

## **SUB-ÁREA: Diagnóstico molecular. Bacteriológico e Sorológico da Leptospirose**

### **Padronização de diagnóstico molecular para Leptospirose canina com *pool* de amostras**

Rafaela da Rosa Marques<sup>1</sup>, Gabriela Merker Breyer<sup>1</sup>, Tainara Soares Weyh<sup>1</sup>, Laura Cadó Nemitz<sup>1</sup>, Franciele Maboni Siqueira<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Bacteriologia Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

A leptospirose é uma doença infecciosa causada por diferentes sorovares de *Leptospira* spp. que apresentam alto potencial zoonótico e de ocorrência mundial. O diagnóstico rápido e sensível é importante para reduzir a disseminação da bactéria, porém, em caninos, o diagnóstico correto pode ser dificultado pelo período de incubação da bactéria, que no início da infecção causa bacteremia e posteriormente passa a ser excretado intermitentemente na urina do animal. Por isso, o objetivo deste estudo foi realizar a padronização do diagnóstico molecular para leptospirose canina, usando tanto sangue quanto urina de caninos, visando garantir o diagnóstico molecular independente do estágio da doença. Inicialmente, o protocolo foi testado com contaminação *in vitro* de amostras de sangue e urina inócuas com  $4,4 \times 10^7$  células de *L. interrogans* Canicola em ambos espécimes clínicos e também em *pool*. Em paralelo, culturas puras de três sorovares de *L. interrogans* (Canicola, Copenhageni e Pomona) foram incluídas na análise para verificar a capacidade de detecção do teste. As amostras foram submetidas ao isolamento de DNA com o kit DNA Mini kit Blood/Tissue (Mebep Bioscience) e os DNAs obtidos foram empregados na detecção de *Leptospira* spp. utilizando o kit LPTamp comercial (Simbios Biotecnologia), seguindo as instruções do fabricante, em duplicatas, e utilizando o QuantStudio™ 3 Real – Time PCR System (Applied Biosystems). Primeiramente, confirmamos a capacidade do ensaio em detectar os diferentes sorovares de *L. interrogans*, e também em todas as amostras contaminadas *in vitro*. Para determinar a sensibilidade do ensaio, realizamos uma curva padrão com uso de diluições seriadas de DNA isolado do *pool* contaminado *in vitro*, onde foi possível a detecção de 1 a  $3,8E+06$  cópias/ $\mu$ L e cálculo da regressão linear em  $y = -0.928x + 25.512$ , onde  $y$  é log (número de cópias) e  $x$  é o  $C_t$  observado ( $R^2 = 0.957$ ). Baseado nos resultados obtidos, foi possível confirmar a detecção molecular de *Leptospira* spp. a partir de DNA advindo de *pool* de sangue e urina, sendo uma ferramenta útil no diagnóstico e monitoramento de casos de leptospirose, principalmente em contextos epidemiológicos de emergência climática.

**Palavra-chave:** contaminação *in vitro*; sorovares; zoonose; qPCR.