

Desenho e padronização de sistemas de *primers* e sondas para identificação de *Leishmania* spp.

Tayná C. Goes^{1,2}; Rayana C. S. de Moraes¹; Sinval P. Brandão-Filho¹; Cíntia N. da Costa-Oliveira¹; Milena de Paiva-Cavalcanti¹

¹Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães FIOCRUZ/CPqAM, Caixa Postal 50670-420 Recife, PE, Brasil. ²Centro Universitário Maurício de Nassau, Caixa Postal 52011-210 Recife, PE, Brasil.

A PCR quantitativa em tempo real (qPCR) por sua versatilidade, permite a identificação de espécies de *Leishmania*, tornando-se uma alternativa para um diagnóstico mais completo da leishmaniose tegumentar Americana (LTA), desde que possua *primers* e sondas desenhados a partir de alvos espécie-específicos. A importância da espécie é devido ao pleomorfismo clínico significativo apresentado pela doença dependendo da *Leishmania* sp. envolvida bem como, da resposta imune do paciente. Este estudo tem por objetivo desenvolver uma qPCR-multiplex (*TaqMan probe*) para identificação de *Leishmania* spp. relacionadas com a etiologia da LTA. Através do *software* MEGA, realizou-se um alinhamento múltiplo das sequências de *Leishmania* spp. disponíveis no *GenBank* para os alvos Citocromo b, ITS1, kDNA, SSUrDNA, HSP70, G6PD e GP63. Após análise e escolha do melhor alvo, foram desenhados, com auxílio do *software* *Primer Blast*, *primers* e sondas para compor a multiplex. Realizou-se testes para padronização dos sistemas de *primers* e sondas, individualmente. O alvo ITS1 foi escolhido, por apresentar sequências preservadas e específicas para as espécies em estudo. Os sistemas desenhados foram denominados de acordo com sua especificidade, assim sendo: Sistema Subgênero *Viannia* (SSV) e Sistema *Leishmania amazonensis* (SLa). A análise *in silico* confirmou a especificidade das sequências para as espécies abordadas. Após padronização individual por sistema, as concentrações definidas foram: 3,0 pmol/μl dos *primers* e 2,0 pmol/μl de sonda para o SSV; 2,0 pmol/μl de *primers* e 2,0 pmol/μL de sonda para o SLa; os sistemas obtiveram alta sensibilidade, podendo detectar cerca de 5fg/μl de DNA genômico, para espécies principais; as eficiências admitidas até o momento constam de 99,95% (*L. amazonensis*) e 100,05% (*L. shawi*). Assim, os sistemas poderão compor uma qPCR multiplex, superando as expectativas do diagnóstico, ao fornecer quantificação da carga parasitária e identificação da espécie em uma única reação.

Palavras-chave: leishmaniose tegumentar Americana, identificação de espécies, PCR em tempo real.

Apoio: CNPq, FACEPE, CAPES, CPqAM/FIOCRUZ-PE