

## **R8 Padronização da reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real na detecção do DNA de *Leishmania***

Diego Lima Candido da Silva<sup>1</sup>, Otávio de Melo Espindola<sup>1</sup>, Aline Fagundes da Silva<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Infectologia, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ

**Introdução:** O diagnóstico de certeza para leishmaniose tegumentar é realizado através da observação do parasito no material obtido das lesões sugestivas. O resultado favorável do diagnóstico depende de fatores como a espécie de parasito, a forma clínica e o tempo de evolução da doença e outras variáveis. Ainda são poucos os trabalhos utilizando a quantificação de ácidos nucleicos de *Leishmania* em diagnóstico, no entanto, a padronização dessa ferramenta poderia ser útil na obtenção da melhoria da eficiência do diagnóstico e da caracterização clínica e epidemiológica da doença.

**Objetivo:** Padronizar a q-PCR para *Leishmania*, incluindo as etapas de titulação dos iniciadores da reação; construção da curva padrão com DNA de cepa referência de *Leishmania* e determinação da faixa de detecção da q-PCR.

**Metodologia:** A q-PCR foi realizada utilizando-se os iniciadores direcionados à região conservada do DNA do cinetoplasto de *Leishmania*, com o kit ROTOR- GENE® SYBR GREEN (Quiagen®). A ciclagem consistiu de um estágio de 5 segundos a 95°C, e 30-40 ciclos de 15 segundos a 60 °C. Uma curva de dissociação foi realizada para cada reação, para identificação dos produtos amplificados. A reação foi realizada em 25 µL de solução contendo 5µL de DNA alvo, 12,5 µL PCR master mix (do kit Rotor Gene®), água milli Q e os iniciadores, titulados para padronização da melhor concentração. Para avaliação da reação, foram realizadas curvas padrão, utilizando DNA de cepa referência de *L. (V.) braziliensis* e *L.(L)amazonensis*, em 5 concentrações conhecidas. A determinação da faixa de detecção da reação por meio de curva de titulação de DNA alvo extraído de promastigotas de cepa referência de *Leishmania (V.) braziliensis*. O software integrado ao sistema ROTOR GENE possibilita a análise computadorizada dos resultados.

**Resultados:** As seguintes concentrações de iniciadores foram utilizadas na detecção de DNA das culturas (HM1- 15 pMol / µL; HM2- 30 pMol / µL e HM3- 15 pMol / µL). Com essas concentrações todas as amostras de cultura amplificaram, demonstrando o reconhecimento das espécies de *Leishmania* mais importantes do Brasil. A curva de dissociação da reação acima mostrou que as espécies puderam ser identificadas. Para a curva de titulação, foram utilizadas diluições seriadas de base 10 variando de 0,07 a 0.00000007 nG/µL. Na diluição de 0.00000007 nG/µL foi observado um pico de dissociação

inespecífico na curva de dissociação, compatível com o pico observado nos controles negativos. Assim sendo, a diluição anterior foi considerada o limiar de detecção da metodologia, a saber 0.0000007 nG/ $\mu$ L.

**Conclusão:** A metodologia de q-PCR padronizada neste trabalho detectou, quantificou e identificou DNA de diferentes espécies de *Leishmania*, com limiar de detecção de 0.0000007 nG/ $\mu$ L. A partir da reação padronizada, poderão ser realizados ensaios para a determinação da sensibilidade diagnóstica do ensaio e do seu potencial para utilização em diagnóstico clínico.

**Palavras-Chave:** Leishmanioses, q-PCR, Diagnóstico