

Determinação de espécies de *Leishmania* por PCR-RFLP

**Carolina C. Conter¹; Maria Valdrinez C. Lonardoni²; Sandra M. A. Aristides²;
Rosilene F. Cardoso²; Thaís G. V. Silveira²**

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

O gene da proteína de choque térmico (*hsp70*) tem sido bastante útil na identificação de espécies de *Leishmania*, usando PCR (Polymerase Chain Reaction) seguido de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). O objetivo deste estudo foi o desenho de *primers* específicos para subgênero *Viannia* e *Leishmania* e padronização da técnica de PCR-RFLP para identificação de *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* e *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. Um par de *primers* foi desenhado a partir do alinhamento da sequência de referência das três espécies de *Leishmania* para o gene *hsp70*, obtidos a partir da base de dados GenBank. As sequências foram alinhadas no Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), e os *primers* desenhados foram designados HSPF e HSPR que amplificam um fragmento de 290pb das espécies do subgênero *Viannia* e *Leishmania*. A reação foi específica para as cepas de referência: *L. braziliensis* (MHOM/BR/2003/2314, MHOM/BR/1987/M11272); *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147); *L. amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8, WHOM/BR/75/JOSEFA); *Leishmania* (*Leishmania*) *mexicana* (MHOM/BZ/1982/BEL21); *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). Os produtos da PCR foram submetidos a tratamentos com duas enzimas de restrição (Avall e MluI) para diferenciação das espécies. O tratamento dos produtos amplificados com as enzimas de restrição gerou fragmentos capazes de diferenciar as três espécies. A enzima Avall gerou fragmentos apenas na *L. braziliensis* (105/185pb), e a enzima MluI gerou fragmentos apenas na *L. chagasi* (84/206pb), as duas enzimas não geraram fragmentos na *L. amazonensis*. Os resultados obtidos mostraram que a técnica de PCR-RFLP utilizando como gene alvo o *hsp70*, foi capaz de diferenciar as três espécies de *Leishmania*.

Palavras-chave: *primer*, *Leishmania*, HSP70, PCR-RFLP.

Apoio: CAPES; Fundação Araucária