

**PASSO 1**

- Estabilize a temperatura da sala teste a (20 - 25 ° C) com termômetro.
- Retire o kit da geladeira e os componentes da embalagem.
- Deixe a placa de reação, o pente e a amostra em temperatura de (20 – 25 °C) por 90 minutos.
- E a placa de reação mais 10 minutos na placa de aquecimento (caso tenha).

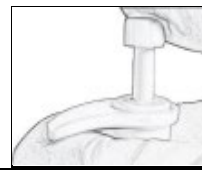
**PASSO 2**

- Inverta a placa de reação e a amostra por 10 vezes.



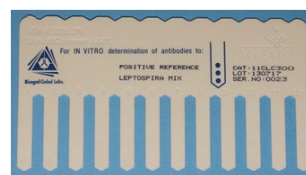
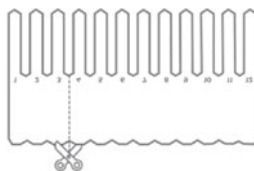
**PASSO 3**

- Perfure o(s) lacre(s) do(s) poço(s) da linha A, com a pinça. Um poço para cada amostra.
- Armazenagem da amostra: Sangue 2-8°C até 1 dia pós coleta, soro/plasma 2-8°C até 3 dias pós coleta. Se o teste for realizado após 3 dias da coleta, congelar as amostras a -20°C ou mais.
- Pipete para o poço linha A: **Soro ou plasma = 5 uL** ou **sangue total = 10 uL** .
- Movimente o embolo da pipeta, para cima e para baixo, várias vezes.



**PASSO 4**

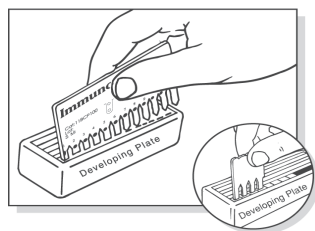
**OBS.- Retire o pente da embalagem, sem tocar na ponta**



pontos com adsorção de antígenos controle positivo  
pontos com adsorção de antígenos das sorovares

- Com tesoura, destaque do pente a quantidade exata de dentes conforme quantidade de amostras a serem testadas. (1 amostra/1 dente). (ver figura)
- Guarde cuidadosamente o restante do pente na embalagem com o sachê de sílica-gel.

Introduza o(s) dente(s) no (s) poço(s) da linha A.



Linha	Tempo de incubação (minutos)
A	5'

- Minutos 0, 2, 3, 4, 5 movimento o pente, para cima e para baixo, 3-4 vezes.

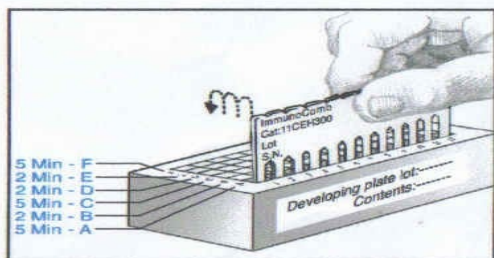
### PASSO 5

- Perfure o(s) poço(s) da linha B.
- Retire o pente do poço A.
- Encoste a ponta do dente em papel absorvente, para retirar o excesso de fluidos dos dentes.
- Introduza o(s) dente(s) no poço B.

Linha	Tempo de incubação (minutos)
B	2'

- Minutos 0, 1, 2 movimento o pente, para cima e para baixo, 3-4 vezes.

### PASSO 6

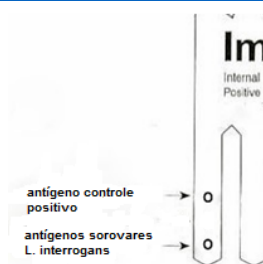
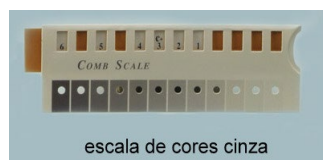
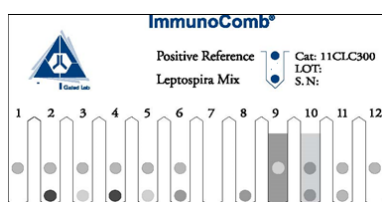


- Repita os passos anteriores para os poços das linhas C, D, E, F e E. Observe o tempo em cada poço e o movimento do dente (tabela abaixo)

	Linha	Tempo de incubação (minutos)	Movimentar o pente nos tempos (minutos)
Amostra	A	5'	0, 2, 3, 4, 5
Lavagem	B	2'	0,1,2
Conjugado	C	5'	0, 2, 3, 4, 5
Lavagem	D	2'	0,1,2
Lavagem	E	2'	0,1,2
Cromógeno	F	5'	0, 2, 3, 4, 5
lavagem	Volta ao E	2'	0,1,2
<b>Tempo Total</b>		<b>23'</b>	

## PASSO 7

- Após a última incubação no poço E, retire o pente, encoste a ponta em papel absorvente, deixe o pente secando com a frente para cima.
- Leia os resultados quando o pente estiver completamente seco (utilize a escala de cores – CombScale – disponível no kit).
- Ou utilize a leitora CombCam (para informações acesse <https://vpdiagnostico.shop/loja/produto/combcam/>)



## PASSO 8 – RESULTADO

SCORES	RESULTADO	RECOMENDAÇÕES
<b>S0</b>	Negativo	Com sintomas* Repetir o teste em 5 dias
<b>S1 / 1:100</b>	Fraco Positivo (suspeito)	Com sintomas* Repetir o teste em 5 dias
<b>S2 / 1:200</b>	Fraco Positivo (suspeito)	Repetir o teste em 5 dias** Verificar histórico vacinal***
<b>S3 / 1:400</b>	Positivo	Com sintomas - infecção.  Sem sintomas - verificar histórico vacinal***  Avaliar hemograma, bioquímica sanguínea e urinálise****
<b>S4 / 1:800</b>	Positivo	
<b>S5 / 1:1600</b>	Fortemente Positivo	
<b>S6 / 1:3200</b>	Fortemente Positivo	

\*Os sinais clínicos da leptospirose canina dependem de fatores como: idade, estado imunológico e virulência do sorovar. As formas menos graves evoluem com: febre, anorexia, vômito, desidratação e apatia; nos casos mais graves pode-se observar: anorexia, vômito, letargia, febre, dor abdominal, dispneia, taquipneia, icterícia, oligúria, anúria e uveíte.

\*\* Ao proceder a repetição do teste, caso ocorra um aumento, no score S3, animal com sintomas e sem histórico de vacinação é indicativo de infecção. A resposta imunológica humoral é composta por 2 classes de imunoglobulinas: IgM e IgG. A IgM é produzida logo após a infecção (infecção aguda). Os

anticorpos IgG podem ser detectados 7 dias após a infecção inicial e perduram nos casos crônicos. A leptospirose pode ser intermitente e durar meses. Esta é a fase em que a imunidade é caracterizada pela formação crescente de anticorpos IgG com estabelecimento das leptospirosas em locais de difícil acesso aos mesmos.

\*\*\*Na avaliação sorológica é importante questionar o histórico vacinal contra leptospirose, pois amostras de cães vacinados recentemente podem apresentar quantidade de anticorpos reduzida, porém, caso tenham contato com a leptospirose, (roedores ou outros animais infectados) a quantidade de anticorpos pode elevar-se. Normalmente a quantidade de anticorpos vacinais é mais baixa, quando comparados com os anticorpos na infecção ativa pela leptospirose, e persistem por poucos meses após a vacinação. As vacinas contra a leptospirose são bacterinas (cultura morta), por isso, a imunidade tem pequena duração.

\*\*\*\*A forma crônica normalmente não é aparente, levando à insuficiência renal crônica e hepática. Avaliar hemograma, bioquímica sanguínea e urinálise, juntamente com a sorologia para Leptospirose.

## PASSO 9 – INFORMAÇÕES

- 1- **O kit Canine Leptospira determina os títulos de anticorpos** de cães para diferentes sorovares patogênicos de *Leptospira interrogans*. *L. icterohaemorrhagiae* (copenhageni e RGA), *L. canicola*, *L. pomona* e *L. grippityphosa*. Um resultado positivo indica infecção atual.
- 2- **Pode ocorrer resultado negativo para a Leptospirose**, devido a que o cão está infectado com uma sorovar que não tenha reação cruzada com as sorovares que compõem o kit.
- 3- **Várias Sorovares tem reação cruzada entre si, como:** *L. australis*, *L. grippityphosa*, *L. canicola*- Sorovar (ou variante sorológica) corresponde a um grupo de leptospirosas com reatividade a anticorpos semelhante. Um sorogrupo é um conjunto de sorovares que possuem carboidratos em comum e, portanto, podem apresentar reatividade cruzada em métodos diagnósticos que envolvem anticorpos.
- 4- **Com o Kit ImmunoComb® Leptospira IgG, pode ocorrer diagnóstico** cães em estado crônico, com titulação reduzida. Por exemplo: Cães portadores da sorovar *L. canicola*, podem secretar leptospirosas na urina com títulos sorológicos menores que 1:100
- 5- **Vacinação recente, cerca de 30 a 60 dias**, e teve contato com a leptospirose, o título vacinal IgG pode elevar-se.
- 6- **Verificar se o soro está icterico.** Este é um sinal indicativo de leptospirose.
- 7- **SINAIS CLÍNICOS: A leptospirose canina se apresenta** como infecção aguda do rim e do fígado e até mesmo como uma septicemia. A doença renal crônica é uma manifestação comum de infecção. Abortos podem ocorrer em cadelas grávidas. A prevalência da leptospirose em cães pode estar subestimada devido à infecção assintomática.
- 8- **DIAGNÓSTICO: O diagnóstico da Leptospira canina é baseado** em sinais clínicos. O teste sorológico é útil para estabelecer o diagnóstico. O teste ImmunoComb, baseado na tecnologia “dot”-ELISA, detecta o anticorpo IgG contra a *Leptospira*,
- 9- **Diferentes sorovares de Leptospira interrogans são mantidos** na natureza em numerosos reservatórios de animais selvagens e domésticos infectados subclínicamente. Estes hospedeiros são uma fonte de infecção para humanos e outros hospedeiros acidentais.
- 10- **A infecção ocorre por contato direto com urina contaminada.** A infecção indireta também é possível através da exposição a água, vegetação, solo ou alimentos contaminados.
- 11- **Na tentativa de controlar a doença, programas de vacinação** foram instituídos. No entanto, a duração da imunidade alcançada é muito curta (6-12 meses).