**LEISHMANIOSE
VISCERAL
CANINA**

**MANUAL
DE
COLETA E
ENVIO DE
AMOSTRAS
PARA
EXAMES**

Elaboração

Marcella Kelvya Pierre
Denise Maria B. Bertollo
Helena H. Taniguchi
Roberto M. Hiramoto

Colaboração

Juliana Kindler Figueiredo

**Instituto Adolfo Lutz - São José do Rio Preto
2018**

Apresentação

Este manual tem como objetivo servir de fonte de informação, orientando os Médicos Veterinários que atuam no campo sobre os aspectos gerais da Leishmaniose Visceral Canina (LVC), procedimentos de coleta, remessa e envio de materiais biológicos para o laboratório.

Atualmente, além de uma necessidade técnica os exames constituem uma ferramenta importante como meio comprobatório de procedimentos clínicos, diagnóstico, prognóstico e o acompanhamento terapêutico corretos dos animais.

Diversos fatores podem interferir no resultado dos exames, sendo que aproximadamente 70% ocorrem na fase pré-analítica, ou seja, ligados à coleta e conservação da amostra biológica (BÚRIGO).

Portanto a obtenção de amostras de boa qualidade, sua conservação e o envio adequado em tempo hábil são determinantes para a confirmação e complementaridades do diagnóstico da LVC.

ÍNDICE

Aspectos gerais da Leishmaniose Visceral (LV)	1
Agente etiológico e ciclo evolutivo	1
Agente transmissor (Vetor)	1
Reservatório	2
Modo de transmissão	2
Período de incubação e Suscetibilidade no Cão	2
Aspectos clínicos do Cão	2
Diagnóstico laboratorial	3
Diagnostico sorológico	3
Diagnostico parasitológico	4
Diagnostico de isolamento em cultura (in vitro) e molecular (PCR)	4
Tratamento	5
Critérios gerais	6
Conheça a classificação do seu município	6
Tipos de inquérito e demanda espontânea	7
Requisição (Boletim de Coleta Canina)	9
Exames realizados pelo IAL-S. J. Rio Preto	9
Tipo de amostra para cada exame	10
Classificação das amostras	10
Especificações dos materiais utilizados	12
Coleta	13
Preparo do material de coleta de soro	13
Preparo do material de coleta da lâmina	13
Preparo do material de coleta de biópsia	13
Variáveis pré-analíticas	14
Exemplos de erros pré-analíticos	14
Identificação das amostras	16
Soro e biopsias	16
Lâmina	17
Etapas para o transporte	17
Soro e biopsias	17
Lâmina	18
Especificações da caixa de transporte	19
Guia prático para transporte de amostras	19
Teste Rápido DPP®	21
Protocolo de realização	21
Guia rápido do Teste Rápido DPP®	23
Leitura e interpretação dos resultados	24
Escala visual para interpretação dos resultados	25
Considerações do Teste Rápido DPP®	26
Resultados de exames	26
Horário de atendimento	27
Referências	28
ANEXOS 1 e 2	30

Aspectos gerais da Leishmaniose Visceral (LV)

A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose causada por um protozoário do gênero *Leishmania* e transmitida pelo inseto, flebotomíneo, aos animais e ao infectar humanos considera-se uma antroponose. Atualmente, está entre as seis endemias prioritárias no mundo com uma alta incidência e uma alta taxa de letalidade (TDR/WHO).

Endêmica em 88 países na Ásia, Europa, no Oriente Médio, na África e nas Américas, na América Latina foi descrita em pelo menos 12 países, sendo que 90% dos casos ocorrem no Brasil (Miles et al. 1999, TDR/WHO).

O Brasil vivencia uma situação em que a doença de início silvestre e rural, vem se estendendo por zonas periurbanas e urbanas de grandes centros o que determina as ações direcionadas pelo Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (SÃO PAULO, 2006).

Agente etiológico e ciclo evolutivo

O agente etiológico da LV é o protozoário da família *Trypanosomatidae*, gênero *Leishmania* e a espécie, comumente envolvida na transmissão, é a *Leishmania infantum chagasi*, um parasita intracelular obrigatório, com uma forma flagelada ou promastigota presente no tubo digestivo do flebotomíneo transmissor e a outra forma aflagelada ou amastigota, encontrada nos tecidos do hospedeiro vertebrado (BRASIL 2014).

O ciclo biológico envolve como vetor o flebotomíneo fêmea, hematófaga obrigatória, que realiza o repasto sanguíneo. No vertebrado infectado a fêmea ingere a forma parasitária amastigota e em seu tubo digestivo transformam-se na forma infectante, promastigota que se multiplica e são inoculadas em um novo repasto sanguíneo em um hospedeiro não infectado (ser humano ou outro reservatório) (SÃO PAULO, 2006).

Agente transmissor (Vetor)

No Brasil a principal espécie de flebotomíneo envolvida com a transmissão da LV é o *Lutzomyia longipalpis*, recentemente no estado do Mato Grosso a espécie *Lutzomyia cruzi* foi descrita como um vetor (BRASIL 2014).

Os *L. longipalpis* são pequenos, de cor palha ou amarelada, o voo em pequenos saltos e no pouso, as asas permanecem entreabertas. As fêmeas mantem o ciclo em ambiente com

matéria orgânica e realizam o repasto sanguíneo, ou seja, alimentam-se pela picada nos reservatórios no período crepuscular e noturno (BRASIL, 2014. SÃO PAULO, 2006).

Reservatório

Os cães (*Canis familiaris*) são considerados a principal fonte de infecção de LV nas áreas endêmicas devido principalmente ao processo de urbanização da doença. No ambiente silvestre os reservatórios são raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e marsupiais (*Didelphis albiventris*) (BRASIL 2014).

A presença de casos caninos tem sido mais prevalente do que o humano, quando há surto de infecção humana, este comumente vai estar associada, à presença de cães soropositivos (BRASIL 2014).

Modo de transmissão

No Brasil, a forma de transmissão se dá pela picada dos vetores, *L. longipalpis* ou *L. cruzi*, infectados pela *Leishmania infantum chagasi*. Não ocorre transmissão direta da LV de pessoa a pessoa e a transmissão ocorre enquanto houver parasitismo na pele ou no sangue periférico do hospedeiro (BRASIL 2014).

Período de incubação e Suscetibilidade no Cão

Na infecção do animal não foi verificada uma predisposição racial, sexual ou etária relacionada; o período de incubação é bastante variável entre 3 meses a vários anos, com média aparente de 3 a 7 meses (BRASIL, 2014).

Nos casos caninos o aparecimento de sintomas, nas formas aguda ou crônica, está relacionado diretamente com a imunocompetência e o nível de parasitismo do animal. Há cães infectados que permanecem assintomáticos por longos períodos, no Brasil, uma parcela de 40 a 60% pode permanecer em fase latente ou evoluir para cura espontânea (BRASIL 2014).

Aspectos clínicos do Cão

É uma doença de evolução lenta e início insidioso. Pode-se observar que a intensidade do parasitismo, algumas vezes, não está diretamente proporcional aos sinais e sintomas da LVC, tendo casos com sintomatologia leve e infecção intensa (SÃO PAULO, 2006).

O quadro clínico canino se demonstra principalmente nas alterações cutâneas como: pelo opaco, descamações nas orelhas, focinho, cauda e nas articulações; pode ocorrer também a perda motora parcial dos membros posteriores; no início uma pequena perda de peso e logo a presença de adenopatia linfóide, onicogribose, ceratoconjutivite, além de sintomas mais gerais como: vômito, diarreia, coriza (BRASIL, 2006; BRASIL, 2014).

Diagnóstico laboratorial

Para o diagnóstico eficiente da LV é primordial que as informações estejam baseadas: nos sinais clínicos do cão, em dados epidemiológicos da região e no diagnóstico laboratorial de referência, tanto para humanos quanto para os cães (BRASIL, 2006).

De uma maneira geral o diagnóstico da LV apresenta dificuldades resumidas em três fatores: I – variedade de sinais clínicos semelhantes às observadas em outras enfermidades infecciosas; II – alterações histopatológicas inespecíficas e III – inexistência de um teste diagnóstico 100% específico e sensível (BRASIL 2014).

O diagnóstico da LV canina e o da doença humana são semelhantes, podendo ser fundamentado nos testes sorológicos, parasitológico e molecular para confirmação de um caso. Os métodos utilizados e a sequência de exames a serem realizados dependerão da provável área de transmissão do cão (BRASIL 2014).

Diagnóstico sorológico

O protocolo de diagnóstico da LV canina utilizado era o teste ELISA para a triagem e a RIFI para a confirmação dos cães reagentes. Atualmente por meio da Nota Técnica Conjunta 01/2011, o protocolo de diagnóstico da LVC utilizado é TR DPP® LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA /Biomanguinhos como teste de triagem e o ELISA como teste confirmatório dos cães reagentes (BRASIL, 2006). TR DPP® Dual Path Platform, (Biomanguinhos/FIOCRUZ) para o diagnóstico da LVC utiliza uma proteína recombinante rk (antígenos rK9, rK39 e rK26) como antígeno de reação de dupla corrida. De acordo com Biomanguinhos o teste possui uma tecnologia de alta sensibilidade, o que agrega precisão ao diagnóstico da leishmaniose visceral canina em sangue e soro. Por ser um teste de triagem, permite que apenas os casos positivos sejam levados para confirmação, os resultados são expressos de acordo com a leitura das bandas, vide bula (FUNED, 2015).

A partir da coleta do soro e com resultado TR DPP reagente é realizado o ensaio imunoenzimático (ELISA) para confirmação do caso. O ELISA consiste na reação de anticorpos presentes no soro com antígenos solúveis e purificados de *Leishmania* adsorvidos e fixados em uma microplaca (BRASIL, 2014).

O soro límpido e ausente de hemólise é diluído e adicionado na microplaca, e se houver anticorpos presentes no soro do cão estes vão se fixar no fundo da microplaca fazendo uma ligação (antígeno-anticorpo) o que gera a reação de um produto colorido e uma densidade ótica.

O valor da densidade é medido e comparado aos controles indicando um ponto de corte (Cut-Off); se a amostra gera uma densidade superior ao Cut-Off o resultado é expresso como reagente e quando há uma baixa densidade da amostra, abaixo ao Cut-Off o resultado é expresso como não reagente (BRASIL, 2014).

Diagnostico parasitológico

Trata-se de uma pesquisa direta que permite visualizar o parasita na forma amastigota no esfregaço na lâmina corada com Giemsa e com auxílio do microscópio. O resultado positivo para *Leishmania spp* quando encontrada a forma e negativo na ausência da forma amastigota no material biológico enviado (BRASIL, 2006).

A amostra utilizada para o exame parasitológico consiste de punção de linfonodo e/ou medula óssea e biópsia ou escarificação ou imprint de pele com lesão. Este método apresenta especificidade de aproximadamente 100% e a sensibilidade em 80%, esta é a taxa de sensibilidade em cães sintomáticos que dependem do grau de parasitemia, tipo de material coletado e qualidade de coleta e do processo de leitura da lâmina, a sensibilidade vai diminuindo para cães assintomáticos (BRASIL, 2014).

Diagnostico de isolamento em cultura (in vitro) e molecular (PCR)

Na rotina, a cultura e o PCR das amostras de cães são pouco utilizados, porém estes métodos acrescentam sensibilidade quando utilizado juntamente com os métodos parasitológicos tradicionais; o uso destes dois métodos pode ser utilizado para investigação de novos casos autóctones e para fins de pesquisa no laboratório de saúde pública (BRASIL, 2007).

No isolamento em cultura, as amostras de biopsia de fígado, baço e linfonodo que estão em solução salina estéril com gentamicina são trituradas e semeadas em meio de cultura para o crescimento de *Leishmania*, é acrescido glicerol caso não for semeado no primeiro dia. A amostra deve ser mantida com glicerol em geladeira por 24 horas após em freezer por 24 horas e por última etapa em freezer -70° C para manter o parasita (SÃO PAULO, 2006).

As amostras são semeadas em meio de cultura e mantidas em estufa, semanalmente são observadas em microscópio ótico por até 4 semanas. O resultado negativo (ausência da forma promastigota) é liberado ao final deste período e quando há crescimento o resultado positivo será liberado assim que confirmado a forma promastigota (SÃO PAULO, 2006).

O método de amplificação do DNA (PCR) do parasita constitui-se em uma nova perspectiva para o diagnóstico da LV, pois apresenta 94% de sensibilidade. Entretanto, os seus resultados dependem de algumas variáveis envolvidas, como: área endêmica; o tipo de amostra; o alvo do DNA utilizado para amplificação; o método de extração do DNA, etc. atualmente este teste pode ser utilizado para pesquisa de novos casos autóctones e investigação de casos suspeitos, segundo as variáveis (BRASIL, 2006).

Tratamento

O tratamento de cães soropositivos não é uma medida recomendada no âmbito de saúde pública, pois não diminui a importância do cão como reservatório do parasito (BRASIL, 2014).

Por meio da Nota Técnica nº 11/2016/CPV/DFIP/SDA/GM/MAPA o MS e o MAPA autorizaram o medicamento Milteforan®, princípio ativo miltefosina, para tratamento de cães e não utilizada em tratamento humano no Brasil. A Nota deixa claro que se trata de uma medida única, exclusiva e individual de escolha do proprietário e não uma medida de saúde pública para controle da doença. O laboratório Virbac declarou que para um controle inicial do medicamento e onde está sendo utilizado, criou um sistema de rastreabilidade para comercialização desde a aquisição pelo distribuidor, no exterior, até a venda ao cliente no Brasil (CFMV, 2017).

Critérios gerais

Conheça a classificação do seu município

Para início de medidas enfáticas e direcionadas para o controle da LVC se informe sobre a classificação do seu município e da sua região (conf. Figura 1), disponível no BEPA (Boletim Epidemiológico Paulista).

A classificação periódica dos municípios estará disponível nos sites: www.sucen.sp.gov.br e www.cve.saude.sp.gov.br.

Figura 1: Classificação de áreas. Fonte: Brasil, 2006.

- Áreas de transmissão: entende-se como área de transmissão o setor, o conjunto de setores ou o município onde esteja ocorrendo a transmissão de LV.
- Área sem casos ou silenciosa: municípios sem registro de transmissão de casos autóctones de leishmaniose visceral humana ou canina.

- Área com casos: municípios com registro de pelo menos um caso autóctone de leishmaniose visceral humana ou canina.

Tipos de inquérito e demanda espontânea

Uma vez confirmada a espécie *L. infantum* em cão suspeito sem deslocamento, os inquéritos consistem em uma busca ativa de cães sintomáticos e assintomáticos para coleta de material sorológico com a finalidade de avaliar a prevalência canina em uma área e desencadear medidas (ações de vigilância, busca do vetor).

- I. Inquérito amostral: O inquérito poderá ser realizado em todo ou em parte do município dependendo do tamanho do mesmo e da distribuição do vetor, quando o *L. longipalpis* for detectado. Avaliar a taxa de prevalência e realizar medidas de vigilância.
- II. Inquérito sorológico censitário: tem como objetivo o controle através da identificação de cães infectados para a realização da eutanásia e a avaliação da taxa de prevalência nos municípios de transmissão.
- III. Demanda espontânea: Qualquer cão com quadro clínico suspeito, que o proprietário busca o serviço público para coleta de material e realização do teste. Se confirmada a sorologia reagente de cão sem deslocamento, iniciar investigação (conf. Figura 2).

Obs.: A prática da eutanásia canina é recomendada a todos os animais sororreagentes e/ou parasitológico positivo. Para a realização da eutanásia, deve-se ter como base a Resolução n.º 714, de 20 de junho de 2002, do Conselho Federal de Medicina Veterinária BRASIL, 2006.

Figura 2: Algoritmo de confirmação de 1º caso autóctone de leishmaniose visceral canina. Fonte: Memorando 480.2013 - CGDT;DEVIT;SVS-MS, adaptado por Inamura MK, Instituto Adolfo Lutz. SP.

Requisição (Boletim de Coleta Canina)

Antes de iniciar a coleta, verificar se o boletim de coleta canina (Bolcão) (Figura 3) está corretamente preenchido e os tubos identificados e organizados na mesma ordem, com letra legível, assinados e carimbados. Os boletins de coleta disponíveis são 'Bolcão 3' (Anexo 1) para coleta de inquérito e o 'Bolcão 6' (Anexo 2) para coleta de demanda espontânea.

Bolcão 6

Bolcão 3

Figura 3: Boletins de coleta para LVC.

Exames realizados pelo IAL-S. J. Rio Preto

- **Testes Sorológicos:** Teste rápido por Imunocromatografia (TR DPP) e Ensaio Imunoenzimático (ELISA).
- **Exame Parasitológico direto.**
- **Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)** -Envio para o IAL Central-.
- **Cultura de *Leishmania spp*** (in vitro).

Figura 4: Sequência de exames realizados pelo IAL.

Tipo de amostra para cada exame

- ♣ ELISA e Teste Rápido: 1 a 3 ml de **soro**;
- ♣ Parasitológico Direto: Lâminas com esfregaço de aspirado de linfonodo ou medula óssea. Caso haja lesão coletar uma lâmina com “imprint”;
- ♣ PCR: Tubos estéreis de salina com gentamicina (solicitar e retirar no laboratório) coletar aspirado de linfonodo ou medula óssea e biópsias de baço, fígado e linfonodo – somente com consulta prévia e autorização do laboratório.
- ♣ Cultura de *Leishmania spp.*: Tubos estéreis com salina estéril e gentamicina (solicitar e retirar no laboratório) coletar aspirado de linfonodo ou medula óssea e se o animal for eutanasiado coletar biópsias de baço, (fígado e linfonodo) - somente com consulta prévia e autorização do laboratório.

Classificação das amostras

Para a realização do diagnóstico da LVC as amostras devem seguir os critérios laboratoriais.

- Animal para coleta de Demanda Espontânea.

Caso Canino Suspeito: Todo cão proveniente de áreas endêmicas ou não, que apresente quadro clínico compatível de leishmaniose visceral canina (LVC) (febre irregular, apatia, emagrecimento, descamação e úlceras na pele, em geral no focinho, orelhas e

extremidades, conjuntivite, paresia do trem posterior, e crescimento exagerado das unhas). Sem a confirmação de um diagnóstico laboratorial ou para confirmação em laboratório de referência. O cão sem deslocamento será feito a identificação da espécie (*Leishmania infantum*); com coleta de soro, lâmina de aspirado de linfonodo e somente após confirmação sorológica e dentro dos critérios, poderá ser realizada a eutanásia do animal e a coleta das biopsias de fígado, baço e linfonodo.

Envio de material biológico:

- ➡ Boletim de coleta 6 - carimbar e assinar -,
- ➡ Soro e lâminas para diagnostico,
- ➡ Após sorologia reagente, solicitar a coleta de biopsia para cultura e PCR,
- ➡ Encaminhar a amostra devidamente identificada e acondicionada.

Tempo para envio: Máximo 12h após a coleta para soro e lâminas.
Imediatamente para cultura e PCR.

➤ Animal para coleta Inquérito.

Caso Canino Confirmado: Onde houve cão com manifestações clínicas compatíveis com LVC e sem deslocamento e que apresente teste sorológico reagente e/ou exame parasitológico positivo com testes moleculares e cultura positiva. Portanto a mudança na classificação do município com cão autóctone, vetor ou caso humano. Somente realizada coleta de soro e se necessário, investigação consultar o laboratório para outra forma de diagnostico (lâmina ou biopsia).

Envio de soro:

- ➡ Solicitar a realização do teste rápido pelo município,
- ➡ Boletim de coleta 3 - carimbar e assinar-,
- ➡ As amostras positivas devem ser enviadas devidamente separadas e identificadas com 'R' ou '+' na tampa do tubo.
- ➡ As amostras negativas devem ser armazenadas em freezer (por no mínimo 6 meses) no município ou no laboratório (IAL) com solicitação prévia e disponibilidade,

Tempo de envio: Semanalmente, soro separado do sangue total.

Especificações dos materiais utilizados

Tubos de coleta
Tubo de coleta vácuo gel e separador amarelo - Biocon 2ml.
		Tubo Seco para Coleta de Sangue 10ml BD.
Tubo vácuo coleta sangue vermelho seco - BD 4ml
		Tubo vermelho siliconizado vidro livre de ativador coleta de sangue - Labor Import 10ml ou 4ml.
Tubo de Coleta de Sangue a Vácuo Ativador de Coágulo 13x75mm - 4mL Modelo K50-204\$ OLEN
		Tubo de Coleta de Sangue a Vácuo Ativador de Coágulo + Gel - 13x75mm - 3,5mL Modelo K50-335\$ - OLEN

Tubos de armazenamento	Caixas de armazenamento

Tubo criogênico, em polipropileno. 2ml.

Tubo criogênico, rosca externa polipropileno 2ml.	Caixa em fibra de papelão para 100 tubos de 1,5 a 2,0 ml.

Tubo Eppendorf safe-lock - Eppendorf Quality 2ml	Rack de plástico com tampa para 100 amostras.

Porta lâminas - Suporte de lâmina

Porta-lâminas, tampa por rosca (cuba vertical com ranhuras para 3 lâminas em polipropileno).

Caixa porta lâminas em polipropileno rígido, para 100 lâminas.

Estojo porta lâminas com etiqueta para 3 lâminas e tampa.

Figura 5: Exemplos dos materiais solicitados para coleta e armazenamento e suas especificações.

Coleta

A qualidade da amostra recebida é essencial para o diagnóstico. A coleta e o transporte inadequados dificultam ou até inviabilizam o isolamento do agente etiológico e, por consequência, o diagnóstico da enfermidade.

Ao iniciar o procedimento, deve-se organizar seu material de acordo com as amostras a serem coletadas, conferir todos os dados da requisição e identificação da amostra.

Atenção: Utilizar Equipamentos de Proteção Individual - EPI, e ter Equipamentos de Proteção Coletiva - EPC à disposição!

Preparo do material de coleta de soro

- Verificar o tubo a ser utilizado: sem anticoagulante ou com ativador de coágulo;
- O ideal é o animal estar em jejum por 12 horas, para evitar que estas amostras apresentem lipemia;
- A lipemia pode causar hemólise e alterar os resultados dos exames;
- Informar o uso de medicamentos;
- Homogeneizar de forma correta (suave) e não agitar excessivamente a amostra;
- Não deixar o material em temperatura ambiente por muito tempo ou em altas temperaturas. Não congelar o sangue total;
- Não coloque o tubo em contato direto com o gelo no transporte.

Preparo do material de coleta da lâmina

- Usar seringa de 3 ou 5 ml com agulha de diâmetro 25x7 ou 25x8;
- Identificar lâmina com lápis preto;
- Aspirar material representativo, colocar na lâmina;
- Fixar as lâminas ao ar ambiente por 20 a 30 minutos e enviar ao laboratório em frasco porta-lâminas com Boletim.

Preparo do material de coleta de biópsia

- Retirar no laboratório os tubos estéreis de solução de salina estéril com gentamicina para coleta;

- Somente abrir os frascos no momento do uso;
- Acondicionar fragmentos cortados com no máximo 0,2 cm de espessura;
- Sempre enviar o material o material juntamente com as informações: Local onde foi retirado o material (fígado, baço e linfonodo) e nome do animal no tubo e enviar;

Variáveis pré-analíticas

O conhecimento das variáveis pré-analíticas que podem interferir nos resultados dos exames laboratoriais é fundamental na interpretação dos resultados. Sendo algumas listadas a baixo:

- ✚ Coleta inadequada;
- ✚ Manter o garrote prolongado;
- ✚ Stress do animal durante a coleta;
- ✚ Despejar o sangue coletado muito rápido no tubo;
- ✚ Identificação incorreta ou incompleta;
- ✚ Tubo inadequado para coleta (com anticoagulante);
- ✚ Volume insuficiente da amostra;
- ✚ Hemólise;
- ✚ Temperatura inadequada de armazenamento e transporte;
- ✚ Tempo de armazenamento prolongado;
- ✚ Contaminação da amostra;
- ✚ Alimentação do animal antes da colheita, provocando lipemia;
- ✚ Uso de caixa para transporte de material biológico incorreto;
- ✚ Medicação que o animal recebeu (vacina ou algum tratamento).

Exemplos de erros pré-analíticos

Figura 6: Casos de erros pré-analíticos que chegam ao laboratório.

Identificação das amostras

Soro e biopsias

Identificar os tubos com material biológico, para evitar o descarte da amostra ou a solicitação de uma nova coleta por falta de dados. Deve-se escrever pelo menos duas informações que identifiquem o cão (exemplo. Figura 7).

- No tubo: NOME DO CAO,
RA (NÚMERO DE IDENTIFICACAO) ou
NOME DO PROPRIETARIO;
- Utilizar caneta permanente de ponta fina e legível ou etiqueta própria para identificação;
- Não colar etiqueta de modo que não se consiga visualizar o soro no tubo, este excesso compromete a visibilidade do soro e a qualidade da pipetagem.

Figura 7: Exemplos de identificação correta e incorreta.

Lâmina

A identificação de cada amostra é fundamental para evitar que, não seja descartada por falta de informação e possa ser corretamente etiquetada.

- Identificar as lâminas antes da coleta com Lápis Preto (Conf. Figura 8),
- Colocar nome e RA do cão e se possível qual o material coletado.
- NUNCA escrever com caneta, pois a tinta sai no momento da coloração,
- Aguardar a secagem do material (aspecto seco) em temperatura ambiente,
- Colocar as lâminas no suporte,
- Não colocar em local refrigerado e úmido.

Figura 8: Material e forma de identificação em lâmina de vidro.

Etapas para o transporte

O Ministério da Saúde estabelece por meio da RDC Nº 20, DE 10 DE ABRIL DE 2014, a Resolução para o transporte de material biológico.

Soro e biopsias

- I. Separar uma caixa rígida de transporte (exemplo, Invicta®)
- II. Identificar os tubos, antes da coleta;
- III. Colocar as amostras na mesma ordem do boletim de coleta;
- IV. Colocar as amostras em caixa de transporte, isopor ou qualquer suporte que mantenha as amostras em posição vertical;

- V. Deixar as amostras em refrigerador (geladeira) até a montagem da caixa;
- VI. Colocar o gelo reciclável suficiente e evitar o contato direto do gelo com as amostras;
- VII. Transportar em caixa rígida identificada com símbolo de risco biológico na parte externa;
- VIII. Manter a temperatura de refrigeração entre 20 e 8 °C;
- IX. Colocar as amostras em caixas de transporte e vedar, para que não haja deslocamento,
- X. Utilizar jornal para preencher espaços vazios e evitar impacto durante o transporte,
- XI. Colocar as requisições correspondentes, devidamente preenchidas, dentro de um envelope ou saco plástico transparente;
- XII. Nunca colocar cubos de gelo soltos, para evitar o acúmulo de água;
- XIII. Não congelar as amostras, principalmente quando não separado o soro do sangue total para evitar hemólise.
- XIV. Não transportar material biológico em ambulância com pacientes.

Lâmina

- I. Separar uma caixa rígida de transporte (exemplo, Invicta®);
- II. Identificar as lâminas (antes da coleta);
- III. Colocar as requisições correspondentes, devidamente preenchidas, dentro de um envelope;
- IV. Deixar secar em temperatura ambiente;
- V. Não deixar uma lâmina grudar em outra;
- VI. Guarda-las em porta lâminas e deixar a temperatura ambiente;
- VII. Não transportar material biológico em ambulância com pacientes.

Especificações da caixa de transporte

Figura 9: Exemplo de caixa para o transporte de material biológico.

Guia prático para transporte de amostras

Figura 10: Montagem e organização de caixa para transporte de soro.

Figura 11: Guia rápido de itens necessários no transporte de material.

Teste Rápido DPP®

Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos

O kit diagnóstico TR DPP® Leishmaniose V. Canina - Bio-Manguinhos é fornecido na seguinte apresentação:

TR DPP® Leishmaniose V. Canina – Bio-Manguinhos

- Suportes embalados individualmente (20 reações);
- Tampão de corrida;
- Alças coletoras descartáveis (5µL);
- Lancetas inox estéreis descartáveis;
- Manual de uso (Bula).

Figura 12: Apresentação do kit.

Protocolo de realização

- ⊕ Após realizada a coleta, o sangue centrifugado, separado o soro a identificação dos tubos
- ⊕ Abrir o envelope laminado individual, verificar se a sílica está presente e se as linhas azuis e verde estão visíveis.

- ⊕ Retirar o suporte de teste do envelope laminado e identificá-lo com o número de registro do cão ou número de identificação da amostra.
- ⊕ Com o auxílio de uma micropipeta automática ou alça coletora (do kit), adicionar 5µL da amostra (soro) ao centro do poço 1.
- ⊕ Imediatamente após a adição da amostra, acrescentar lentamente e com o frasco na posição vertical (sem inclinar), 2 gotas de tampão ao poço 1.
- ⊕ Aguardar 5 minutos.
Após esse tempo, as linhas teste e controle devem ter desaparecido.
Em caso contrário, descartar o suporte de teste e repetir o procedimento desde o início usando um novo suporte.
- ⊕ Adicionar 4 gotas de tampão, lentamente, ao poço 2.
Com o frasco de tampão em posição vertical (sem inclinar).
- ⊕ Deixar o teste correr por 10 minutos à temperatura ambiente.
- ⊕ Não ler os resultados após 25 minutos contados a partir da adição do tampão de corrida ao poço 2.

Descarte o teste se;

- Ao abrir não aparecem as linhas teste e controle;
- Caso não desapareça as linhas após adicionar o tampão no poço 1;
- Caso não apareça a linha teste, 3 minutos após a adição do tampão ao poço 2.

Guia rápido do Teste Rápido DPP®

Figura 13: Esquema de realização do teste DPP.

Leitura e interpretação dos resultados

O TR DPP® Leishmaniose V. Canina - Bio-Manguinhos possui uma letra T (como linha teste) e uma linha C (como linha controle) na superfície do suporte.

As linhas são visíveis na janela de resultado antes da aplicação da amostra com cor azul clara.

A linha de controle (C) é usada para controle de procedimento, que deverá obrigatoriamente aparecer se o procedimento do teste estiver correto, assim como os reagentes da linha de controle.

Uma linha (T) será visível na janela de resultado em vermelho caso houver a presença de anticorpos *anti-Leishmania* na amostra testada.

A intensidade da cor das linhas C e T podem ser diferentes, ou seja, a linha controle C poderá ser mais fraca que a linha teste T ou vice-versa; considerar o resultado Reagente nesta situação.

Figura 14: Parâmetro de leitura do teste DPP, segundo o manual de uso.

Escala visual para interpretação dos resultados

Figura 15: Escala de leitura para o teste DPP.

Considerações do Teste Rápido DPP®

- ♣ Somente abra o envelope laminado contendo o suporte de teste no momento de sua utilização;
- ♣ Para reduzir falhas no procedimento do teste, e na interpretação dos resultados, não realizar mais de 5 testes por vez;
- ♣ Não adicionar volumes de amostra superiores ao preconizado;
- ♣ Utilizar sempre a alça coletora fornecida no kit, segundo as orientações do manual de instruções;
- ♣ Assegurar-se de que a embalagem dos suportes esteja intacta. Caso contrário, separe o Kit evitando que seja utilizado e entre em contato com o SAC de Bio-Manguinhos;
- ♣ Componentes de kits de lotes diferentes nunca devem ser misturados;
- ♣ Não utilize kits ou componentes com a data de validade vencida.

Resultados de exames

Disponível no setor da leishmaniose ou no balcão de atendimento (impresso); quando solicitado ou quando há grande quantidade de laudos.

Por e-mail quando solicitado no ato do atendimento; enviar os dados de e-mails do município e do médico veterinário responsável.

Horário de atendimento

Segunda à sexta-feira das 08:00h às 16h

Horário de recebimento de amostras

- Soro (já separado) e lâminas: 8:0h às 16h
- Sangue total (para centrifugar): 8:00h às 15h
- Fragmento de órgãos ou aspirado de linfonodo para Cultura e PCR: 8:00h às 14h. De segunda à quinta-feira*.

*Entrar em contato com o laboratório e confirmar coleta e entrega da amostra.

Contato

Instituto Adolfo Lutz

Endereço: Rua Alberto Suffredini, 2325 - Jardim Maceno,
São José do Rio Preto/SP.

CEP: 15060-020

Telefone: 3224-2602 Ramal: 721

E-mail: resultados.lva@gmail.com

Referências

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA – CFMV. RESOLUÇÃO Nº 714, DE 20 DE JUNHO DE 2002. DISPÕE SOBRE PROCEDIMENTOS E MÉTODOS DE EUTANÁSIA EM ANIMAIS, E DÁ OUTRAS PROVIDÊNCIAS.

BÚRIGO. MANUAL DE COLETA E TRANSPORTE DE AMOSTRA PARA EXAMES VETERINÁRIOS. CRUZEIRO DO SUL- RS. DISPONÍVEL EM http://www.laboratorioburigo.com.br/img/manual/arquivo_3.pdf.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. MANUAL DE VIGILÂNCIA E CONTROLE DA LEISHMANIOSE VISCERAL / MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. – BRASÍLIA: EDITORA DO MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006. 120 p.: IL. COLOR – (SÉRIE A. NORMAS E MANUAIS TÉCNICOS)

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. MANUAL DE VIGILÂNCIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA / MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. – 2. ED. – BRASÍLIA : EDITORA DO MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007. 182 p. – (SÉRIE A. NORMAS E MANUAIS TÉCNICOS)

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. MANUAL DE VIGILÂNCIA E CONTROLE DA LEISHMANIOSE VISCERAL / MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. – 1. ED., 5. REIMPR. – BRASÍLIA : MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014. 120 p.: IL.

CFMV, CARDOSO, LISIANE. CFMV SOLICITA NOVAS INFORMAÇÕES AO MINISTÉRIO DA AGRICULTURA SOBRE VENDA DE MEDICAMENTO REGISTRADO PARA TRATAMENTO DA LVC, 2017.

FUNED, FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS. MANUAL DO PROGRAMA DE AVALIAÇÃO DA QUALIDADE IMUNODIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, 2015. DISPONÍVEL EM: [TTP://FUNED.MG.GOV.BR/](http://FUNED.MG.GOV.BR/)

MINISTÉRIO DA SAÚDE- SECRETÁRIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE- COORDENAÇÃO GERAL DE DOENÇAS TRANSMISSÍVEIS- COORDENAÇÃO GERAL DE LABORATÓRIOS DE SAÚDE PÚBLICA: NOTA TÉCNICA CONJUNTA Nº 001/2011: ESCLARECIMENTOS SOBRE SUBSTITUIÇÃO DO PROTOCOLO DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (LVC).

MINISTÉRIO DA SAÚDE- SECRETÁRIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE- COORDENAÇÃO GERAL DE DOENÇAS TRANSMISSÍVEIS- COORDENAÇÃO GERAL DE LABORATÓRIOS DE SAÚDE PÚBLICA: NOTA TÉCNICA CONJUNTA Nº 11/2016/CPV/DFIP/SDA/GM/MAPA: AUTORIZADO O REGISTRO DO PRODUTO MILTEFORAN, SOB NÚMERO SP 000175-9.000003, DE PROPRIEDADE DA EMPRESA VIRBAC SAÚDE ANIMAL, INDICADO PARA O TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE VISCERAL DE CÃES.

SÃO PAULO (ESTADO). SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE, SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS - SUCEN e COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS - CCD. MANUAL DE VIGILÂNCIA E CONTROLE DA LEISHMANIOSE VISCERAL AMERICANA DO ESTADO DE SÃO PAULO / COORDENAÇÃO VERA LUCIA FONSECA DE CAMARGO-NEVES - SÃO PAULO: A SECRETARIA, 2006.

TRD, WHO. DISPONÍVEL EM: [HTTP://WWW.WHO.INT/TDR/DISEASES-TOPICS/LEISHMANIASIS/EN/](http://www.who.int/tdr/diseases-topics/leishmaniasis/en/)

ANEXOS 1 e 2