

**PADRONIZAÇÃO DE TESTES PCR EM TEMPO REAL PARA DETECÇÃO DO
DNA DE *Leishmania* sp. EM AMOSTRAS DE SANGUE COLETADAS DE
PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR, UTILIZANDO O ALVO
MOLECULAR *hsp70***

SILVA, Ana Karoline^{1, 2}; RATIER, Enmanuella Helga^{1, 3}; MATOS, Cristiane^{1, 3}; SOUZA, Claudinho Limeira¹; CANTANHÊDE, Lilian^{1, 4}; CUPOLLILO, Elisa⁴; FERREIRA, Ricardo de Godoi^{1, 3} e FERREIRA, Gabriel Eduardo Melim^{1, 3}.

¹Fundação Oswaldo Cruz - Rondônia; ²Centro universitário São Lucas; ³Programa de pós-graduação em Biologia experimental; ⁴ Instituto Oswaldo Cruz.

INTRODUÇÃO: As leishmanioses são doenças negligenciadas consideradas um importante problema de saúde pública. A leishmaniose tegumentar (LT) apresenta uma variedade de manifestações clínicas e pode ser classificada em cutânea e mucosa, sendo a forma cutânea subdividida em localizada, disseminada e difusa. A estratégia mais comum para o diagnóstico de LT utiliza amostra de lesão de pele para a detecção do parasita por microscopia. Por outro lado, ensaios moleculares para detecção de DNA de *Leishmania* dispõem maior sensibilidade, especificidade, além de poderem ser realizados a partir de uma variedade de amostras biológicas. A detecção molecular do parasita no diagnóstico de LT por PCR convencional é a abordagem molecular mais amplamente utilizada. Contudo, a aplicação de metodologias ainda mais sensíveis, como o PCR em tempo real (qPCR), e que dispensariam a interpretação de eletroforeses em gel poderiam aumentar a capacidade de detecção e a gama de amostras testadas. A padronização de uma reação utilizando o sangue como amostra, além de ser menos invasiva para o paciente pode ser implementada em bancos de sangue e ser utilizada para realizar o diagnóstico de pacientes assintomáticos. **OBJETIVO:** O objetivo do presente trabalho é padronizar um teste de PCR em tempo real para detecção do DNA de *Leishmania* em amostras de sangue, utilizando o alvo molecular *hsp70*. **MATERIAL E MÉTODO:** O DNA das amostras foi extraído usando um kit comercial e foi feita uma diluição seriada do DNA para analisar a eficiência da amplificação. Foi realizado um gradiente de concentração de oligonucleotídeo para determinar a concentração ideal a ser utilizada. O gradiente de concentração e o teste da eficiência da amplificação foram feitos utilizando o DNA de uma cultura de *Leishmania* como controle positivo, e o DNA extraído de amostra de sangue. **RESULTADOS E DISCUSSÃO:** O oligonucleotídeo *hsp70* apresentou uma amplificação ideal na concentração de 400nM. Foram processadas 84 amostras (em duplicatas) de pacientes positivos para LT atendidos no hospital CEMETROM e em 43 dessas foi detectado o DNA de *Leishmania* por qPCR com amplificação entre os ciclos 30 e 39. Das 41 amostras restantes, 33 apresentaram amplificação em apenas uma das replicatas e por isso não foi possível confirmar a detecção do DNA de *Leishmania*. A partir dos resultados obtidos, observa-se que é possível utilizar o alvo molecular *hsp70*

para a detecção do DNA de *Leishmania* em amostras de sangue periférico por qPCR. **CONCLUSÃO:** A utilização dessa metodologia para o diagnóstico de LT mostrou ser uma técnica fiável, junto ao fato de utilizar uma amostra coletada de forma menos invasiva. Espera-se que seja possível propor a aplicação dessa abordagem para detecção de *Leishmania* em sangue com consequente melhoria no diagnóstico e prognóstico de LT.

AGRADECIMENTO: FAPERÓ, CAPES e Laboratório de Epidemiologia genética - FIOCRUZ.

Palavras chaves: *Leishmania*, PCR em tempo real, *hsp70*.

E-mail: anakarolinechruz@gmail.com.