



PADRONIZAÇÃO DA PCR PARA DETECÇÃO DE LEISHMANIA EM AMOSTRA DE CÃO

Jéssica De Carvalho Martelli Miura (jemartelli@gmail.com)

Kamily Fagundes Pussi (kamilyfagundespussi@gmail.com)

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

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

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

O Estado de Mato Grosso do Sul é considerado região endêmica para a leishmaniose visceral, com muitos casos da doença, afetando também animais domésticos, principalmente os cães. As leishmanioses são doenças parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidas pela picada de fêmeas de dípteros da subfamília Phlebotominae. Como o cão doente se torna reservatório epidemiológico e pode oferecer risco à saúde pública, destaca-se a importância de desenvolvimento de métodos de diagnóstico, visando cada vez mais a melhoria da identificação de *Leishmania* em cães. Assim, técnicas de biologia molecular são empregadas para diagnóstico da infecção, dentre as quais destaca-se a reação em cadeia da polimerase (PCR), por ser apresentar alta sensibilidade e especificidade. Existem variações da PCR, como a técnica da Multiplex-PCR, onde mais de um fragmento é amplificado em uma única reação, sendo cada um, resultado da amplificação de seu par de iniciadores específicos. Essa técnica apresenta vantagens em relação ao diagnóstico pela PCR convencional devido maior rapidez na obtenção dos resultados, como também na economia de reagentes. O presente trabalho objetivou padronizar a PCR para a detecção de DNA de *Leishmania* e DNA canino. Foram utilizadas amostras de sangue periférico de cão com e sem 104 promastigota de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*, *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* e *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum*. Obteve-se o DNA pela técnica de SDS 20%, de acordo com o protocolo previamente estabelecido, e ressuspendeu-o em tampão TE (TRIS 10mM; EDTA 1mM; pH 8,0). A amplificação foi realizada com dois pares de iniciadores que amplificam regiões específicas de *Leishmania* (13A/13B – 120-pb) e para do gene da β -actina canina (β -actina F/R – 320-pb). Analisou-se as temperaturas de anelamento (58/ 57,8/ 57,4/ 56,9/ 56,2/ 55,6/ 55,2/ 55°C), o número de ciclos para a amplificação, a concentração de dNTP e o tempo e temperatura da ciclagem. Foi definida a melhor temperatura de anelamento (55°C), o número de ciclos (35), a concentração de dNTP (0,6 μ L) e as configurações do termociclador para amplificação (95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos). Nessas condições, foi possível detectar as três espécies de *Leishmania*. A PCR utilizando os dois pares de primers se mostrou eficiente para detecção de DNA de três espécies de *Leishmania* em amostras de sangue canino e poderá ser utilizado em estudos moleculares. Agradecimentos: Ao CNPq pela concessão de bolsa de iniciação científica aos três primeiros autores e à UFGD pelo apoio financeiro.