



## PCR PARA PESQUISA DE DNA DE LEISHMANIA EM FLEBOTOMÍNEOS

Kamily Fagundes Pussi (kamilyfagundespussi@gmail.com)

Karen Araújo Magalhães (karen.magalha@gmail.com)

Herintha Coeto Neitzke Abreu (herinthaabreu@ufgd.edu.br)

Manoel Sebastião Da Costa Lima-Junior (manoel.lima@cpqam.fiocruz.br)

As leishmanioses são consideradas como uma das seis doenças infecciosas mais importantes a nível mundial devido sua alta taxa de incidência e letalidade. Há registros de casos em todas as regiões do Brasil, sendo a região Centro-Oeste a segunda região com maior número de casos. No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, são registrados cerca de 20 mil casos por ano de leishmaniose tegumentar e 3 mil casos por ano de leishmaniose visceral. A transmissão do parasita são as fêmeas de flebotomíneos infectadas por Leishmania. O objetivo deste projeto foi padronizar a técnica de PCR para detecção de DNA de Leishmania e DNA de flebotomíneo, em uma única reação. Foram utilizados flebotomíneos machos com e sem 104 promastigota de Leishmania (Leishmania) amazonensis, Leishmania (Viannia) braziliensis e Leishmania (Leishmania) infantum. O DNA foi obtido pela maceração com Resina Chelex 5%. A PCR foi realizada com dois pares de iniciadores: 13A/13B para detecção de Leishmania (120-pb) e 5LLCAC/3LLCAC para detecção de insetos do gênero Lutzomyia (220-pb). A reação de PCR continha 50mM de tampão, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTPs (Invitrogen), 0,2 μM de cada iniciador, 1 UI de Taq DNA Polimerase Platinum (Invitrogen) e 2 μL de DNA extraído. Foi testada a quantidade de ciclos e o tempo de cada ciclo no termociclador, bem como foi realizada a curva de temperatura de anelamento (gradiente) com as temperaturas de 55, 55,4, 56,2, 57,3, 58,7, 59,8, 60,6 e 61°C para detecção da melhor temperatura. Houve a amplificação de ambos os sítios alvos em todas as temperaturas testadas. Foi definida a amplificação com 30 ciclos, sendo a ciclagem a 95°C por 1,5 minutos, 57°C por 1,5 minutos e 72°C por 2 minutos. Foi possível detectar as três espécies de Leishmania. A PCR multiplex, utilizando os dois pares de primers, foi eficiente na detecção de DNA de Leishmania e poderá ser utilizado como ferramenta molecular para estudos de infecção natural em flebotomíneos. Experimentos futuros serão necessários a fim de testar a sensibilidade analítica da técnica, com o intuito de verificar qual a menor concentração de DNA que a técnica detecta. Agradecimentos: Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de iniciação científica aos dois primeiros autores e à Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) pelo apoio financeiro.