

ImmunoComb

CANINE LEPTOSPIRA

Kit de Teste para Detecção de Anticorpos IgG anti-Leptospira em Caninos

Instruções de Uso

USO VETERINÁRIO

Nº Cat. do Produto: 50CLC201/50CLC210

PRODUTO IMPORTADO



Proprietário e Fabricante: Biogal Galed Laboratories Asc. Ltd., Galed, 1924000 Israel
Tel: 972-4-9898605 / Fax: 972-4-9898690

Representante Exclusivo no Brasil, Importador e Distribuidor: JMR TRADING LTDA
CNPJ 11.857.347/0001-71
Rua Santa Alves Petra, 173 - Pinhais - Paraná-Brasil
Fone/Fax: (41)3779-2130 e-mail: info@vpdiagnostico.com.br
Responsável Técnica: Dra. Margareth Carvalho S. Agottani CRMV PR nº 3288
SAC info@vpdiagnostico.com.br www.vpdiagnostico.com.br

I. FINALIDADE DO KIT

O kit Canine Leptospira foi projetado para determinar em soros de caninos, títulos de anticorpos séricos de diferentes sorovares patogênicos de *Leptospira interrogans*, como *L. icterohaemorrhagiae* (copenhageni e RGA), *L. canicola*, *L. pomona* e *L. grippityphosa*, ligando anticorpos para as variantes mais encontradas em cães. O kit não é destinado a distinguir o sorovar específico e não se destina a controlar a vacinação.

II. INFORMAÇÕES GERAIS

A leptospirose, é uma espiroqueta que ocorre em todo o mundo, em vários animais. Trata-se de uma doença zoonótica importante. Os casos relatados, estão em ascensão em todo o mundo. Diferentes sorotipos de *Leptospira interrogans* são mantidos como hospedeiros na natureza, em animais selvagens e domésticos, sub-clinicamente infectados. Estes hospedeiros, são uma fonte de infecção para os seres humanos e outros hospedeiros acidentais. A infecção canina, ocorre em cães que se alimentam de animais portadores, como ratos ou cães, que têm acesso a áreas arborizadas, com margens de rios ou pântanos, águas paradas ou alimentos contaminados por urina de ratos, por exemplo. Água parada é um ambiente natural para a *Leptospira*. A infecção também pode ocorrer através do contato direto com a urina contaminada e por via transplacentária e venérea. Infecção indireta também é possível através de exposição a contaminação da água, vegetação, solo ou alimentos.

A *Leptospira* não multiplica-se fora de um hospedeiro, cuja sobrevivência depende das condições ambientais em que se encontram. *Leptospira* são sensíveis à ambiente seco e alterações de pH podem ser prejudiciais a ela. Há uma maior incidência

de leptospirose durante a estação chuvosa, quando há uma abundância de água e umidade. Foram instituídos programas de vacinação como tentativa para controlar a doença. Entretanto, a vacinação nem sempre protege, e a duração da imunidade alcançada é muito curta.

III. O QUE É O TESTE IMMUNOCOMB?

O teste ImmunoComb é um kit de ELISA portátil. É um teste sensível que detecta níveis de anticorpos no soro. Os resultados da IgG anti-*Leptospira*, contida no sangue do paciente canino, são obtidos em torno de 20 minutos.

IV. COMO FUNCIONA O IMMUNOCOMB?

- O Kit contém 2 componentes principais: um cartão de plástico em forma de pente, a seguir designado o Pente e um multi compartimento, a placa de desenvolvimento.
- O Pente tem 12 dentes suficientes para 12 testes. Cada dente será utilizado em uma coluna correspondente de poços, na placa de desenvolvimento. Amostras individuais ou múltiplas podem ser testadas, basta destacar a quantidade desejada de dentes do pente.
- Antígenos das sorovares estão adsorvidos em um ponto na parte inferior de cada dente do pente. O ponto superior é a referência positiva. (Pág 6)
- A primeira etapa do ensaio é depositar amostra de soro ou plasma, no poço da linha A da placa de desenvolvimento.
- Em seguida, o pente é inserido no poço já com a amostra e transferidos para os poços restantes (B-F), em intervalos de tempo informados na instruções passo a passo (ver pag.4). Os anticorpos IgG específicos da espécie, se presentes, ligam-se aos antígenos adsorvidos nos pontos do pente.
- O pente é transferido para o poço

seguinte (linha B) em que os anticorpos não ligados são lavados.

- O pente é inserido no poço seguinte (linha C), que contém enzima marcada anti-anticorpos IgG de canino, que ligam-se aos complexos antígeno-anticorpo .

- Após mais duas lavagens (linhas D & E), o pente é movido para o poço seguinte (linha F), ocorre o desenvolvimento de cor através de uma reação enzimática.

- A intensidade do resultado de cor corresponde diretamente ao nível de anticorpos na amostra. Os resultados são registrados com o ponto de referência positivo e CombScale.

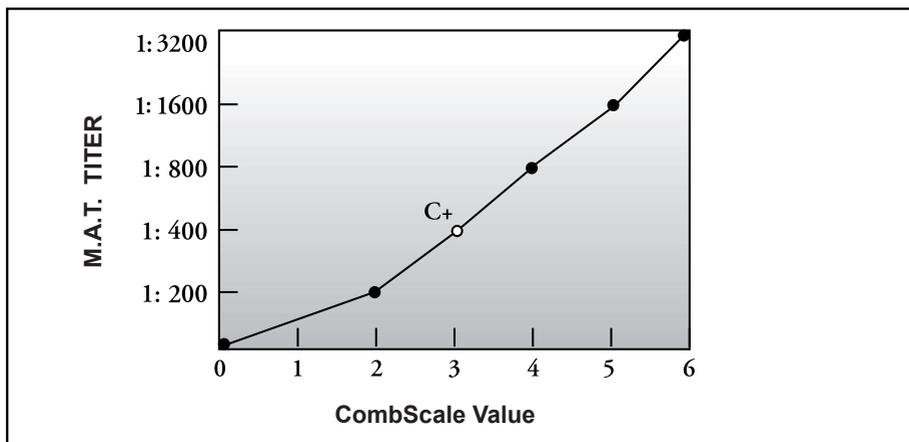
V. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico de *Leptospira* canina é amplamente baseado em sinais clínicos. O teste sorológico é útil no estabelecimento

do diagnóstico. O teste de aglutinação microscópica (MAT) é o método padrão de laboratório para o diagnóstico sorológico da leptospirose. Um aumento de quatro vezes no título de anticorpos para um sorovar de *Leptospira* é considerado significativo. Não é raro ver títulos elevados para vários sorovares devido a reações cruzadas. Se houver uma reação cruzada positiva com os sorovares, os títulos mais elevados são considerados os mais importantes.

O teste ImmunoComb que se baseia na tecnologia DOT- ELISA, é mais sensível do que o MAT, no entanto, não identifica o sorovar específico. O kit ImmunoComb Canino *Leptospira* é adequado para a detecção de níveis crescentes de anticorpos, devido à infecção com qualquer um dos seguintes sorovares: *L. canicola*, *L. icterohaemorrhagiae*, *L. grippityphosa* e *L. pomona*.

Fig. 1 – Relação Entre Valores do Teste ImmunoComb *Leptospira* Valor “S” e Títulos do Teste M.A.T.

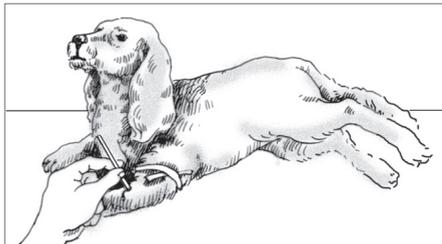


VI. TÉCNICA PASSO A PASSO

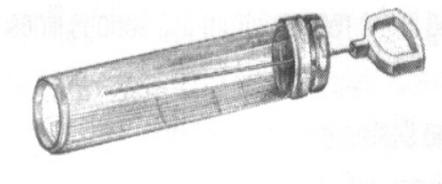
Para melhores resultados realizar o teste em temperatura entre 20-25 °C

Misturar os reagentes agitando suavemente a placa várias vezes antes de usar. Antes de realizar o teste manter todos os elementos do kit e amostras à temperatura ambiente por 60 - 120 minutos ou apenas incubar a placa durante 22 minutos a 37 °C

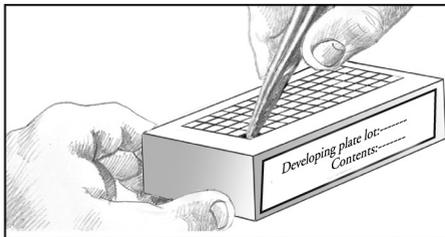
(1) Obter amostra de sangue do cão.



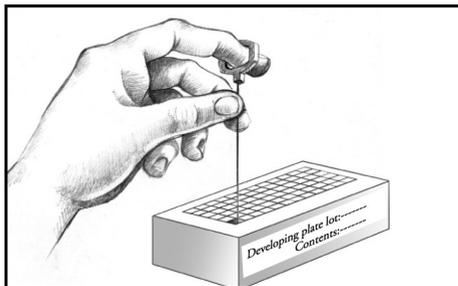
(2) Usar uma pipeta ou tubo capilar *. Para amostra de sangue total pipetar 10 µL. Para testar o soro / plasma usar 5 µL.



(3) Misturar os reagentes agitando suavemente a placa várias vezes antes de usar. Use a pinça para perfurar a tampa de alumínio de proteção da linha A. Um poço para cada amostra.



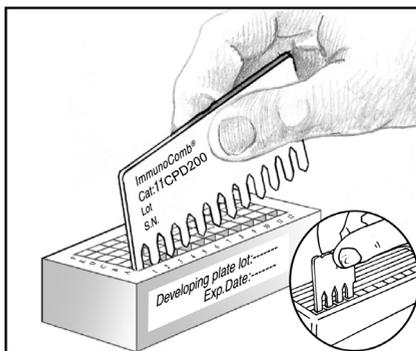
(4) Depositar uma amostra na cavidade da linha A. Levantar e abaixar pistão da pipeta/tubo capilar, várias vezes para homogeneizar a amostra e o diluente do poço. Evite derramamento e contaminação cruzada de soluções.



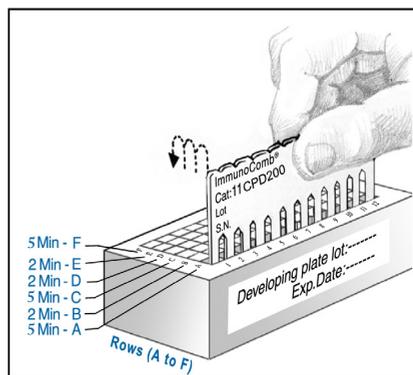
Não abra qualquer cavidade da linha A ou de outras linhas que você não pretenda usar. Não retire a proteção de alumínio.

* Unidade de 40 tubos capilares e um pistão podem ser adquiridos mediante solicitação.

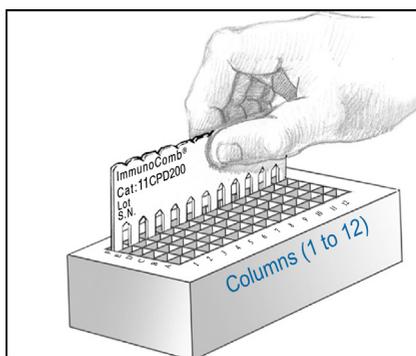
(5) Retire o pente de seu envelope de proteção. **Não toque nos dentes do pente.** Para testar menos do que 12 amostras, cortar ou romper o pente por dobragem nos entalhes, para a quantidade de testes necessários. Inserir o Pente no poço aberto (s) na **linha A** (o lado impresso de frente para você) e incubar por **5 minutos**. Para melhorar a mistura, mergulhe suavemente **para cima e para baixo** o pente, no início de cada incubação. Repetir este movimento, pelo menos, duas vezes até terminar o tempo.



(6) Antes de transferir o pente de um poço para outro, perfure o alumínio do poço seguinte usando a pinça (**linha B**). Retirar suavemente o excesso de líquido dos dentes do pente batendo com a ponta do dente em um papel absorvente, e encaixe o pente, durante **2 minutos na linha B**. Inserir pente no poço seguinte (**linha C**) durante **5 minutos**. E nas cavidades restantes (**linhas D & E**), durante **2 minutos** cada e o último poço (**linha F**) durante **5 minutos**.



(7) Após a fileira F, mova o pente de volta para a linha E por **2 minutos** para fixação da cor. Retirar o Pente e deixar secar naturalmente por 1-10 minutos. **NÃO SEQUE COM PAPEL.**



A sequência da técnica pode ser vista no site:
www.vpdiagnostico.com.br

VII. LEITURA DO TÍTULO DE IgG E INTERPRETAÇÃO DO RESULTADO

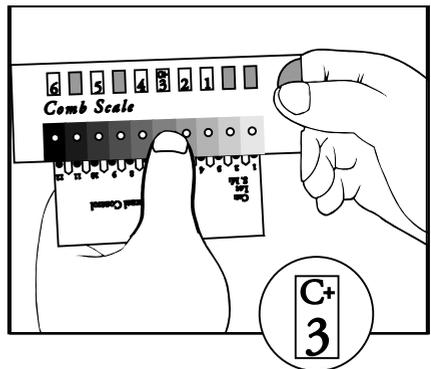
- O ponto superior no dente é a referência positiva. O tom da cor desse ponto é o mesmo gerado por uma resposta de IgG positiva significativa. Este ponto deve ser lido como S3 numa escala de S0 a S6. (S3 é considerado o nível de “cut-off” de anticorpos IgG, que é aproximadamente equivalente a uma resposta imunológica positiva com um título de 1:400 no teste de Microaglutinação). Veja a figura 1.
- O ponto inferior do dente dá o título de anticorpos IgG anti-*Leptospira* dos sorovares, na amostra testada. Compare a tonalidade deste ponto (inferior) com o ponto de Referência Positiva (superior). Uma tonalidade visivelmente mais escura do ponto inferior (*Leptospira*), em relação ao ponto Referência Positiva, indica uma resposta positiva.
- Tonalidade mais fraca do que a cor de Referência positiva indica um título baixo, aproximadamente equivalente a um título de 1:100 a 1:200 pela Técnica MAT.
- Para avaliar a pontuação de anticorpos, utilize o CombScale fornecido no kit.

VIII. LEITURA DOS RESULTADOS COM O COMBSCALE

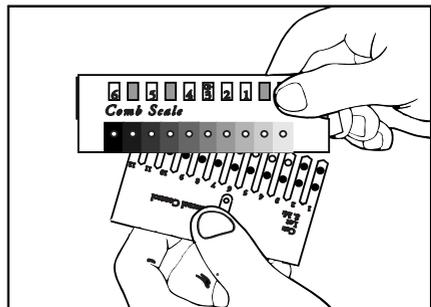
O valor CombScale S é o número que aparece na janela amarela correspondente ao tom da cor, do ponto referência positiva, que é calibrada em S3.

Quando o pente estiver completamente seco, alinhá-lo com o CombScale fornecido no kit. Encontrar o tom de roxo-cinza no CombScale que mais se aproxima do ponto de **Referência Positiva** (ponto superior). Deslize a régua amarela até a marca C+ aparecer na janela, acima da cor que você encontrou.

Segure a régua nesta posição durante toda a leitura. Este passo realmente calibra a C + à S3, que é o ponto de “cut-off”, que os pontos de teste serão comparados

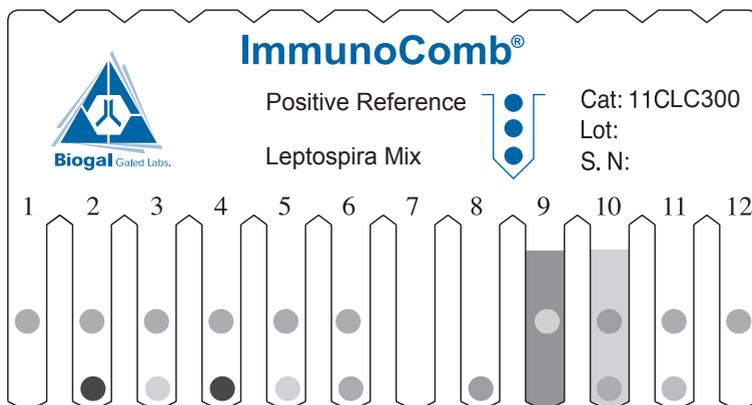


Enquanto mantém a régua fixa, encontrar o tom de roxo-cinza no CombScale que mais se aproxima do ponto do resultado do teste desejado (o ponto inferior). O número que aparece na janela acima é a pontuação CombScale (S0-S6). Repita este passo com cada ponto de teste separadamente.



OBS.: o resultado pode ser avaliado através do programa CombScan e escanar com compatibilidade TWAIN (cd é fornecido gratuitamente se solicitado).

IX. EXEMPLO DE TESTE PRÁTICO



Dente No.	Resultados	
1	S0	Reação negativa para <i>Leptospira</i> .
2	≥S5	Reação fortemente positiva para <i>Leptospira</i> .
3	S1-2	Reação fraca positiva para <i>Leptospira</i> .
4	≥S5	Reação fortemente positiva para <i>Leptospira</i> .
5	S1-2	Reação fraca positiva para <i>Leptospira</i> .
6	≥S3	Reação positiva para <i>Leptospira</i> .
7*		Teste inválido
8*		Teste inválido
9**		Teste inválido
10***	≥S3	Reação positiva para <i>Leptospira</i> .
11	≥S3	Reação positiva para <i>Leptospira</i> .
12	S0	Reação negativa para <i>Leptospira</i> .

Observações:

- * O ponto Referência Positiva nao reagiu. Repetir o teste.
- ** Cor de fundo muito escura. Repetir o teste.
- *** Cor de fundo escura com resultado positivo.

Para auxílio adicional contatar:

Distribuidor local pelo telefone/fax: (41)3779-2130

e-mail: info@vpdiagnostico.com.br - website: www.vpdiagnostico.com.br

Fabricante: Laboratórios da Biogal Gated pelo telefone: 972-4-9898605 / Fax: 972-4-9898690

e-mail: info@biogal.co.il - website: www.biogal.co.il

X. CONDIÇÕES DE CONSERVAÇÃO & MANIPULAÇÃO

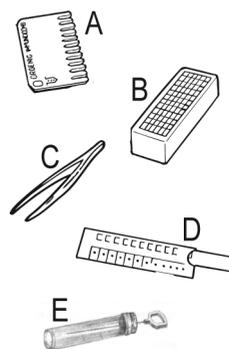
- Armazenar o kit entre 2°C e 8°C.
- Não utilizar pente e placa de lotes diferentes.
- Não congelar o produto (temperatura abaixo de 0 °C).
- Não tocar com os dedos a ponta dos dentes dos pentes onde está adsorvido o antígeno.
- Não expor a vácuo.

XII. RISCOS PARA A SAÚDE PÚBLICA DURANTE SUA MANIPULAÇÃO

- O kit contém azida sódica, NaN3 0,1%, considerado carcinogênico e material biológico inativado.
- Ao proceder o teste é recomendado utilizar luvas descartáveis e óculos.
- Caso as soluções dos poços caiam acidentalmente nas mãos ou olhos e bancada, lavar com bastante água corrente.
- Eliminar as soluções dos poços primeiramente em frasco com hipoclorito. Ao eliminar no sistema de esgoto deixar escorrer bastante água pelo sistema.
- Manter longe de crianças e animais domésticos.

XIII. APRESENTAÇÃO

Components	Kit com 12 testes (50CLC201)	Kit com 120 testes (50CLC210)
A. Cartão ImmunoComb	1	10
B. Placa reveladora	1	10
C. Pinça de plástico	1	1
D. Escala de cores CombScale	1	1
E. Tubo com 12 microcapilares e um pistão	1	Incluído mediante solicitação.
Instruções de uso	1	1



VX. REFERÊNCIAS

- 1). Noel R. (2002). An overview of canine leptospirosis. <http://www.vet.uga.edu/vpp/clerk/noel/>
- 2). McDonough, P.L. (2001). Leptospirosis in dogs current status, Recent Advances in Canine Infectious Diseases. *International Veterinary Information Services*, July. <http://www.ivis.org>
- 3). Levett, P. Leptospirosis. (2001). *Clinical Microbial Reviews*, **14(2)**, 296-326.