**DESENVOLVIMENTO DE PCR EM TEMPO REAL PARA O ESTUDO DA GENÉTICA POPULACIONAL DA *Leishmania (Viannia) braziliensis* E AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA RECENTE COM GENÓTIPO DESSE PARASITA**

**RESUMO**

**Introdução**: A leishmaniose tegumentar compreende um grupo de doenças causadas por diferentes protozoários do gênero *Leishmania.* A *Leishmania (Viannia) braziliensis* é a principal causa da Leishmaniose Tegumenta no Brasil, causando ao menos três formas clínicas: leishmaniose cutânea localizada (LC), leishmaniose mucosa (LM) e leishmaniose disseminada (LD). Corte de Pedra (CP) na Bahia é uma área endêmica para a LTA, na qual encontramos as três formas clínicas. Uma apresentação precoce da LC, caracterizada por pápula na pele do paciente e linfadenopatia regional tem sido identificada. Essa forma é denominada de leishmaniose cutânea recente (LCR). Associações entre alelos no *locus* iniciado na posição 425.451 do cromossoma 28 da *L. braziliensis* e formas de leishmaniose têm sido descritas. **Objetivo**: Desenvolver ensaio de PCR para a detecção de alelos no *locus* CHR 28/425451 da *L. braziliensis* de Corte de Pedra-Ba e avaliar o papel da cepa parasitária na leishmaniose cutânea recente. **Métodos**: É um estudo de corte transversal, no qual o DNA total foi extraído de 109 suspensões de *L. (V.) braziliensis* isoladas de pacientes de LTA de Corte de Pedra. No *locus* CHR28/425451 foram encontrados três sítios polimórficos, cujos conteúdos resultaram em quatro haplótipos, isto é, alelos (CCT, CC-, TTT e TT-), observados na *L. braziliensis* de Corte de Pedra. Pares de primers foram desenvolvidos a partir das sequências destes haplótipos, que se mostrou capaz de distinguir o conjunto de haplótipos em dois grupos: CCT/CC- e TTT/TT-. Em outra amostra de 40 suspensões de *L. braziliensis,* o *locus* CHR28/425451 foi amplificado por PCR de amostras de LC e LCR, os fragmentos de DNA obtidos nestas amplificações foram clonados em plasmídio e sequenciados. Baseado nas sequências obtidas, os alelos presentes em cada isolado foram determinados e avaliados se há frequências significativamente distintas entre parasitos provenientes de LCR e LC. **Resultados**: O PCR convencional e o PCR em tempo real desenvolvidos para a rápida genotipagem do *locus* CHR28/ 425451 mostraram acurácia compatível com a da genotipagem realizada por sequenciamento. Esse método consiste numa ótima opção para a substituição do sequenciamento em estudos de genética de populações, quando são conhecidos os principais alelos presentes para o *locus* testado na população alvo. Em uma associação do alelo CCT com a LCR e LC foram encontrados frequências significativamente distintas do alelo CCT entre os grupos. **Conclusão**: A validação mostrou que os dois PCRs desenvolvidos apresentam acurácia compatível com a da genotipagem por sequenciamento na discriminação entre dois pares de alelos: CCT/CC-, TTT/TT-. A forma recente da leishmaniose cutânea (i.e. LCR) apresenta população de *L. braziliensis* distinta daquela encontrada na forma mais avançada da leishmaniose cutânea localizada clássica.

**Palavras-chave:** *Leishmania (Viannia) braziliensis*, polimorfismos e reação em cadeia da polimerase (PCR).

**ABSTRACT**

**Introduction**: Tegumentary leishmaniasis comprises a group of diseases caused by different protozoa of the genus *Leishmania*. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the main cause of Leishmaniasis Tegumenta in Brazil, causing at least three clinical forms: localized cutaneous leishmaniasis (CL), leishmaniasis mucosa (ML) and disseminated leishmaniasis (DL). Corte de Pedra (CP) in Bahia is an endemic area for LTA, in which we find the three clinical forms. An early presentation of CL, characterized by papule in the patient's skin and regional lymphadenopathy has been identified. This form is called recent cutaneous leishmaniasis (ECL). Associations between alleles at the *locus* started at position 425.451 of chromosome 28 of *L. braziliensis* and forms of leishmaniasis have been described. **Objective**: To develop a PCR assay for the detection of alleles in the CHR 28/425451 *locus* of Corte de Pedra-Ba and to evaluate the role of the parasite strain in recent cutaneous leishmaniasis. **Methods**: This is a cross-sectional study in which the total DNA was extracted from 109 suspensions of *L. braziliensis* isolated from cut stone ATL patients. In the CHR28/425451 *locus* three polymorphic sites were found, whose contents resulted in four haplotypes, that is, alleles (CCT, CC-, TTT and TT-) observed in *L. braziliensis* of Corte de Pedra. Pairs of primers were developed from the sequences of these haplotypes, which proved to be able to distinguish the set of haplotypes in two groups: CCT/CC- and TTT/TT-. In another sample of *L. braziliensis* suspensions, the CHR28/425451 *locus* was PCR amplified from CL and ECL samples, the DNA fragments obtained in these amplifications were cloned into plasmid and sequenced. Based on the sequences obtained, the alleles present in each isolate were determined and evaluated if there were significantly different frequencies between ECL and LC parasites. **Results**: Conventional PCR and real-time PCR developed for rapid genotyping of the CHR28/425451 *locus* showed accuracy compatible with genotyping performed by sequencing. This method is an optimal choice for sequencing substitution in population genetics studies when the major alleles present for the *locus* tested in the target population are known. In a combination of the CCT allele with the ECL and LC, significantly different frequencies of the CCT allele were found between the groups. **Conclusion**: The validation showed that the two PCRs developed were compatible with genotyping by sequencing in the discrimination between two pairs of alleles: CCT/CC-, TTT/TT-. The recent form of cutaneous leishmaniasis (i.e., ECL) has a population of *L. braziliensis* distinct from that found in the more advanced form of classic localized cutaneous leishmaniasis.

**Key words**: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, polymorphisms and polymerase chain reaction (PCR).







