

Instruções para a realização do teste
rápido imunocromatográfico Alere
para diagnóstico sorológico da
leishmaniose visceral canina



Elaboração

Andreza Pain Marcelino

Job Alves de Souza Filho

Serviço de Doenças Parasitárias
Laboratório de Referência Nacional em Diagnóstico
da Doença de Chagas e Leishmaniose Visceral
IOM - FUNED

Colaboração

Alere™

Marcelo Santos Genelhu

Responsável técnico Alere™

Ministério da Saúde

Secretaria de Vigilância em Saúde

Grupo Técnico das Leishmanioses (GT-Leishmanioses)

UVTV/CGDT/DEVIT

Lucas Edel Donato

Referência técnica GT-Leishmanioses

Instruções para a realização do teste rápido imunocromatográfico Alere para diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina

Sumário

| | |
|---|----|
| 1. Aspectos gerais da leishmaniose visceral (LV) | 2 |
| 1.1. Agente etiológico | 2 |
| 1.2. Vetores | 2 |
| 1.3. Principal reservatório - Leishmaniose visceral canina (LVC) .. | 2 |
| 2. Teste rápido imunocromatográfico (TRI) para LVC | 4 |
| 2.1. TRI Alere Leishmaniose | 5 |
| 2.2. Apresentação do kit TRI Alere..... | 5 |
| 2.3. Coleta e preparação da amostra..... | 6 |
| 2.4. Procedimentos para a realização do TRI Alere | 8 |
| 2.5. Leitura e interpretação dos resultados..... | 10 |
| 2.6. Precauções | 13 |
| 3. Considerações Finais..... | 13 |
| 4. Referências bibliográficas | 14 |

Conceitos básicos da Leishmaniose Visceral (LV) e instruções para a realização do teste rápido imunocromatográfico (TRI) para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina (LVC)

Instruções para a realização do teste rápido imunocromatográfico Alere para diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral canina

1. Aspectos gerais da leishmaniose visceral (LV)

A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose causada por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitida aos animais e humanos por insetos flebotomíneos. A LV é caracterizada por febre alta, perda substancial de peso, anemia, hepatomegalia e esplenomegalia. Se deixada sem tratamento, a forma visceral tem uma taxa de letalidade próximo a 100%. Mundialmente, há uma estimativa de 400 mil novos casos de LV por ano, sendo que, cerca de 97% dos casos de LV nas Américas ocorrem no Brasil.

1.1. Agente etiológico

A leishmaniose é causada por protozoários da família Tripanosomatidae, gênero *Leishmania*. Nas Américas, a *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* é a espécie comumente envolvida na transmissão da LV.

1.2. Vetores

Os seres humanos são infectados através da picada de flebotomíneos, que geralmente se reproduzem em solos úmidos de áreas florestais ricos em matéria orgânica ou em tocas de pequenos roedores (Figura 1). No Brasil, duas espécies estão relacionadas com a transmissão da doença, *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*, sendo o *L. longipalpis* a principal espécie transmissora da *Leishmania infantum*. Durante o repasto sanguíneo a fêmea do flebotomíneo ingere macrófagos parasitados por *Leishmania* que, no intestino do vetor, seguem o ciclo necessário para o seu desenvolvimento. Posteriormente ocorre a contaminação de seres humanos e animais pela picada do flebótomo infectado.

1.3. Principal reservatório - Leishmaniose visceral canina (LVC)

Nas últimas décadas, a LV tem passado por um processo de urbanização e os cães (*Canis familiaris*) são considerados os principais reservatórios responsáveis pela persistência da LV nas áreas endêmicas. Surtos de infecções humanas são comumente associados à presença de cães soropositivos. A permanência de cães peridomicílio e em áreas próximas a florestas são os principais fatores de risco para a infecção canina.

A doença no cão é de evolução lenta e início insidioso. A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença sistêmica severa e as manifestações clínicas são dependentes do tipo de resposta imunológica expressa pelo animal infectado. O quadro clínico dos cães infectados apresenta um espectro de características clínicas que varia do aparente estado sadio a um severo estágio final.

Classicamente a LVC se manifesta por lesões cutâneas, principalmente descamação, eczema e pequenas úlceras localizadas mais frequentemente nas orelhas, focinho, cauda e articulações. O pelo pode ficar opaco. Nas fases mais adiantadas da doença, observa-se com grande frequência: onicogrifose, esplenomegalia, linfadenopatia, alopecia, dermatites, úlceras de pele, ceratoconjuntivite, hiperqueratose, coriza, apatia, diarreia, hemorragia intestinal, edema de patas e vômito. Na fase final da infecção, pode ocorrer paralisia das patas posteriores, caquexia, inanição e morte. Entretanto, cães infectados podem permanecer sem sinais clínicos por um longo período de tempo.

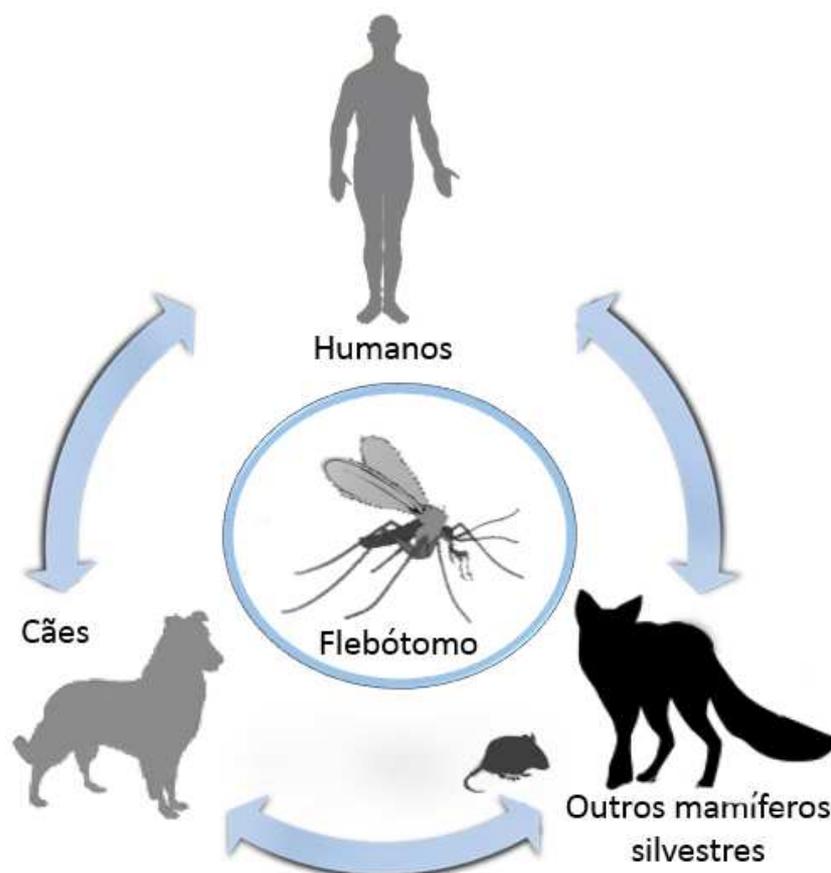


Figura 1 – Foco e transmissores da leishmaniose.

2. Teste rápido imunocromatográfico (TRI) para LVC

O diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é complexo, devido à presença de sinais clínicos não específicos e a presença de cães assintomáticos. Portanto, o uso de testes que combinam velocidade, sensibilidade, especificidade e exijam o mínimo de equipamentos e complexidade de realização, tais como os testes rápidos imunocromatográficos (TRIs), ganharam grande importância.

Uma das abordagens para diagnosticar a LV envolve TRIs que detectam imunoglobulina G (IgG) que se ligam à proteína recombinante rK39. A rK39 é derivada de um antígeno específico produzido pelo complexo *Leishmania donovani* e foi utilizada nas duas últimas décadas para o diagnóstico sorológico. Estes testes são rápidos, apresentam o resultado em aproximadamente 20 minutos, minimamente invasivos e, normalmente, necessitam de apenas uma gota de sangue total ou soro, sendo assim, adequados para o uso no campo.

O DPP® (Dual Path Platform, Bio-Manguinhos/FIOCRUZ) para LVC é um TRI que usa a proteína recombinante rK28 (antígenos rK9, rK39 e rK26) como antígeno. Após ensaio de validação multicêntrica ocorrida em 2011, o TRI DPP® se tornou o teste recomendado pelo Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral/Ministério da Saúde no Brasil para a triagem de casos de LVC. No entanto, atualmente a produção de TRI DPP® não está atendendo a demanda nacional de diagnóstico, e alternativas diagnósticas são necessárias para manter as atividades de vigilância e controle da LV. Para ser utilizado no diagnóstico da LVC os kits diagnósticos necessitam de ter registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. No mercado atual está disponível comercialmente, com este registro, o TRI de plataforma única produzido pela empresa Alere™, que possui similaridade ao TRI DPP® quanto à sua composição antigênica, a proteína recombinante K28, fornecendo uma nova opção de TRI para o diagnóstico da LVC.

2.1. TRI Alere Leishmaniose

Alere Leishmaniose Ac Test Kit é um imunoenensaio imunocromatográfico para detecção qualitativa de anticorpos anti *Leishmania infantum*, através da proteína recombinante rK28 (antígenos rK9, rK39 e rK26) em amostras de soro, plasma ou sangue total canino, com resultados qualitativos (positivo ou negativo) para o diagnóstico animal.

2.2. Apresentação do kit TRI Alere

O kit Alere Leishmaniose fornece os seguintes componentes (Figura 2):

- 1) 5 ou 10 Cartões de resultados
- 2) 5 ou 10 Tubos de amostra descartáveis com EDTA
- 3) 1 Frasco com solução tampão de teste
- 4) 5 ou 10 Dispositivos de teste
- 5) 5 ou 10 Tubos capilares de 10 microlitros (µL)



Figura 2 – Componentes do Alere Leishmaniose Ac Test Kit.

Nota: as lancetas para coleta de sangue capilar serão fornecidas juntamente com o kit, como um anexo, portanto sua descrição não consta na embalagem do produto.

2.3. Coleta e preparação da amostra

Amostras de sangue

Para realização do teste no campo, pode-se utilizar a lanceta para a obtenção de sangue capilar a partir da orelha, patas ou rabo do animal e em seguida utilizar os tubos capilares para coletar 10µl de sangue (Figura 3).

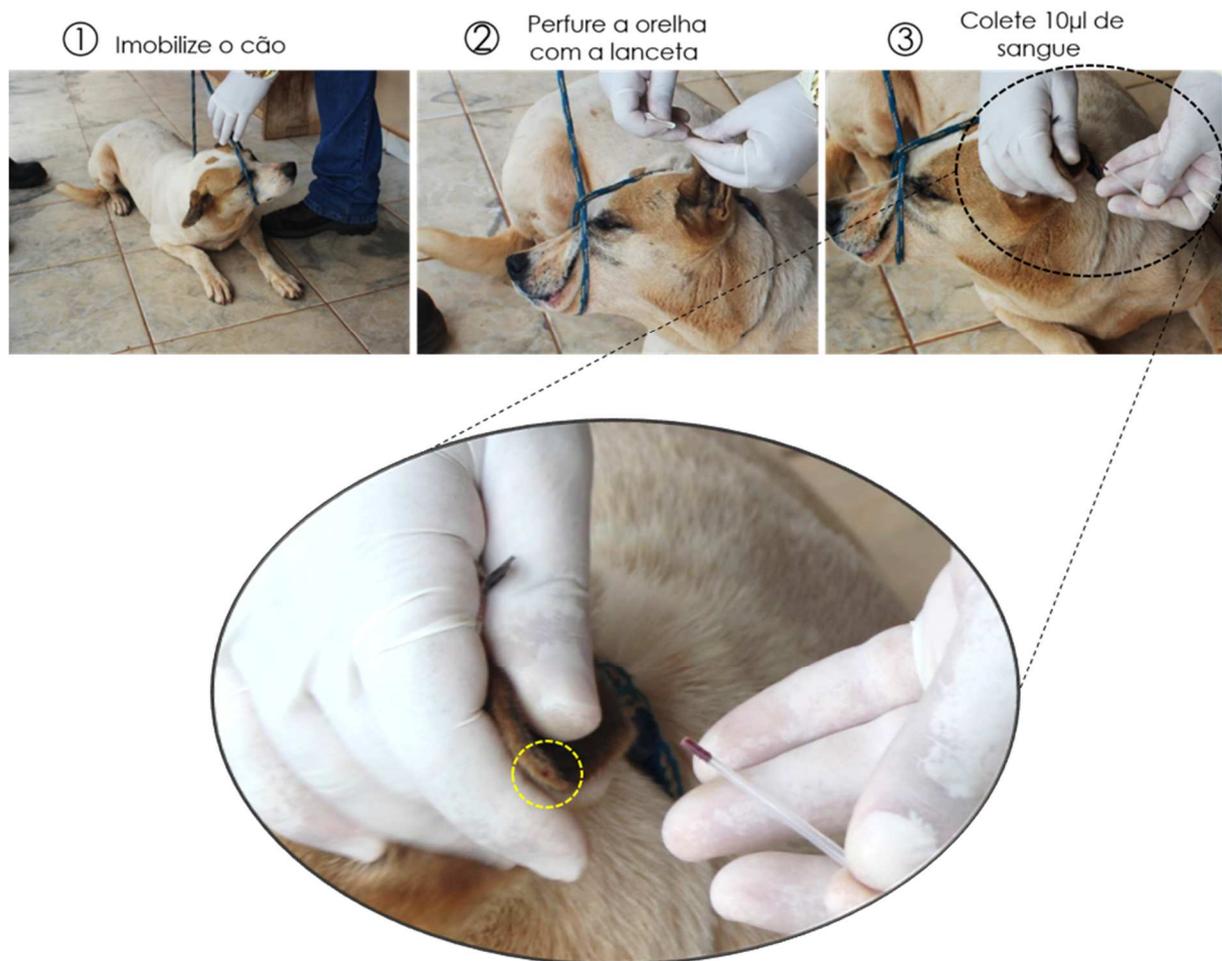


Figura 3 – Coleta de sangue capilar para realização do TRI Alere no campo

Atenção!

Para o uso de sangue a fresco, colocar a amostra imediatamente após a coleta na plataforma teste. Desta forma evita-se a formação de pequenos coágulos que podem interferir no desempenho do teste diagnóstico.

Para realização do teste no laboratório/UVZ, poderá ser coletado sangue total em tubos com anticoagulante, ou em tubos sem anticoagulante para obtenção do soro, usando o procedimento padrão de coleta de sangue por punção venosa (Figura 4). As amostras de sangue total com anticoagulante podem ser armazenadas por até 24 horas em refrigerador (2 a 8°C), mas não devem ser congeladas. Caso as amostras de sangue total não puderem ser testadas dentro desse período de tempo, separar o plasma através de centrifugação e estocar como descrito no próximo procedimento.



Figura 4 – Coleta de sangue para realização do TRI Alere no laboratório/UVZ

Amostras de plasma

Coletar as amostras de sangue total em frascos de coleta apropriados contendo anticoagulantes, como EDTA (os tubos fornecidos pelo kit têm capacidade para coleta de 0.5ml de amostra de sangue), heparina ou citrato de sódio usando o procedimento padrão de coleta de sangue por punção venosa (Figura 4). Separar o plasma através de centrifugação. As amostras de plasma devem ser estocadas refrigeradas (2 a 8°C) por até cinco dias; para estocagens mais longas, congelar a -20°C em frascos selados.

Amostras de soro

Coletar as amostras de sangue total em frascos de coleta apropriados sem anticoagulante usando o procedimento padrão de coleta. Separar o soro através de centrifugação. As amostras de soro devem ser estocadas refrigeradas (2 a 8°C) por até cinco dias; para estocagens mais longas, congelar a -20°C em frascos selados.

2.4. Procedimentos para a realização do TRI Alere

- 1) Remover o cassete da embalagem e colocá-lo numa superfície plana e seca.
- 2) Adicionar 10µL de sangue total, soro ou plasma, utilizando a pipeta capilar, no orifício marcado com a letra “S” no cassete de teste. Quando o teste for realizado no laboratório, a amostra deve ser homogeneizada antes do teste.
- 3) Adicionar 2 gotas de tampão no orifício marcado com a letra “S” no cassete de teste;
- 4) Quando o teste começar a reagir, deve-se observar uma cor rosa se movendo através da janela de resultado no centro do dispositivo de teste.
- 5) Interpretar os resultados do teste em 20 minutos.

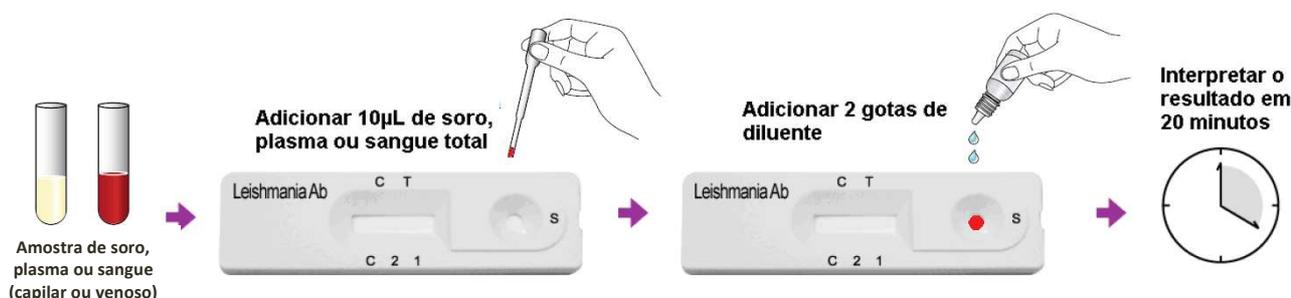


Figura 5 – Procedimento de realização do TRI Alere

Atenção!

Os tubos capilares possuem uma marcação de 10µL (Figura 6). Quantidades inferiores à 10µL podem resultar em testes falso negativos e quantidades superiores a 10µL podem invalidar o teste (Figura 7). Portanto utilizar sempre os tubos capilares disponibilizados no kit.



Figura 6 – Marcação de 10 μ L no tubo capilar

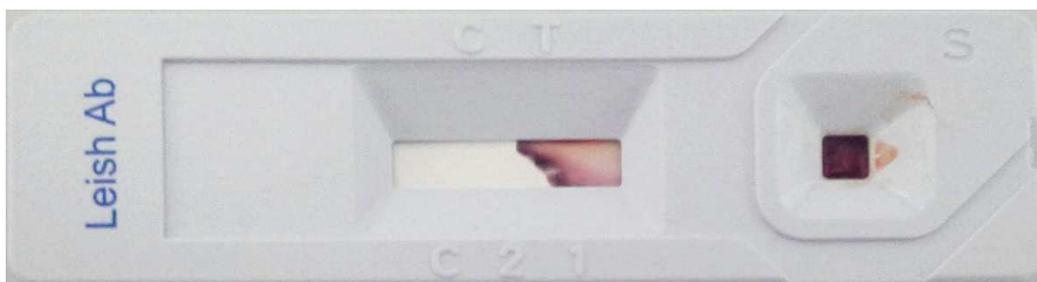


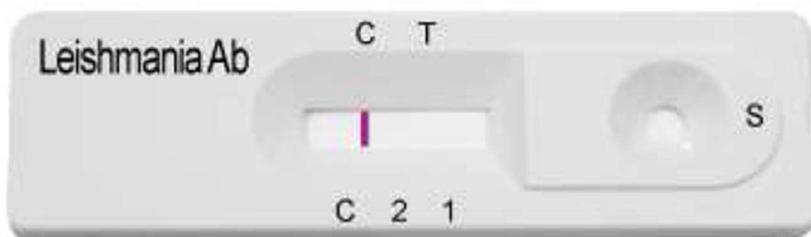
Figura 7 – Teste invalido devido ao excesso de amostra na plataforma de teste.

2.5. Leitura e interpretação dos resultados

O Alere Leishmaniose Ac Test Kit possui uma letra **T** (como linha teste) e uma linha **C** (como linha controle) na superfície do cassete. Ambas as linhas não são visíveis na janela de resultado antes da aplicação da amostra. A linha de controle (C) é usada para controle de procedimento. Esta linha deve sempre aparecer se o procedimento do teste estiver correto e se os reagentes da linha de controle estiverem funcionando. Uma linha roxa será visível na janela de resultado (T) se houver a presença de anticorpos anti *Leishmania infantum* na amostra testada. Antígenos selecionados são utilizados na banda de teste como materiais de captura e detecção.

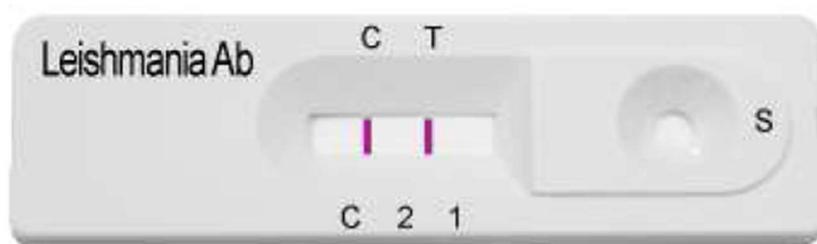
RESULTADO NEGATIVO

A presença de somente uma linha na janela C indica um resultado NEGATIVO.



RESULTADO POSITIVO

A presença de duas linhas coloridas (C e T), não importa qual aparecerá primeiro, indica um resultado POSITIVO.

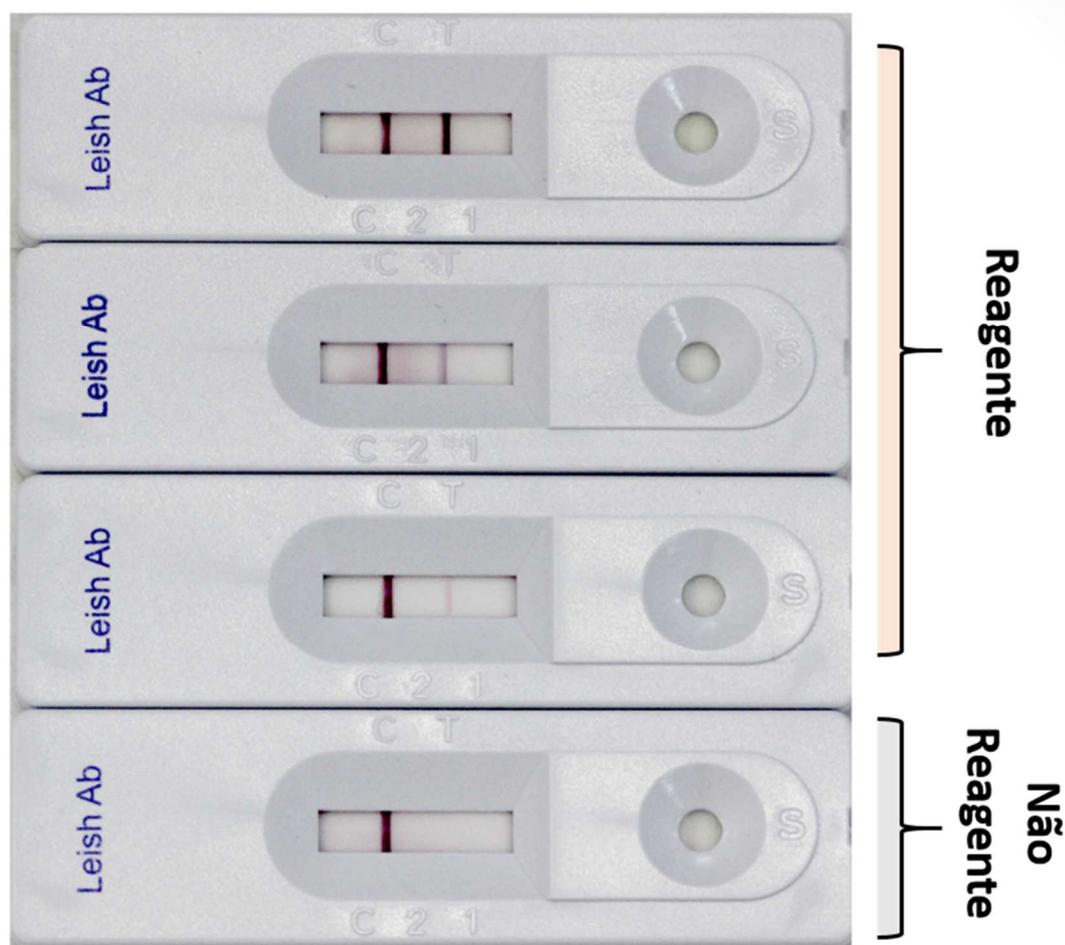


INVÁLIDO

Quando a linha controle C não for visível depois da execução do teste, o resultado deve ser considerado INVÁLIDO. Deve-se repetir o teste com um novo dispositivo de teste.



Escala visual para interpretação dos resultados



Nota: 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 POSITIVO em qualquer situação.

2.6. Precauções

- 1) O kit é sensível ao calor. Segundo informações da bula o kit deve ser armazenado à temperatura de 2 a 7°C. No entanto, ensaios de estabilidade em tempo real realizados pelo produtor demonstraram que o kit é estável em temperaturas de armazenamento de 2 a 30°C. Este estudo encontra-se em análise pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para futuras alterações nas recomendações constantes na bula (processo número 21028005636/2014-13).
- 2) Não congelar o kit
- 3) Realizar o teste imediatamente após a abertura do envelope.
- 4) Não reutilizar a plataforma de teste.
- 5) Não utilizar o kit após o vencimento.
- 6) Se a amostra não for testada imediatamente, manter sob refrigeração (2 a 8° C) por 24 horas (amostras de sangue total) ou até cinco dias (plasma ou soro). Se for necessário armazenar por um prazo maior, é recomendado o congelamento (-20°C).
- 7) Manusear todas as amostras do sangue como sendo capazes de transmitir doenças infecciosas.
- 8) Fazer o descarte correto dos materiais utilizados considerando-os como resíduo com risco biológico e utilizar descarte de perfuro-cortante para agulhas e lancetas.

3. Considerações Finais

Recomenda-se o algoritmo proposto pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico da Leishmaniose visceral canina (LVC): triagem com teste imunocromatográfico e confirmação pelo ELISA. Um cão estará confirmado sorologicamente para LVC quando as duas metodologias (Teste rápido e ELISA) apresentarem resultados reativos -Nota técnica conjunta Nº 01/2011 CGDT-CGLAB/DEVIT/SUS/MS.

4. Referências bibliográficas

Alvar, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS one 7, e35671 (2012).

Feliciangeli, M. D. Natural breeding places of phlebotomine sandflies. Medical and veterinary entomology 18, 71-80 (2004).

Maia, Z. et al. Comparative study of rK39 Leishmania antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review with meta-analysis. PLoS neglected tropical diseases 6, e1484 (2012).

Ready, P. D. Epidemiology of visceral leishmaniasis. Clinical epidemiology 6, 147-154 (2014).

WHO, World Health Organization. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases Vol. 949 (Geneva, 2010).

Referência técnica: bula do Alere Leishmaniose Ac Test Kit. Versão: 01/Dez 2014.

Serviço de Doenças Parasitárias

Instituto Octávio Magalhães

Fundação Ezequiel Dias

Tel.: 31-3314 4663/4661

leishmania.iom@gmail.com

Departamento de Assessoria Técnica

Para esclarecimentos de dúvidas quanto ao produto e assessoria técnica:

Tel: 0800 11 3262

veterinaria.br@alere.com

Responsável técnico: Marcelo Santos Genelhu

marcelo.genelhu@alere.com