

## Novos *primers* para detecção de espécies de *Leishmania* por Multiplex PCR

Carolina C. Conter<sup>1</sup>; Maria Valdrinez C. Lonardoni<sup>2</sup>; Sandra M. A. Aristides<sup>2</sup>; Rosilene F. Cardoso<sup>2</sup>; Thaís G. V. Silveira<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá (UEM), 8702-900 Maringá, PR, Brasil. Email:carolconter@gmail.com. <sup>2</sup>Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá, (UEM), 8702-900 Maringá, PR, Brasil.

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem sido útil no diagnóstico e identificação de espécies de *Leishmania*. O minicírculo do cinetoplasto (kDNA) permite o desenho de *primers* específicos com alta sensibilidade. O objetivo foi desenhar *primers* específicos para *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Leishmania) chagasi* e desenvolver um Multiplex PCR. Quatro *primers* foram desenhados com base nas sequências do GenBank do minicírculo do kDNA, sendo um *primer* 5' conservado entre as três espécies e três *primers* 3' específicos para a região variável de cada uma das espécies, amplificando 127pb para *L. braziliensis*, 100pb para *L. amazonensis* e 60pb para *L. chagasi*. A reação foi específica para as cepas de referência: *L. braziliensis* (MHOM/BR/2003/2311, MHOM/BR/2003/2314, MHOM/BR/2009/3476, MHOM/BR/2000/1655, MHOM/BR/1987/M11272); *Leishmania (Viannia) guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147); *L. amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8, WHOM/BR/75/JOSEFA); *Leishmania (Leishmania) infantum* (MHOM/BR/2002/LPC-RPV, MHOM/BR/1974/PP75); *Leishmania (Leishmania) major* (MHOM/SU/1973/5-ASKH, MHOM/IL/1980/FRIEDLIN); *Leishmania (Leishmania) donovani* (MHOM/ET/1967/HU3) e não amplificou *Leishmania (Leishmania) mexicana* (MHOM/BZ/1982/BEL21). A sensibilidade foi  $2 \times 10^{-3}$  fg para *L. braziliensis*, 0,2 fg para *L. amazonensis* e 0,2 fg para *L. infantum*. Foi possível detectar e identificar a espécie envolvida em diferentes amostras de DNA: flebotomíneos naturalmente infectados, lesão de pacientes com leishmaniose cutânea, sangue de paciente com leishmaniose visceral, medula de cão com leishmaniose, sangue de cão e de roedor com leishmaniose cutânea. O Multiplex PCR desenvolvido mostrou alta sensibilidade e capacidade de identificar espécies *Leishmania* em amostras biológicas em uma única reação. Pode ser uma ferramenta útil para diagnóstico e tomada de decisão sobre a abordagem terapêutica do paciente e na determinação da distribuição geográfica das espécies de *Leishmania*.

**Palavras-chave:** *primer*, *Leishmania*, Multiplex PCR.

**Apoio:** CAPES; Fundação Araucária