

SUB-ÁREA: Diagnóstico e Controle

Limite de detecção de *Leptospira* sp. por *lipL32*-PCR em amostras de útero de bovinos

Juliana dos Santos Loria de Melo^a; Luiza Aymée^a; Maria Isabel Nogueira Di Azevedo^a; Ana Luiza dos Santos Baptista Borges^a; Walter Lilenbaum^a

^aLaboratório de Bacteriologia Veterinária, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal Fluminense, Niterói - RJ

A leptospirose genital bovina (BGL) é uma doença crônica e subclínica, caracterizada pela colonização genital de leptospiras. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma excelente alternativa para o diagnóstico direto do patógeno, pois apresenta alta sensibilidade e especificidade. O gene alvo *lipL32* possui grande aplicação no diagnóstico de animais portadores, sendo específico para a detecção de leptospiras patogênicas. Estudos anteriores demonstraram que o limite de detecção deste gene em amostras de urina é de 10^2 , porém o limite de detecção em amostras genitais era desconhecido. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o limiar de detecção de amostras de úteros de bovinos por *lipL32*-PCR. Amostras de tecidos uterinos foram coletadas de vacas de um abatedouro do estado do Rio de Janeiro. Após triagem através de *lipL32*-PCR, 18 fragmentos uterinos negativos foram selecionados para o procedimento de *spiking*. Uma cultura *Leptospira santarosai* sorovar Guaricura (FV52), isolada de fluido vaginal de bovino, foi submetida a contagem na câmara de Petroff-Hausser. Dos fragmentos uterinos negativos, 18 tecidos de 250mg foram macerados em PBS 1x. Cada conteúdo macerado foi distribuído em 9 alíquotas de 900µL. Da cultura previamente contada e na concentração 10^8 , 100 µL foram inoculados nas amostras de útero maceradas. A partir destas, foram realizadas diluições seriadas da cultura no conteúdo macerado até atingir a concentração de 10^1 . O controle negativo foi realizado através da adição de meio de cultivo puro (EMJH) no conteúdo macerado. Após as diluições, procedeu-se com a extração do DNA (kit Wizard SV Genomic DNA Purification System® - Promega), a PCR e eletroforese dos produtos amplificados. Dos 18 úteros analisados, 9 (50%) fragmentos apresentaram limiar de detecção de 10^3 e 9 (50%) fragmentos apresentaram limiar de detecção de 10^4 . Os resultados demonstraram que o limite de detecção do gene *lipL32* em amostras de útero é maior do que o limite encontrado em amostras de urina (10^2). De acordo com estes resultados preliminares, esta técnica pode apresentar resultados falso-negativos em fragmentos de útero com baixa concentração de leptospiras. Devido ao baixo número de úteros testados, faz-se necessária a condução deste estudo em um número maior de fragmentos, assim como a avaliação do limite de detecção em amostras de muco cérvico-vaginal e de outros protocolos de extração de DNA.

Palavras-chave: leptospirose; útero; PCR; limite detecção; *lipL32*
Agências de Fomento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).