre elas, destaca-se a detecção de cães infectados sem sinais clínicos ou com sinais clínicos que possam ser confundidos com outras doenças caninas. Normalmente, a análise sorológica de cães assintomáticos revela a dificuldade em detectar resposta imune específica.¹⁰⁻¹²

Outro fator que corrobora para interferir na especificidade dos métodos laboratoriais tradicionalmente empregados é a diversidade endêmica encontrada nas regiões brasileiras. Algumas regiões podem ser endêmicas também para *L. braziliensis*, o agente causador da leishmaniose tegumentar americana (LTA) ou para *Trypanosoma cruzi*, o agente etiológico da doença de Chagas.

Nesse caso, o diagnóstico laboratorial deve contemplar também a determinação da espécie de *Leishmania*.¹³ Para essa proposta já foram empregadas diferentes metodologias. Dentre elas destacam-se os perfis sorológicos (sorodema), o emprego de anticorpos monoclonais; a análise de zimodema e/ou esquizodema, a hibridização, o sequenciamento, a reação em cadeia da polimerase (PCR) e a

PCR-RFLP (*restriction fragment length polymorphism analysis*).¹⁴⁻¹⁸ Apesar da significativa contribuição desses métodos em conhecer e identificar espécies de *Leishmania*, alguns deles são caros ou exigem metodologia sofisticada e demorada.

Para compor o elenco de metodologias que pudessem ser utilizadas no PVCLVA do Estado de São Paulo, elegemos a PCR por ser relativamente simples e rápida e, quando bem padronizada, apresenta alta sensibilidade e especificidade. Assim, nos propusemos a realizar um estudo prospectivo para avaliar a metodologia. A proposta foi a de determinar espécies de *Leishmania* em amostras biológicas caninas, analisar a eficácia da metodologia em diagnosticar a LVA e, ao mesmo tempo, distinguir *L. chagasi* de outras espécies de *Leishmania*.

METODOLOGIA

A escolha da região alvo do DNA para o desenho de iniciadores utilizados na PCR é de crucial importância, pois é um dos principais fatores para se estabelecer a alta sensibilidade e especificidade da reação. Neste estudo, três condições foram cuidadosamente avaliadas durante a escolha da região alvo: (i) elevado número de cópias; (ii) sequências conservadas nas diferentes espécies de *Leishmania*; e (iii) sequências variáveis nas quais pudessem diferir, no mínimo, complexos.

Quando o objeto de estudo envolve protozoários da ordem Kinetoplastida, como os gêneros *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Crithidia* e outros membros, além do DNA nuclear, conta-se com mais uma organela ricamente composta de DNA. O kinetoplasto, situado na base do flagelo, é composto de uma rede de moléculas DNA circulares (kDNA), as quais podem ser divididas em dois grupos (Figuras 1A e 1B).

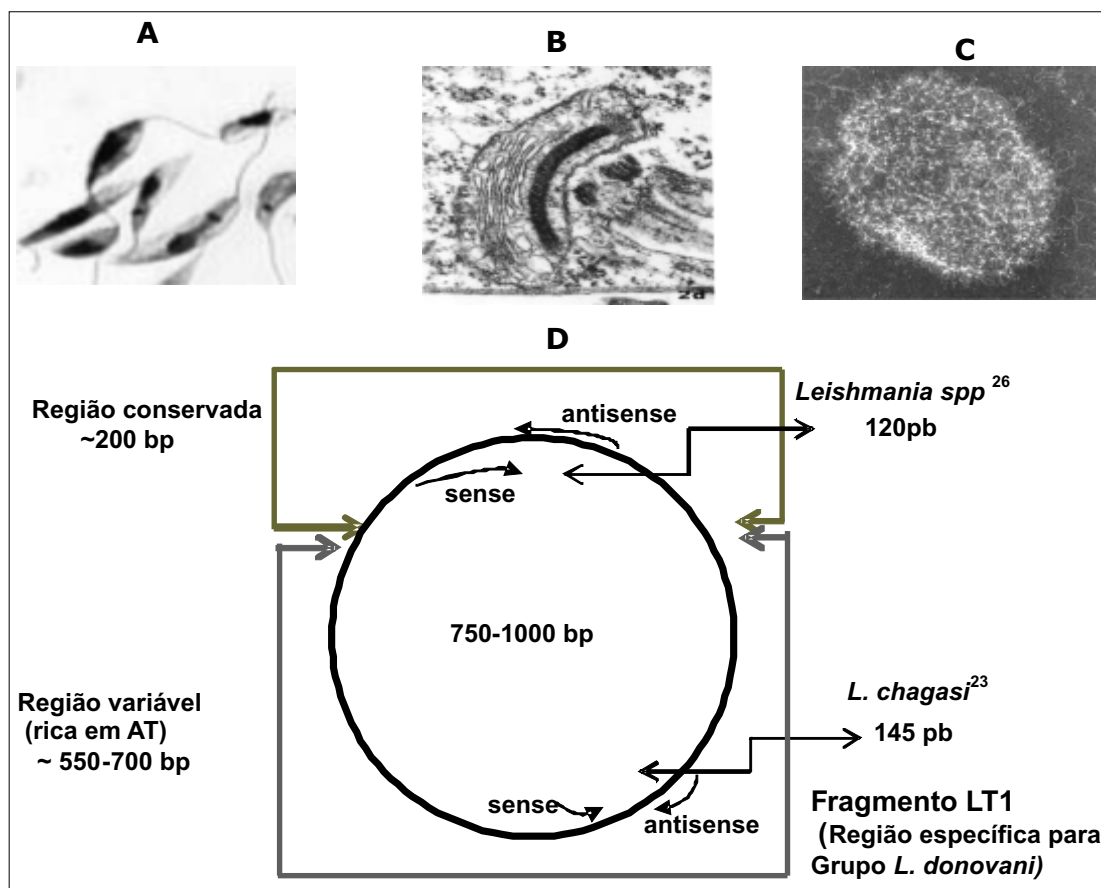
O primeiro grupo é composto de moléculas grandes, com cerca de 20-35kb, denominadas de maxicírculos. São extremamente homogêneas entre os diferentes grupos que compõe a ordem Kinetoplastida, e estão presentes em cerca de 20-50 cópias/kinetoplasto.

O outro grupo é composto de moléculas menores (de 0,5-1,5kb), denominadas de minicírculos. Apresentam-se em grande quantidade (10.000 unidades/kinetoplasto) e com sequências heterogêneas entre os grupos. Dessa maneira, são amplamente utilizados para separar classes, gêneros ou espécies¹⁹⁻²¹ (Figura 1C e 1D).

Cada minicírculo de *Leishmania* é composto de uma molécula de DNA circular de 0,75 a 1kb de comprimento. Apresenta uma região con-

servada de aproximadamente 200pb contendo três blocos de sequências conservadas em todas as espécies de *Leishmania*.²² O restante da molécula, aproximadamente 550-700pb, apresenta sequências altamente variáveis, contendo um grande número de nucleotídeos A e T. Portanto, nessa região, pode-se encontrar sequências específicas para os diferentes grupos de *Leishmania*^{20,21} (Figura 1D).

Para determinar *L. chagasi* escolhemos um par de iniciadores, previamente²³ descrito, que amplifica uma sequência de 145pb da região variável dos minicírculos do complexo *L. donovani*. A escolha foi baseada na taxonomia do complexo *L. donovani*, a qual engloba as espécies *L. donovani*, *L. infantum*, *L. chagasi* e *L. archibaldi*.²⁴ Estudos anteriores mostraram



Fonte: www.ebi.ac.uk/parasites/kDNA/Source.html

Figura 1. A seta sinaliza o kinetoplasto em promastigotas (A e B). A estrutura e a rede de maxicírculos e minicírculos de DNA são vistas em maiores detalhes por microscopia eletrônica em B e C. Diagrama esquemático da organização de cada minicírculo de *Leishmania* e a localização dos iniciadores para gênero²⁶ e *L. donovani* (D).²³

que a aplicabilidade desses iniciadores na PCR promoveu uma boa sensibilidade e especificidade em diagnosticar a presença de *L. infantum* em amostras biológicas de cães com suspeita de LVA, na região do Mediterrâneo.²⁵

Nas amostras discordantes, a presença de *Leishmania spp* foi determinada por um par de iniciadores previamente descrito²⁶ e amplamente utilizado. Esses iniciadores amplificam um fragmento de 120pb e derivam da região conservada dos minicírculos de *Leishmania* (Figura 1D).

Outra região gênica vastamente utilizada como alvo para genotipar espécies de *Leishmania* é o gene RNA mini-exon (ou *spliced leader* - SL), localizado no núcleo de todos os grupos da ordem Kinetoplastida¹⁶ (Figura 2). Cada genoma apresenta cerca 100 a 200 cópias e cada uma delas, denominada SL, é composta de uma região de transcrição conservada (exon) contendo uma sequência de 39pb, e outra região (intron), também conservada, mas de tamanho variável (55 a 101pb, dependendo da espécie). Entre cada SL existem regiões variáveis que não são transcritas e diferem na sequência de nucleotídeos e no tamanho (140 a 350pb), dependendo do complexo de *Leishmania*.^{27,16}

Para caracterizar as amostras infectadas por *L. braziliensis* escolhemos um par de iniciadores, previamente²⁷ descrito, que amplifica uma sequência de 146 a 149pb. A sequência

alvo de um dos iniciadores é da região conservada SL, comum em todas as espécies de *Leishmania*. O outro iniciador provém da região não transcrita, variável e específica para o complexo *L. braziliensis* (Figura 2).

A especificidade dos iniciadores utilizados na PCR para detectar *L. chagasi* (PCR-*L. chagasi*) e *L. braziliensis* (PCR-*L. braziliensis*) foi testada realizando-se a PCR com DNA extraído de: (i) outras espécies de *Leishmania* - escolhemos as cepas referências das espécies de *Leishmania* mais prevalentes no Brasil, *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/1972/LD), *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/67/PH8) e *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/2903); (ii) de *Trypanosoma cruzi* (cepa Y), o agente causador da doença de Chagas - a escolha baseou-se na proximidade filogenética de *Leishmania* e grande ocorrência da infecção nas mesmas regiões em que a LVA é prevalente; e (iii) bactérias causadoras de doenças caninas - escolhemos *Rickettsia rickettsia*, *Rickettsia canis* e *Ehrlichia canis**.

Todas as amostras foram utilizadas na PCR na concentração de 85-90ng. A alta especificidade de ambas as reações pode ser vistas na Figura 3. Somente o DNA de *L. chagasi* apresentou o produto de 145pb amplificado na PCR-*L. chagasi* (Figura 3A) e somente o DNA de *L. braziliensis* apresentou o produto de 145-149pb amplificado na PCR-*L. braziliensis* (Figura 3B).

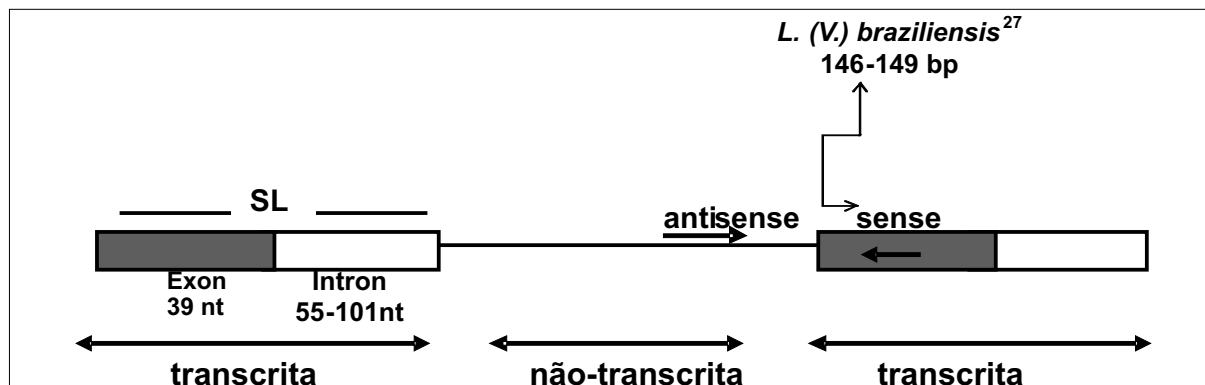


Figura 2. Diagrama esquemático gene RNA mini-exon (ou *spliced leader* -SL) de *Leishmania* e localização dos iniciadores que identificam *L.(V.) braziliensis*.²⁷

A especificidade da PCR-*L. chagasi* foi também confirmada pelo sequenciamento de produto amplificado de cinco amostras de DNA provenientes de cães de Mogi das Cruzes (3) – na Grande São Paulo –, Adamantina (1) e Araçatuba (1). Os fragmentos de 145pb foram previamente purificados com um kit Wizard SV gel and PCR Clean-up System kit – PROMEGA. Os sequenciamentos foram realizados usando-se o kit ABI Prism BigDye-Terminator Cycle Sequencing Reaction, utilizando-se ambos iniciadores, de modo a obter-se ambos lados (sense e anti sense). A eletroforese foi realizada num ABI Prism 377 DNA Sequencer (pela Genomic Engenharia Molecular LTDA, São Paulo, BR). As sequências de nucleotídeos geradas foram analisadas e alinhadas com outras previamente descritas no programa BioEdit Sequence Alignment Editor e no site NCBI/ nucleotide-nucleotide BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

A sensibilidade da PCR *L. chagasi* foi determinada testando-se DNA extraídos de amostras biológicas de 114 cães provenientes de 30

municípios do Estado de São Paulo. Essas regiões são endêmicas ou em pesquisa de focos iniciais para LVA; algumas também são endêmicas para LTA.

Para efeito de análise dos dados, os cães foram divididos em dois grupos considerando-se a sintomatologia.

O Grupo I, sintomáticos, composto de 44 cães que foram sacrificados por apresentarem sérios sintomas clínicos de LVA. Apresentaram pelo menos quatro sinais clínicos, que incluíam dermatite esfoliativa, úlceras e/ou nódulos cutâneos, linfadenopatia, esplenomegalia, hepatomegalia, anorexia, febre, crescimento anormal das unhas e cansaço muscular, dentre outros. Fragmentos de necropsias de fígado, baço, linfonodo foram encaminhados à Seção de Parasitoses Sistêmicas do Instituto Adolfo Lutz (IAL) – órgão da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (CCD/SES-SP) – para confirmar o diagnóstico clínico.

O Grupo II, assintomáticos, constituído de 70 cães assintomáticos ou com leves sinais clínicos. Amostras de aspirado de linfonodo e/ou biopsia

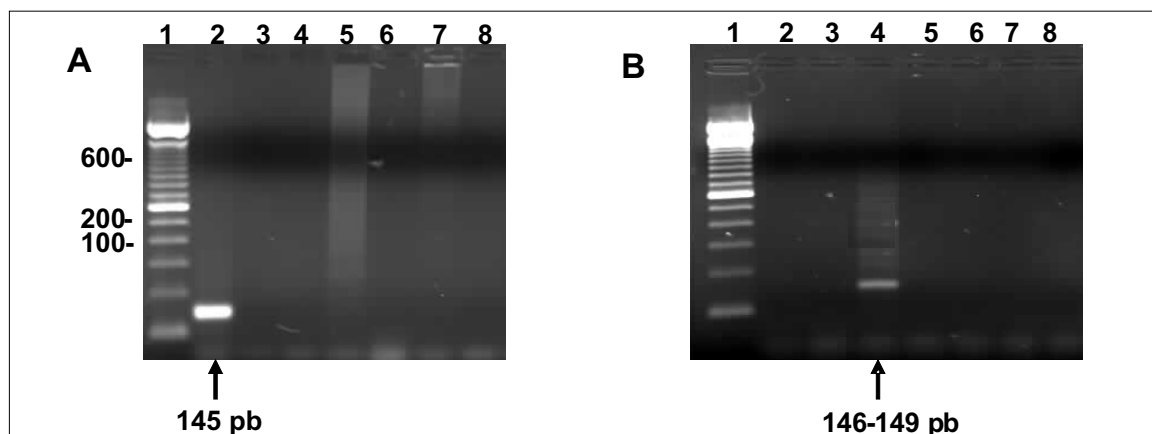


Figura 3. Espécie-especificidade das PCR para *L. (L.) chagasi* (A) e *L. (V.) braziliensis* (B). *L. (L.) chagasi* foi identificada com dois iniciadores (sense e anti sense) que amplificam um produto de 145pb de uma região específica (fragmento LT1) dos minicírculos de kDNA de *L. donovani*. *L. (V.) braziliensis* foi identificada com dois iniciadores que amplificam um produto de 145-149 bp do gene SL-RNA. Um iniciador provém da região conservada e o outro, da região variável do gene e específica para o grupo *Viannia*. As amostras de DNA indicadas na figura foram utilizadas na PCR na concentração de 85-90 ng. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em géis de 2% agarose. Linha 1, marcador de massa molecular (100pb); linha 2, *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/1972/LD); linha 3, *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/67/PH8); linha 4, *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/2903); linha 5, *Trypanosoma cruzi* (cepaY); linha 6, *Rickettsia rickettsia* (FMVUSP); linha 7, *Rickettsia canis* (FMVUSP); linha 8, *Ehrlichia canis* (FMVUSP).

*As amostras de DNA foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Solange Maria Gennari, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP).

cutânea foram encaminhadas ao IAL para realização do diagnóstico laboratorial.

RESULTADOS

Avaliação da especificidade

Todas as cinco amostras apresentaram 98-100% de identidade com DNA de minicírculos do kinetoplasto de: (1) *Leishmania donovani* (GenBank accession number AJ010077); (2) *Leishmania infantum* (GenBank accession number AF184044); (3) *Leishmania chagasi* (GenBank accession number AF169132); e (4) nenhuma identidade foi observada com outros grupos de protozoários, bactérias, fungos, vírus ou mamíferos.

Avaliação da sensibilidade

Todas as 114 amostras foram analisadas pelos métodos parasitológicos (microscopia direta após a coloração por Giemsa e cultura *in vitro*), que foram considerados padrão ouro. Um resultado foi considerado positivo quando parasitas foram detectados em pelo menos um dos testes.²⁸

Os resultados obtidos estão resumidos na Tabela 1. No grupo dos 44 cães sintomáticos, 29 apresentaram resultados positivos em ambas as metodologias e 2 tiveram resulta-

dos discordantes (parasitas foram detectados nos métodos parasitológicos, mas a PCR foi negativa).

No grupo dos 70 cães assintomáticos, 20 tiveram resultados positivos em ambas as metodologias, mas 7 apresentaram resultados discordantes (4 com testes parasitológicos negativos e PCR-*L. chagasi* positiva e 3, PCR negativa e cultura positiva). A porcentagem de concordância para ambas as metodologias foi de 92% para todas as amostras, sendo que no primeiro grupo foi de 95% e no segundo, 90%.

Em seguida, os resultados discordantes descritos na Tabela 1 foram investigados. As amostras foram ensaiadas pela PCR-*Leishmania spp.*, e todas foram positivas. Esses resultados confirmaram o diagnóstico da LVA em quatro cães do Grupo II que tiveram resultados negativos nos métodos parasitológicos e PCR-*L. chagasi* positivo. Esses animais tiveram ambas metodologias positivas após sacrifício e fragmentos de órgãos analisados. Outros 5 cães (2 do Grupo I e 3 do Grupo II) com resultados discordantes apresentaram cultura e PCR para *Leishmania spp.* positivos.

Como esses animais viviam em regiões que também são endêmicas para *L. braziliensis*, as amostras foram ensaiadas e positivas na PCR-*L. braziliensis*. A Tabela 2 mostra a caracterização genotípica das amostras estudadas.

Tabela 1. Avaliação da sensibilidade da PCR em diagnosticar LVA. Comparação dos métodos parasitológicos e da PCR-*L. chagasi* em cães sintomáticos (Grupo I) e assintomáticos (Grupo II).

Cães	Tipo de amostra	Total	Métodos Parasitológicos (Par.) e PCR- <i>L. chagasi</i>					
			Resultados					
			Concordantes			Discordantes		
			Ambos			Par. negativo PCR positivo		
			Positivo	Negativo	concordância* (%)	Par. negativo PCR positivo	Par. positivo PCR negativo	
Grupo I Sintomáticos (sacrificados)	Fígado, baço, linfonodos (fragmentos/necropsia)	44	29	13	42 (95%)	0	2	
Grupo II Assintomáticos	Aspirados de linfonodos, biopsia cutânea	70	20	43	63 (90%)	4	3	
Total		114	49	56	105 (92%)	4	5	

*Porcentagem de concordância foi calculada pela relação: (número de resultados concordantes)/(número total de amostras) x 100.

Tabela 2. Genotipagem das amostras positivas nos métodos parasitológicos e diagnóstico da LVA e LTA nos cães sintomáticos (Grupo I) e assintomáticos (Grupo II).

Cães	Métodos Parasitológicos PCR- <i>Leishmania</i> spp positivos	Identificação da espécie de <i>Leishmania</i>	
		PCR	
		<i>L. chagasi</i>	<i>L. braziliensis</i>
Grupo I			
Sintomáticos (sacrificados)	31	29	2
Grupo II			
Assintomáticos	27	24	3
Total	58	53	5

BREVE DISCUSSÃO

Este estudo prospectivo mostrou que a PCR-*L. chagasi* apresentou uma alta especificidade, quando comparada aos métodos parasitológicos, tanto em cepas mantidas em laboratório quanto em amostras biológicas. Amostras de 61 cães foram negativas, ao passo que os métodos parasitológicos revelaram resultados negativos em 56 cães.

Os resultados também mostraram uma sensibilidade de 100% quando comparados aos dos métodos parasitológicos. Amostras de 53 cães foram positivas, ao passo que somente 49

deles tiveram parasitas revelados pelos métodos parasitológicos.

A PCR foi efetiva tanto para realizar o diagnóstico diferencial quanto para genotipar amostras clínicas. Portanto, este trabalho reforça a idéia, já preconizada por outros grupos e centros de referência, da inclusão da PCR no diagnóstico da LVA, visando determinar a espécie de *Leishmania*. Esses dados enfatizam, ainda, o potencial uso deste procedimento em programas de vigilância e controle da LVA, contribuindo para que as condutas sejam mais rápidas, principalmente na detecção de novos focos da infecção autóctone.

REFERÊNCIAS

1. Grimaldi G, Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for the future research. Clin Microbiol Rev. 1993; 6:230-50.
2. Lainson R, Shaw JJ. New World leishmaniasis. The neotropical *Leishmania* species. In: Collier L, Balows A, Sussman M (eds). Topley & Wilson's microbiology and microbial infectious diseases. 9 ed. Londres: Arnold; 1998. v. 5, p. 241-66.
3. World Health Organization - WHO. Division of control of tropical disease. Leishmaniasis control [acesso em junho 2007]. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm>.
4. Degraive W, Fernandes O, Campebell D, Bozza M, Lopes U. Use of molecular probes

Financiamento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp). Brasil. Proc-04/13192-6.

Artigo referente à palestra proferida no II Fórum de Discussão da Sociedade Paulista de Parasitologia: Leishmaniose visceral americana, situação atual e perspectivas futuras. Organizado por Regina M. B. Franco, da Sociedade Paulista de Parasitologia, por Vera L. F. de Camargo-Neves e Cecília Abdalla, da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, o evento foi realizado em 3 de julho de 2007, no auditório Luiz Mussolino (SES-SP).

- and PCR for detection and typing of *Leishmania* – A mini review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1994;89:463-9.
5. Evans TG, Teixeira MJ, Mcauliffe IT, Vasconcelos I, Vasconcelos AW, Sousa Ade A, Lima JW. et al. Epidemiology of visceral Leishmaniasis in Northeast Brazilian. J Inf Dis. 1992;166:1124-32.
 6. Ministério da Saúde - MS. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral, Brasília,DF,2006.http://portal.saude.gov.br/portal/saude/Gestor/area.cfm?id_area=1133
 7. Lindoso JAL, Goto H. Leishmaniose visceral: situação atual e perspectivas futuras. BEPA [periódico na internet]. 2006 fev 26:7-11. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa26_lva.htm.
 8. Secretaria de Estado da Saúde (São Paulo). Centro de Vigilância Epidemiológica. II Informe Técnico – Leishmaniose visceral americana [informe na internet]. 2006, 48 pp. Disponível em: ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/zoo/lva06_manual.pdf.
 9. Camargo-Neves VLF, Grupo de Estudos em Leishmanioses. Classificação epidemiológica dos municípios para a leishmaniose visceral Americana. Bepa [boletim na internet]. 2007 marc 4(39):27-39. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa39_lva.htm.
 10. Ashford DA, Bozza M, Freire M, Miranda JC, Sherlock I, Eulalio C, et al. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for detection of canine visceral leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg. 1995;53:251-5.
 11. Berrahal F, Mary C, Roze M, Berenger A, Escoffier K, Lamouroux D, Dunan S. Canine Leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. Am J Trop Med Hyg. 1996;55:273-7.
 12. Paula AA, Silva AV M, Fernandes O, Jansen AM. The use of immunoblot analysis in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Rio de Janeiro. J Parasitol. 2003;89:832-6.
 13. Schallig HDFH, Oskam L. Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. Trop Med Intern Health. 2002;7:641-51.
 14. Cupolillo E, Grimald G e Momen H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. Am J Trop Med Hyg.1994;50:296-312.
 15. Grimaldi G, McMohon-Pratt D. Monoclonal antibodies for the identification of New world *Leishmania* species. Mem Inst Oswaldo Cruz R Janeiro. 1996;91:37-42.
 16. Marfurt J, Nasereddin A, Niederwieser I, Jaffe CL, Beck HP, Felger I. Identification and differentiation of *Leishmania* species in clinical samples by PCR amplification of the miniexon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis. J Clin Microbiol. 2003;41:3147-53.
 17. Rioux JA, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P, Perieres J. Taxonomy of

- Leishmania. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann Parasitol Hum Comp.* 1990;65:111-25.
18. Volpini AC, Passos VM, Oliveira GC, Romanha AJ. PCR-RFLP to identify *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing american cutaneous leishmaniasis. *Acta Tropica.* 2003;90:31-7.
19. Barker DC. Kinetoplast minicircle sequence database [acesso em junho 2007]. Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/parasites/kDNA/Source.htm>.
20. Noyes HA, Reyburn H, Baley JW, Smith D. *Leishmania* kinetoplast minicircle classes directly from clinical samples and its application to the study of the epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan. *J Clin Microbiol.* 1998;36:2877-81.
21. Fernandes O, Bozza M, Pascale JM, de Miranda AB, Lopes UG, Degraive WM. An oligonucleotide probe derived from kDNA minirepeats is specific for *Leishmania* (*Viannia*). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1996;91:279-84.
22. Fu G, Kolesnikov AA. *Leishmania gymnodactyli* and *Leishmania infantum* minicircles contain the same guide RNA genes as do minicircles of *Leishmania tarentolae*. *Mol Biochem Parasitol.* 1994;67:171-4.
23. Ravel S, Cuny G, Reynes J, Veas F. A highly sensitive and rapid procedure for direct PCR detection of *Leishmania infantum* within human peripheral blood mononuclear cells. *Acta Trop.* 1995;59:187-96.
24. Mauricio IL, Yeo M, Baghaei M M, Doto D, Pratlong F, Zemanova E, et al. Towards multilocus sequence typing of the *Leishmania donovani* complex: resolving genotypes and haplotypes for five polymorphic metabolic enzymes (ASAT, GPI, NH1, NH2, PGD). *Int J Parasitol.* 2006;36:757-69.
25. Lachaud L, Marchergui-Hammami S, Chabbert E, Dereure J, Dedet JP, Bastien P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* 2002;40:210-5.
26. Passos VM, Fernandes O, Lacerda PA, Volpini AC, Gontijo CM, Degraive WM, Romanha AJ. *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* is the predominant species infecting patients with American cutaneous leishmaniasis in the state of Minas Gerais, Southeast Brazil. *Acta Trop.* 1999;72:251-8.
27. Harris E, Kropp G, Belli A, Rodriguez B e Agabian N. Single-step multiplex PCR assay for characterization of New World *Leishmania* complexes. *J Clin Microbiol.* 1998;36: 1989-95.
28. Gomes AH, Ferreira IM, Lima ML et al. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine Leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2007;144:234-41.

Recebido em: 15/03/2009
Aprovado em: 25/08/2009

Correspondência/Correspondence to
Vera Lucia Pereira Chioccola
Av. Dr. Arnaldo, 351 - 8º andar - Pacaembu
CEP: 01246-000 - São Paulo/SP - Brasil
Tel.: 55 11 3068-2991
E-mail: pchioccola@ial.sp.gov.br