

ARTICULO

Nuevo marcador molecular para la identificación específica de *Leishmania (L) chagasi*Linhei Maizo^(1,2) y Noris Rodríguez⁽¹⁾

¹ Instituto de Biomedicina, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, San Nicolas a Providencia, San José, Caracas, Venezuela. Apdo Postal 4043, Caracas 1010 A.

² Hospital Militar "Carlos Arvelo" Caracas, Venezuela

Correspondencia: Noris Rodriguez.

Email nmrodric@gmail.com.

Financiamiento: Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela. Proyecto UCV-Sociedad No PSU-09006182-2005

Recibido: Marzo 2009 **Aprobado:** Octubre 2009

RESUMEN

Se desarrolló una herramienta molecular para la identificación de *L. chagasi* y su diferenciación de *L. infantum*; las cuales han sido consideradas dentro del zimodemo MON-1, ambas son difíciles de distinguir utilizando métodos isoenzimáticos (MLEE). Sin embargo, se ha realizado un enorme esfuerzo para desarrollar marcadores moleculares especie específicos para el diagnóstico e identificación de estos parásitos. Se utilizaron dos oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia del gen de la Ca⁺² ATPasa, en una reacción de PCR con ADN genómico de aislados de *Leishmania*; la posterior digestión de los productos de PCR con la enzima *HaeIII* reveló una banda de aproximadamente 600 pb exclusivamente en *L. chagasi*. La banda fue cortada del gel para purificar el ADN, el cual fue utilizado como sonda para hibridar un panel de ADN de diferentes especies de *Leishmania*. Los resultados del Southern blotting de ADN digerido con varias enzimas e hibridado con la sonda de 600 pb marcada con biotina mostró tres bandas de hibridación solo en *L. chagasi*. La hibridación en dot blot de productos de PCR de las mismas especies, solo resultó positiva para *L. chagasi*. Este marcador es una nueva evidencia para soportar el status de *L. chagasi* como una verdadera especie dentro del sub género *Leishmania*. No se observó hibridación con *L. infantum* ni con ninguna otra especie. Estos resultados constituyen una herramienta para estudios epidemiológicos ya que permiten diferenciar entre dos especies estrechamente relacionados.

Palabras Clave: Leishmaniasis visceral, Marcadores moleculares, PCR, Hibridación

ABSTRACT

A new molecular marker for specific identification of *L. (L.) chagasi*.

A molecular tool was developed for *L. chagasi* identification and its differentiation from *L. infantum*. Both species have been considered within the Zymodeme MON-1 and are difficult to distinguish from each other using conventional techniques such as Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE). However a tremendous effort has been done to develop species-specific molecular markers for the diagnosis and identification of such parasites. Here, we used two oligonucleotides designed from the Ca²⁺ATPase gene in a PCR reaction with genomic DNA from *L. donovani* complex isolates. Further digestion of the PCR products with *Hae III* revealed a 600 bp band in *L. chagasi*. The 600 bp band was excised from the gel, the DNA was purified and used as molecular marker to hybridize a panel of DNA from *Leishmania* isolates. Results after southern blotting of total DNA digested with different restriction enzymes hybridized to the 600 bp probe labeled with biotin showed 3 hybridizations bands only in *L. chagasi*. Dot blot hybridization of the PCR product indicated that the 600 bp DNA fragment only hybridized with *L.(L.) chagasi*. This molecular marker is new evidence supporting the status of *L. chagasi* as a different species in the *Leishmania* sub genus. No cross hybridization was observed with *L.(L.) infantum* nor with any other *Leishmania* species. These results provide a new tool for epidemiological studies since they allow differentiation between two closely related species.

Key words: visceral leishmaniasis, molecular markers, PCR, hybridization

INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis visceral es la forma más grave y potencialmente mortal de la enfermedad si no es diagnosticada y tratada a tiempo. Según las cifras de la OMS, anualmente se reportan 500.000 casos (1); estudios recientes indican que en Venezuela se presenta una incidencia de 0,2 casos x 100.000 habitantes (2). Según los registros del Instituto de Biomedicina del MPPS - UCV; entre 2005-2006 los estados Anzoátegui, Nueva Esparta y Lara reportaron 74 de los 93 casos registrados en el país. La enfermedad es producida por tres especies del sub género *Leishmania*: *Leishmania (L.) donovani*, endémica en la India y Noreste de Africa; *L.(L.) infantum*, autóctona de la cuenca del mediterráneo, cercano Oriente y Sureste de China (3) y *Leishmania (L.) chagasi*, que se extiende por el continente americano, desde el Sur de Estados Unidos hasta el Norte de Argentina (4). El diagnóstico de la enfermedad, así como la identificación de la especie involucrada son importantes desde el punto de vista epidemiológico y para el tratamiento de la enfermedad.

El desarrollo y aplicación de las técnicas moleculares han sido de gran utilidad para la identificación de los parásitos del género *Leishmania*; en este sentido el ADN del kinetoplasto ha sido el más utilizado para este propósito. Diferentes sondas, análisis de RFLP (siglas en inglés) o PLFR (Polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción) y oligonucleótidos particulares han sido diseñados para la tipificación de estos parásitos (5-10). El grado de sensibilidad y especificidad de estas herramientas puede permitir la identificación a nivel de género (11), subgénero (12) o a nivel de especie (10). En los últimos años la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha tenido un gran desarrollo evolucionando hacia su aplicación en la identificación de especies de *Leishmania* utilizando para ello oligonucleótidos especie específicos derivados del ADN nuclear o de Kinetoplasto (13); sin embargo los

genes multicopia son los mejores blancos para el diagnóstico, entre ellos podemos citar los espaciadores ínter génicos de los genes ribosomales, (14), genes de la glicoproteína Gp63 (15); proteínas de choque térmico (16); genes de mini exón (17) y genes de la β -tubulina (18) entre otros. A pesar de que los genes multicopias son los mejores blancos, también se ha explorado el uso de genes de copia única con propósitos de diagnóstico e identificación de *Leishmania*; en este sentido cabe destacar la Glucosa-6 -fosfato deshidrogenasa (19), cuya secuencia nucleotídica ha servido para derivar oligonucleotidos para la identificación especie específica y diferenciación entre *L.(V.) braziliensis* y *L.(L.) mexicana*, causantes de la leishmaniasis cutánea en América.

En este trabajo se reporta la utilización de la secuencia del gen *Lmaa1* que codifica una Calcio-ATPasa del retículo endoplásmico de *Leishmania* (20) para el diseño de una herramienta molecular que permite la exclusiva identificación de *L.(L.) chagasi* y así mismo contribuir a aclarar la controversia existente con la especie *L. chagasi/infantum*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de parásitos y extracción de ADN. En la Tabla 1 se muestran los aislados de referencia internacional utilizados en éste estudio. Para el aislamiento del ADN total se cultivaron los promastigotes de *Leishmania* en medio RPMI 1640, suplementado con 10% de suero fetal bovino. Los parásitos fueron recolectados por centrifugación a 10.000 RPM y lavados 3 veces con buffer fosfato salino (PBS). Posteriormente los parásitos fueron resuspendidos en buffer NET (100 mmol/L NaCl; 100 mmol/L EDTA; 10 mmol/L Tris base pH 8, 10% SDS) para la lisis celular, posteriormente al ADN total fue extraído siguiendo el protocolo previamente descrito (9); la calidad del ADN fue evaluada en geles de agarosa y posteriormente cuantificado para ajustar la concentración a 20 ng / μ L.

Tabla 1.- Aislados de referencia internacional

Especies	Código de referencia internacional	Procedencia
<i>L.(V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/84/LTB300	Nuevo Mundo
<i>L.(V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/75/M2903	Nuevo Mundo
<i>L.(V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/75/M4147	Nuevo Mundo
<i>L.(V.) panamensis</i>	MHOM/PA/71/LS94	Nuevo Mundo
<i>L.(L.) mexicana</i>	MHOM/BR/82/Bel 21	Nuevo Mundo
<i>L.(L.) amazonensis</i>	IFLA/BR/67/PH8C5	Nuevo Mundo
<i>L.(L.) major</i>	MHOM /SU/73/5ASKH	Viejo Mundo
<i>L.(L.) tropica</i>	MHOM/SU/64/K27	Viejo Mundo
<i>L.(L.) pifanoi</i>	MHOM/VE/57/LL1	Nuevo Mundo
<i>L.(L.) infantum</i>	MHOM/TU/80/IPT1	Viejo Mundo
<i>L.(L.) donovani</i>	MHOM/TU/80/DD8	Viejo Mundo
<i>L.(L.) chagasi</i>	MHOM/BR/74/PP75	Nuevo Mundo

Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR). Para la amplificación de la región codificante del gen *Lmaa1* que codifica una Ca^{+2} ATPasa del retículo endoplásmico en el sub-género *Leishmania*; se utilizaron un par de oligonucleotidos diseñados a partir de la secuencia conocida del gen (20); CR1= 5'-AGGGCTGAGTCGTATCTG-3' y CR2 = 5'-AATGCCATGGAGCAATTA-3'; los cuales amplifican un fragmento de aproximadamente 2.000 pb próximo al extremo 3' del marco abierto de lectura. Para la PCR se utilizaron 0,2 pmol/L de cada oligonucleotido; 200 ng de ADN total de cada aislado en una mezcla conteniendo 200 μ mol/L de dNTPs; 2,5 μ L de buffer de la enzima, 2,5 U de Taq Polimerasa (Promega), finalmente la mezcla se cubrió con 5 μ L de aceite mineral y se colocó en el termociclador (Perkin Elmer) para 35 ciclos de amplificación, previamente la mezcla fue sometida durante 5 minutos a 95°C para la total denaturación del ADN; Cada ciclo comprende 1 min a 95°C, 1 min a 52°C , 1 min a 72°C y finalmente 10 minutos a 72°C para máxima extensión. Finalmente el producto de PCR se detectó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio (0,5 μ g/mL) y se fotografió con película Polaroid 665.

Digestión con endonucleasas e hibridación molecular. Los productos de PCR fueron purificados utilizando un kit para este propósito (*DNA purification kit*, Promega) para su digestión con diferentes enzimas de restricción (*Hae III*, *Hinf I*, *EcoRI* y *Hind III*, (Promega). La digestión se realizó siguiendo las instrucciones de los fabricantes de las endonucleasas. Los productos de la digestión fueron separados en geles de agarosa al 1,5% , los fragmentos que resultaron exclusivos para una determinada cepa, fueron extraídos de la matriz

de agarosa y el ADN fue purificado utilizando *Agarosa DNA purification kit* (Gibco-BRL). El ADN de cada fragmento fue utilizado como sonda para la hibridación. Para el marcaje de la sonda se utilizó el kit *North2South* (PIERCE) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La sonda marcada fue utilizada para la hibridación de los productos de PCR obtenidos de las distintas especies de *Leishmania*; para ello el ADN se inmovilizó en membranas de Nylon mediante la técnica de dot blot o Southern blot, para su posterior hibridación.

La hibridación se llevó a cabo a 42°C en buffer de hibridación (25% formamida ; 10% Denhart 5X (1% Ficoll; 1% Polivilpirrolidona; 1% esperma de salmón). La membrana fué pre- incubada durante 18 horas en el buffer y luego se cambió el buffer por uno fresco que contiene la sonda marcada y se continúa la incubación durante toda la noche. Finalmente se realizó la detección del marcaje utilizando el kit de hibridación y detección de ácidos nucleicos *North2South* (PIERCE).

RESULTADOS

Análisis de restricción de los productos de PCR

Empleando el par de oligonucleotidos CR1 y CR2, se obtuvo la banda de amplificación correspondiente, de aproximadamente 2000 pb en todos los aislados estudiados (Fig 1A), encontrándose que en la cepa *L.(L.) infantum* (Fig 1, carril 1) muestra una banda adicional por debajo de los 2 Kb. Luego de la digestión de los productos de PCR con las distintas enzimas, se encontraron diferencias en los patrones de restricción de las cepas estudiadas con bandas entre 1000 y 100 pb, observándose una banda de 600 pb con alta intensidad en *L. (L) chagasi* (Fig 1B, carril 3).

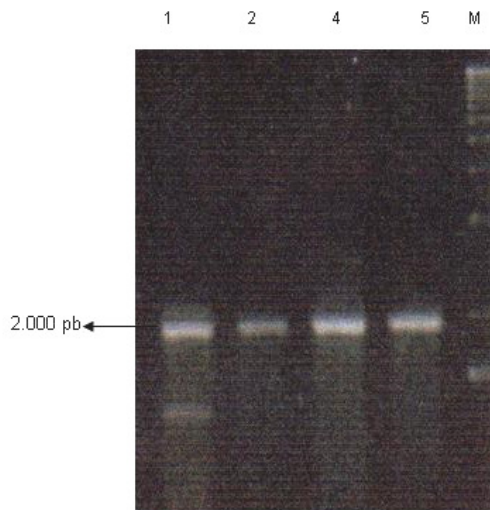


Fig 1A. Electroforesis de los productos de PCR obtenidos con los primers CR1 y CR2 . 1.- *L.infantum*; 2.- *L. donovani*, 3.- *L. chagasi*. 4.- *L. mexicana*, M.- Marcadores de ADN, (1 Kb DNA ladder, Gibco-BRL)

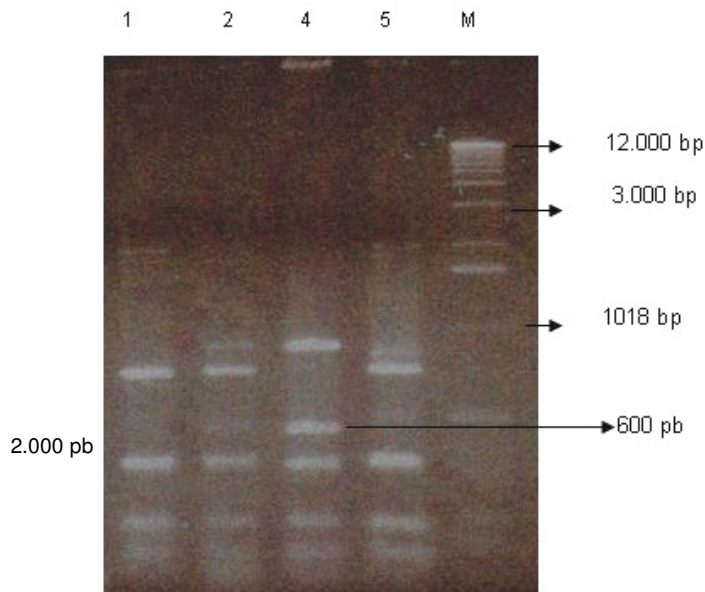


Fig 1B. Electroforesis de la digestión de los productos de PCR con la enzima HaeIII. 1.- *L. infantum*; 2.- *L. donovani*; 3.- *L. chagasi*. 4.- *L. mexicana*, M.- Marcadores de ADN (1 Kb DNA ladder Gibco-BRL)

Hibridación especie específica

El ADN total de aislados de *Leishmania* de distintas especies mostrados en la tabla I digerido con *HaeIII* (Fig 2 A) fue hibridado con el fragmento de 600 pb obtenido de *L. chagasi* (fig 1B, carril 3) marcado con biotina

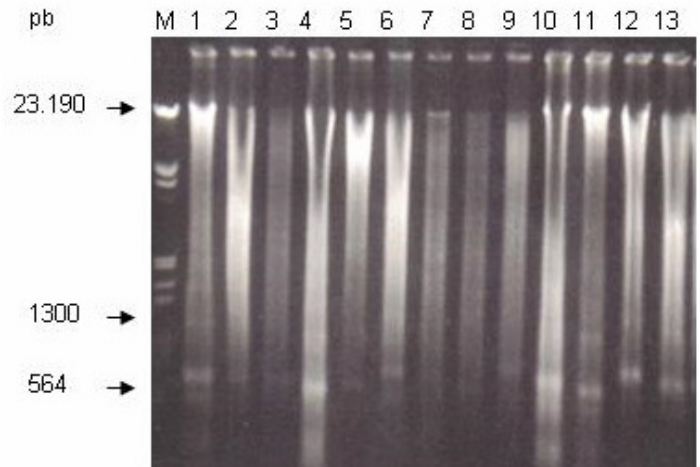


Fig 2 A.- Digestión de ADN total con la enzima HaeIII. M. Marcadores de ADN, λ DNA/HindIII (Gibco-BRL) 1.-*L. tropica*, 2.-*L. mexicana*, 3.- *L. pifanoi*, 4.- *L. amazonensis*, 5.- *L. chagasi*, 6.- *L. infantum*, 7.- *L. donovani*, 8.- *L. braziliensis*, 9.- *L. guyanensis*, 10.- *L. panamensis*, 11.- *L. major*, 12.- *L. venezuelensis*, 13.- *T. cruzi*.

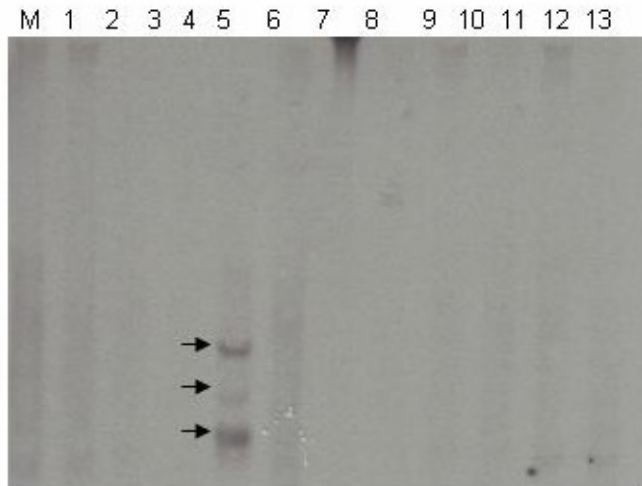


Fig 2B.- Hibridación con el fragmento de 600 pb marcado con quimioluminiscencia. M.- Marcadores de ADN. λ DNA/HindIII (Gibco-BRL) 1.-*L. tropica*, 2.-*L. mexicana*, 3.- *L. pifanoi*, 4.- *L. amazonensis*, 5.- *L. chagasi*, 6.- *L. infantum*, 7.- *L. donovani*, 8.- *L. braziliensis*, 9.- *L. guyanensis*, 10.- *L. panamensis*, 11.- *L. major*, 12.- *L. venezuelensis*, 13.- *T. cruzi*.

El resultado de la hibridación muestra que solo en *L.(L) chagasi* se obtuvo hibridación en tres fragmentos de ADN entre 1000 y 600 pb (Fig 2B, carril 5). Los resultados obtenidos con las otras enzimas fueron similares, obteniéndose hibridación solo con *L.(L.) chagasi* (resultados no mostrados)

Estos resultados fueron corroborados utilizando la misma sonda (fragmento de 600 pb marcado con biotina), para hibridar los productos de PCR de las diferentes especies de *Leishmania* utilizando para ello la técnica de dot blot (4). El resultado obtenido demuestra la especificidad de la sonda en el reconocimiento de *L.(L.) chagasi*, observándose una intensa señal de hibridación entre la sonda y el producto de PCR del aislado *L. chagasi* (PP75) (Fig 3, muestra 4), no se observó ninguna señal de hibridación en las otras especies de *Leishmania*

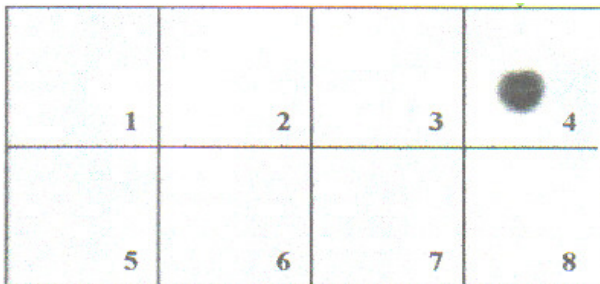


Fig 3.- Hibridación en dot blot de los productos de PCR con la sonda de 600 bp. 1.- *L. mexicana*, 2.- *L. donovani*, 3.- *L. infantum*, 4.- *L. chagasi*, 5.- *L. braziliensis*, 6.- *L. guyanensis*, 7.- *L. panamesis*, 8.- *L. amazonensis*.

DISCUSIÓN

La evolución clínica de la leishmaniasis visceral causada por *L.(L.) chagasi*, su distribución en niños y adultos jóvenes, así como su afinidad por caninos como hospedador mamífero alternativo, son características similares a la enfermedad producida por *L.(L.) infantum*. Mediante métodos enzimáticos (Zimodemos); serológicos (anticuerpos monoclonales) y genéticos (ADN nuclear y de kinetoplasto) tal como ha sido reportado (21, 22), se ha indicado que las cepas denominadas como *L.(L.) infantum* y *L.(L.) chagasi* están muy cercanamente relacionadas y algunos autores las consideran como una misma especie (23, 24). Pero aunque las similitudes entre *L. (L.) infantum* y *L.(L.) chagasi* ciertamente son grandes, las mismas no son absolutas y existen defensores de una hipótesis contraria sugiriendo que *L.(L.) chagasi* pudiera ser una especie con identidad propia, autóctona del continente americano basados en la perfecta adaptación de *L. chagasi* a zorros salvajes y otros mamíferos silvestres nativos (*Didelphis marsupialis* y *Cerdocyon thous*), sin que estos desarrollen la enfermedad (25, 3). Los resultados obtenidos en nuestro trabajo son una evidencia a favor de que ambas especies son genéticamente distintas basado en las diferencias encontradas a nivel del gen de la Ca^{+2} ATPasa, lo cual concuerda con otras evidencias tales como el perfil respirométrico que indican que *L. chagasi* tiene un patrón único, reproducible y diferente de *L. infantum* y *L. donovani* (26). Otros argumentos a favor de que se trata de dos especies distintas, son los trabajos donde se comparan los patrones de inhibición de la fagocitosis por medio de dos ligandos glicoconjugados (Fucosa-Manosa y Monogalactano fosfato) de *L. donovani*; encontraron que *L. chagasi* tenía un comportamiento mas parecido a las especies del género *Leishmania* del Nuevo Mundo que a las otras dos especies causantes de leishmaniasis visceral en el Viejo Mundo (27). En ese mismo sentido, con el uso de RFLP e hibridación con una secuencia de ADN altamente repetida (pRs2A), la cual esta asociada con sitios teloméricos del genoma de *L.(L.) donovani*, encontraron que los aislados pertenecientes al viejo mundo están altamente relacionados, mientras que la organización de esta secuencia en *L. chagasi* es completamente distinta (28).

Todas estas evidencias parecieran inclinar la balanza a favor de la diferenciación entre *L. chagasi* y *L. infantum* como dos sub-especies; sin embargo la sub especiación de *L. infantum* tendría obvias implicaciones para la actual clasificación del género *Leishmania* en el cual ya no se habla de sub-especies aunque recientemente se han propuesto las denominaciones de *L. infantum infantum* y *L. infantum chagasi* tomando en cuenta la ley de las prioridades en cuanto a la aparición de ambas especies (29, 30) tomando en cuenta las diferencias genéticas descritas y conservando el orden de aparición cronológica de ambas especies. Nuestros resultados estarían a favor de esta división, considerando a *L. chagasi* como una entidad distinta de *L. infantum*; adicionalmente el fragmento de 600 pb identificado en *L. chagasi* constituye una valiosa herramienta en la identificación y el diagnóstico de esta especie de *Leishmania* causante de la leishmaniasis visceral en América.

Agradecimientos. Al Dr. Cruz Manuel Aguilar por la revisión del manuscrito y al Lic. Miguel Angel Barrios por proveer el cultivo de algunas de las cepas de referencia internacional.

BIBLIOGRAFÍA

1. Communicable Disease surveillance and response. World Health Organization. 2004. www.who.int.
2. Zerpa O, Ulrich M, Borges R, Rodriguez V, Centeno M, Negron E. Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in Venezuela. Ver. Panam. Salud Publica. 2003; 13:239- 245.
3. Ibrahim ME, Barker DC. The origin and evolution of the *Leishmania donovani* complex as inferred from a mitochondrial cytochrome oxidase II gene sequence. Infect Genet Evol. 2001; 1: 61-68
4. Grimaldi G Jr, Tesh RB, McMahon-Pratt D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. Am. J. Trop. Med Hyg. 1989; 41(6): 686-725.
5. Morel C and Simpson L. Characterization of pathogenic Trypanosomatidae by restriction endonuclease fingerprinting of kinetoplast DNA minicircles. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1980; 29: 1070-1074
6. Wirth D and McMahon-Pratt D. Rapid identification of *Leishmania* species by specific hybridization of kinetoplast DNA in cutaneous lesion. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1982; 79: 6999-7003.
7. Barker DC and Butcher, J. The use of DNA probes in the identification of *Leishmania*: Discrimination between isolates of *Leishmania mexicana* and *Leishmania braziliensis* complex. Trns. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1983; 77: 285-297.
8. Rodriguez N, Guzman B, Takiff H, Bloom B, and Convit J (1994). Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. J. Clin. Microbiol. 1994; 32: 2246-2252.
9. Rodriguez N, De Lima H, Rodriguez A, Brewster S and Barker DC. Genomic DNA repeat from *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Venezuelan strain) containing simple repeats and microsatellites. Parasitol. 1997; 115: 349-358.
10. Rodriguez N, Rodriguez A, Barrios M, McCann S and Barker DC. *Leishmania (Viannia) guyanensis*: A new minicircle class exclusive to this specie isolated from a DNA cosmic library usefull for taxonomic purposes. Exp. Parasitol, 2000; 94:143-149.
11. Mendoza-Leon A, Luis L, Fernandez O, Cupolillo E and Garcia L. Molecular markers for species identification in the *Leishmania* subgenus *Viannia* . Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 2002; 96: 65-70.
12. Mendoza-Leon A; Shaw J and Tapia F. A guide for the cutaneous leishmaniasis connoisseur. Molecular and inmune mechanisms in the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis . Londres Company. 1996; Cap I : 1-22.
13. Singh N, Curran MD, Rastogil AK, Middleton D, Sundar S. Diagnostic PCR with *Leishmania donovani* specificity using sequences from the variable region of kinetoplast DNA minicircle DNA. Trop. Med. Int. Health. 1999; 4: 448-453.
14. Uliana R, Alfonso M, Camargo E and Floeter- Winter L. *Leishmania*: genus identification base on a specific sequence of the 18S ribosomal RNA sequence. 1991; Exp. Parasitol. 72: 157-163.
15. Victoir K, Banuls, Arevalo J; Llanos-Cuentas A, Hamers R, Noel S, De Donker S, Le Ray D, Tibayrenc M and Dujardin J. The Gp63 locus a target for genetic characterization of *Leishmania* belonging to subgenus *Viannia*. Parasitol. 1998; 117: 1-13.

16. Garcia L, Bermudez H, Llanos-Cuentas A, De Donker S, Arevalo J, Quispe K and Dujardin JC. Culture independent species typing of Neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. J. Clin. Microbiol. 2004; 42: 2294-2297.
17. Manfurt J, Nasereddin A, Niederwieser I, Jaffe C, Beck H and Felger I. Identification and differentiation of *Leishmania* species in clinical samples by PCR amplification of the Miniexon sequence and subsequence restriction fragment length polymorphism analysis. J. clin. Microbiol. 2003; 41: 3147-3153.
18. Mendoza-Leon A, Havercroft J and Barker DC. The RFLP analysis of the B-tubulin gene region of the New World *Leishmania*. Parasitol. 1995; 111: 1-9
19. Castilho T, Shaw J and Floeter-Winter L. New PCR assay using Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. J.Clin. Microbiol. 2003; 41: 540-546.
20. Lu H, Zhong L, Chang KP and Docampo R. Intracellular Ca²⁺ pool content and signaling and expression of a calcium pump are linked to virulence in *Leishmania mexicana amazonensis* amastigotes. J. Biol. Chem. 1997; 272: 9464-9473.
21. Gramiccia M, Smith DF, Angelici MC, Ready PD and Gradony L. A kinetoplasto DNA probe diagnostic for *Leishmania infantum*. Parasitology. 1992; 105: 29-34.
22. Martin-Sanchez J, Lopez-Lopez MC, Acedo-Sanchez C, Castro Fajardo JJ, Pineda JÁ, Morillas-Marquez F. Diagnosis of infections with *Leishmania infantum* using PCR-ELISA. Parasitology. 2001; 122: 607-615.
23. Rioux J, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P and Perieres J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. Ann. Parasitol Hum. Comp. 1990; 65:111-125.
24. Mauricio I, Stothard J and Miles M. The strange case of *Leishmania chagasi*. Parasitol. Today. 1999; 16: 188-189.
25. Lainson R and Shaw J. Evolution, Classification and Geographical Distribution. In The leishmaniasis. Biology and Medicine (Ed. Peters W and Killick-Kendrick R). Academic Press, London. 1987; 1-120
26. Decker-Jackson FE and Tang DB. Identification of *Leishmania spp* by radiorespirometry. II. An statistical method of data analysis to evaluate the reproducibility and sensitivity of the technique. In Chance ML and Walton BC, editors. Biochemical characterization of *Leishmania*, Geneva: PAHO workshop. 1982; 205-245
27. Palatnik CB, Previato JO, Mendonca-Previato L, Borojevic R. A new approach to the phylogeny of *Leishmania* : Species specificity of glycoconjugate ligands for Promastigotes internalization into murine macrophages. Parasitol Res. 1990; 76:289-293.
28. Ellis JT, Crampton JM. Differences between *Leishmania (Leishmania) chagasi*, *L.(L.) infantum* and *L.(L.) donovani* as shown by DNA fingerprinting. Mem. Inst Oswaldo Cruz. 1991; 86: 479-481
29. Lainson R and Rangel E. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil. A Review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2005; 100: 811-827.
30. Dantas-Torres F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: Do not forget the law of priority. Mem. Inst. Oswaldo Cruz.2006; 101: 117-118.