

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



Biogal Galed Labs.

Proprietário e Fabricante: Biogal Galed Laboratories Acs. 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 Mandaguari, 1752 - Pinhais - Paraná-Brasil Fone: (41)3779-2130

e-mail: info@vpdiagnostico.com.br

Licenciado no Ministério da Agricultura sob nº 10.410/2021 10/03/2021

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 *Leptospira spp* 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 em hospedeiros na natureza, em animais selvagens e domésticos, infectados de forma subclínica. 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 se multiplica fora de um hospedeiro, e sua sobrevivência depende das condições ambientais em que se encontram. As leptospiros são sensíveis a 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 de IgG anti-*Leptospira*, contidos no sangue do paciente canino, são obtidos em torno de 25 minutos.

IV. COMO FUNCIONA O IMMUNOCOMB?

- O kit contém dois componentes principais: um cartão de plástico em forma de pente e a placa de desenvolvimento.
- O Pente possui 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.
- Os antígenos das sorovares estão adsorvidos em um ponto na parte inferior de cada dente do pente. O ponto superior é a referência positiva (ver Item IX).
- 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 Item VI). 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 com um anticorpo IgG anti-cão, que ligam-se aos complexos antígeno-anticorpo .
- Após mais duas lavagens (linhas D & E), o pente é movido para o poço seguinte (linha F), onde 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 da leptospirose canina é amplamente baseado em sinais clínicos. O teste sorológico é útil para confirmação do diagnóstico. O teste de soroaglutinação microscópica (MAT) é o método padrão de laboratório para o diagnóstico sorológico da leptospirose. Sua utilização é indicada para a fase aguda, podendo, após 10 dias da infecção, dar resultado negativo. A técnica pode não detectar IgG (Langoni, et al 2002). 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 Canine Leptospira* é adequado para a detecção de níveis de anticorpos IgG na infecção com qualquer um dos seguintes sorovares: *canicola*, *icterohaemorrhagiae*, *grippotyphosa* e *pomona*. Pode dar resultado negativo ou suspeito até 7 dias da infecção, por detectar anticorpos IgG, dando reação positiva após este tempo e em casos considerados crônicos, quando a *Leptospira* sai da corrente sanguínea e se aloja em órgãos como o rim, por muitos meses. Cães recentemente vacinados podem dar reação positiva no teste.

VI. TÉCNICA PASSO A PASSO

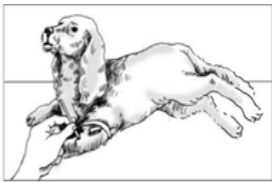
Para melhores resultados realizar o teste em temperatura entre 20-25 °C

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 25 minutos a 37 °C.

OBS.: *Pode-se utilizar placa aquecedora, para aquecimento, das soluções do teste.*

Contatar info@vpdiagnostico.com.br

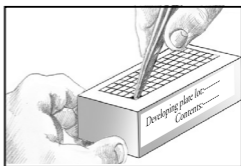
(1) Obtenha a amostra de sangue do cão. Para amostras de sangue total, o sangue deve ser coletado em tubo com anticoagulante EDTA ou heparina.



Recomenda-se a utilização de amostras frescas

- Armazenar sangue inteiro a 2-8°C, se o teste for realizado no prazo de 1 dia da colheita. Não congelar amostras de sangue total.
- Armazenar amostra de soro e plasma a 2-8°C se o teste for executado dentro de 3 dias da coleta. Se o teste for realizado após 3 dias da coleta, congelar as amostras a -20°C ou mais.
- Deixar as amostras à temperatura ambiente e misturar bem antes do teste.

(2) Usar a micropipeta. Para amostra de sangue total, pipetar 10 μL (pipetar 2 vezes 5 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 no poço da linha A.

Para testar soro/plasma, usar **5 µL**.

Para testar sangue total, use **10 µL***.

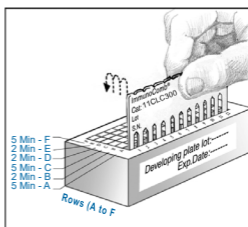
Misturar a amostra no poço com movimentos de subida e descida do êmbolo da micropipeta.

Evite promover a contaminação cruzada entre as soluções.

***Para sangue total: se for usada a pipeta fornecida com o kit, deposite duas vezes uma amostra de 5 µL (totalizando 10 µL) no mesmo poço "A".**

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

(5) Remover o pente do envelope de alumínio. Não tocar nos dentes do pente. Para testar menos do que 12 amostras, destacar a quantidade desejada de dentes.



Nota: A homogeneização durante a incubação, de acordo com as instruções, é crucial para a obtenção de resultados válidos.

****Para melhorar a homogeneização, mova o pente para cima e para baixo de 3 a 4 vezes. Durante a incubação, repetir este processo de 2 a 3 vezes.**

Antes de transferir o pente, de um poço para outro, retirar o excesso de líquido da(s) ponta(s), encostando em papel absorvente.

■ Inserir o pente no poço da linha A e incubar por 5 minutos. Misturar como descrito acima.**

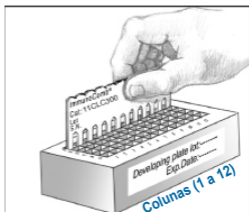
■ Usar a pinça fornecida para abrir o poço da linha B. Retirar o excesso de líquido, transferir para o poço da linha B e incubar por 2 minutos. Misturar como descrito acima.**

■ Transferir para o poço na linha C. Retirar o excesso de líquido e inserir o pente por 5 minutos. Misturar como descrito acima.**

■ Transferir para o poço na linha D. Retirar o excesso de líquido e inserir o pente por 2 minutos. Misturar como descrito acima.**

■ Transferir para o poço na linha E. Retirar o excesso de líquido e inserir o pente por 2 minutos. Misturar como descrito acima.**

■ Transferir para o poço na linha F. Retirar o excesso de líquido e inserir o pente por 5 minutos. Misturar como descrito acima.**



■ Uma vez completado o desenvolvimento da cor no poço da linha F, transferir novamente o pente para o poço da linha E por 2 minutos para a fixação da cor. Remover o pente, retirar o excesso de líquido das pontas e deixar secar, deitado, com a parte da frente para cima, por 5 minutos antes da leitura dos resultados. Nunca secar 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)

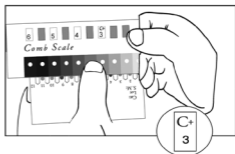
■ O ponto inferior do dente dá o título de anticorpos IgG anti-Leptospira dos sorovares, na amostra testada. Compare a tonalidade deste ponto (inferior) com o ponto de Referência Positiva (superior). Uma tonalidade visivelmente mais escura do ponto inferior (Leptospira), em relação ao ponto Referência Positiva, indica uma resposta positiva.

- Tonalidade mais fraca do que a cor de Referência positiva indica um título baixo, sendo considerado o cão, como suspeito para Leptospirose.
- 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.

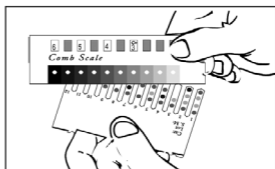
- Quando o pente estiver completamente seco, alinhar com a CombScale fornecido no kit. Encontrar o tom de roxo-cinza na CombScale que mais se aproxima do ponto de **Referência Positiva** (ponto superior). Deslizar a régua amarela até a marca C+ aparecer na janela, acima da cor que você encontrou.



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

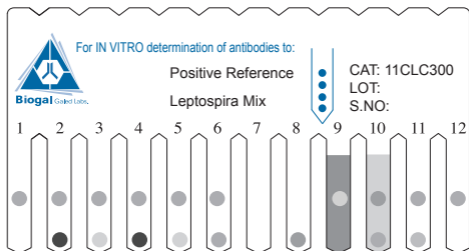
o tom de roxo-cinza no CombScale que mais se aproxima do ponto do resultado do teste desejado (o ponto inferior). O número que



aparece na janela acima é a pontuação CombScale (S0-S6). Repetir este passo com cada ponto de teste separadamente.

Outra forma de ler os resultados é utilizando a Leitora CombCam, especialmente desenvolvida para leitura do ImmunoComb. Para maiores informações contatar info@vpdiagnostico.com.br ou no site www.vpdiagnostico.com.br

IX. EXEMPLO DE TESTE



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> (suspeita)
4	≥S5	Reação fortemente positiva para <i>Leptospira</i>
5	S1-2	Reação fraca para <i>Leptospira</i> (suspeita)
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 (+) não 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 Galed pelo telefone: 972-4-9898605 / Fax: 972-4-9898690 e-mail: info@biogal.com - website: www.biogal.com

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.

XI. COMPONENTES DO KIT

Components	12 Test Kit (50CLC201)	120 Test Kit (50CLC210)
A. Cartão ImmunoComb (embalado em envelope de alumínio)	1	10
B. Placa reveladora	1	10
C. Pinça	1	1
D. Escala de cores C (combscale)	1	1
E. Micropipeta para 5 µL	1	Não incluído*
F. Ponteiras capacidade 10 µL	15	Não incluído*
Instruções de uso	1	1



XII. 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) Langoni H., Pimentel V.L., Silva A.V., Lucheis S.B. & Denardi M.B. 2002. Avaliação da dinâmica de anticorpos pós-vacinais contra *Leptospira* spp. em cães vacinados pela prova de SAM. *Ars Vet.* 18:54-61.
- 4) Levett, P. Leptospirosis. (2001). *Clinical Microbial Reviews*, 14(2), 296-326.

Biogal's
ImmunoComb