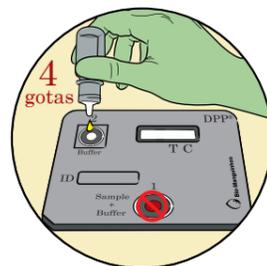


9. Virar o frasco de tampão e mantê-lo na posição vertical (sem inclinar) sobre o poço # 2 (TAMPÃO). Adicionar 4 (quatro) gotas de tampão, lentamente, ao poço # 2 (TAMPÃO).



10. Deixar o teste correr por 10 (dez) minutos a temperatura ambiente. Caso não haja migração após 3 (três) minutos, descartar o teste.

11. Leitura do Teste - Não ler os resultados após 25 minutos da adição do tampão de corrida ao poço # 2 (TAMPÃO).

LEITURA VISUAL

Colocar o suporte sobre uma superfície plana e em local bem iluminado. O operador deve se posicionar de forma a manter uma distância de 30 a 50 cm entre o suporte de teste e seus olhos. Observar a presença de linhas e anotar no protocolo de testes.

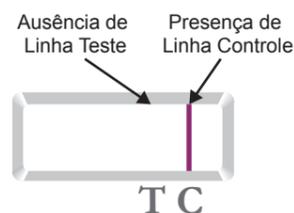
ATENÇÃO: Após a leitura, descartar o suporte, a alça e a lanceta utilizados no teste em um recipiente para descarte de materiais de risco biológico.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS:

Os resultados são interpretados visualmente. Em caso de dúvidas na interpretação do teste, separar o suporte e fazer contato com o SAC de Bio-Manguinhos.

Resultado NÃO REAGENTE

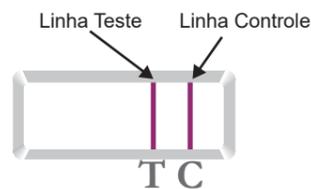
Um resultado não reagente é indicado por uma linha roxa/rosa na área de CONTROLE (C) e nenhuma linha na área de TESTE (T). Este resultado sugere a ausência de anticorpos para *Leishmania* na amostra e não exclui a possibilidade de infecção por *Leishmania*.



Resultado REAGENTE

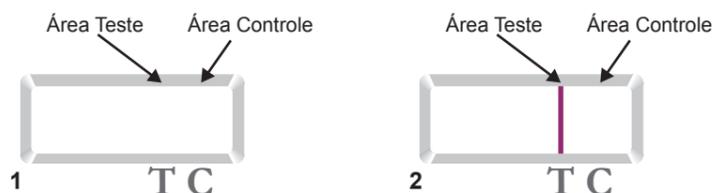
A detecção de duas linhas roxa/rosa, uma na área de CONTROLE (C) e outra na área de TESTE (T), indica um resultado reagente. A intensidade da linha na área de TESTE (T) varia de claro a muito escuro conforme a concentração de anticorpos específicos. Assim, a linha na área de TESTE (T) pode ter aparência diferente da linha na área de CONTROLE (C). Isto não invalida o teste. Um teste reagente significa que anticorpos para *Leishmania* foram detectados.

ATENÇÃO: Um resultado reagente deve ser confirmado conforme recomendações do Ministério da Saúde.



Resultado INVÁLIDO

Uma linha roxa/rosa deve sempre aparecer na área de CONTROLE (C), independente da presença ou não de linha na área de TESTE (T). Caso uma linha roxa/rosa não seja visível na área de CONTROLE(C), o teste deve ser considerado inválido. Um resultado inválido não pode ser interpretado. Separar o material e fazer contato com o SAC de Bio-Manguinhos. Repetir o procedimento de teste com um novo suporte de teste.



CONFIRMAÇÃO DE DESEMPENHO DO TESTE:

Ao término do teste, uma linha roxa/rosa aparecerá na área de CONTROLE (C), tanto nas amostras negativas quanto nas positivas. Esta linha serve de controle interno, confirmando o desempenho adequado do teste.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO:

- O TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos deve ser utilizado com soro, plasma ou sangue total venoso.
- Outros tipos de amostras de sangue coletadas em tubos contendo anti-coagulantes que não citratos, heparina ou EDTA, podem gerar resultados inadequados. Para amostras de soro, coletar sangue sem anticoagulante.
- O TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos deve ser utilizado segundo as instruções contidas neste manual visando à obtenção de resultados adequados.
- Proceda a leitura do teste em, no máximo, 25 minutos.
- Somente abra o envelope contendo o suporte de teste no momento de sua utilização.
- Um resultado reagente indica a presença de anticorpos para *Leishmania* na amostra testada.
- Um resultado não reativo não exclui a possibilidade de exposição à *Leishmania* ou infecção por *Leishmania*. Uma resposta humoral a uma exposição recente pode levar alguns meses até atingir níveis detectáveis.
- Um animal infectado com *Leishmania* que esteja recebendo algum tipo de medicamento pode produzir resultado falso negativo.

ÍNDICES DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE

Os índices de sensibilidade e especificidade do TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos foram determinados pela avaliação da capacidade de detectar anticorpos específicos para *Leishmania* em amostras clínicas (sangue, soro e plasma) de cães. Usando como referência o teste parasitológico de 62 cães, o TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos apresentou sensibilidade de 100% (sangue), 100% (soro) e entre 92.9% - 100% (plasma) e especificidade entre 87.5% - 91.7% (sangue), 87.5% - 91.7% (soro) e 87.5% - 89.6% (plasma).

Quando comparado ao Teste EIE Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos, para 77 amostras de cães, o TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos apresentou uma sensibilidade entre 89.7% - 96.6% (sangue), 89.7% - 93.1% (soro) e 89.7% - 100% (plasma) e uma especificidade entre 97.9% - 100% (sangue), 93.8% - 97.9% (soro) e 95.8% - 97.9% (plasma).

REPRODUTIBILIDADE, REPETITIVIDADE E ESTABILIDADE:

As boas práticas de fabricação e laboratoriais, associadas a simplicidade e rapidez na utilização do TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos garantem sua reprodutibilidade, repetitividade e estabilidade, podendo ser utilizado como método seguro e eficaz na detecção de anticorpos específicos para a evidenciação da infecção por *Leishmania*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. WHO. The UNICEF-UNDP-World Bank-WHO Special Program for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm, 2002.
2. CDC. Division of Parasitic Diseases. www.cdc.gov/ncidod/dpd/parasites/leishmania/factsht_leishmania.htm, 2004.
3. PALATNIK-DE-SOUSA, C.B., dos Santos, W.R., Franca-Silva, J.C., da Costa, R.T., Reis, A.B., Palatnik, M., Mayrink, W., Genaro, O. Impact of Canine Control of the Epidemiology of Canine and Human Visceral Leishmaniasis in Brazil. *Am J Trop Med Hyg*, 65: 510-517, 2001.
4. ASHFORD, D.A., David, J.R., Freire, M., David, R., Sherlock, I., da Conceicao Eulalio, M., Sampaio, D.P., Badaro, R. Studies on Control of Visceral Leishmaniasis: Impact of Dog Control on Canine and Human Visceral Leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. *Am J Trop Med Hyg*, 59: 53-57, 1998.
5. REITHINGER, R., Quinell, R.J., Alexander, B., Davies, C.R. Rapid Detection of *Leishmania infantum* Infection in Dogs: Comparative Study Using and Immunochromatographic Dipstick Test, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, and PCR. *J Clin Microbiol*, 40: 2352-2356, 2002.
6. DO ROSARIO, E.Y., Genaro, O., Franca-Silva, J.C., da Costa, R.T., Mayrink, W., Reis, A.B., Carneiro, M. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 100: 197-203, 2005.
7. PORROZZI, R., Santos da Costa, M.V., Teva, A., Falqueto, A., Ferreira, A.L., Santos, C.D., Fernandes, A.P., Gazinelli, R.T., Campos-Neto, A., Grimaldi, G. Jr. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. *Clin Vaccine Immunol*, 14: 544-548, 2007.

Licenciado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento sob o nº 9591/2011.

Resp.: Téc.: Daniel da Silva Guedes Junior – CRMV/RJ nº: 7242

ASSISTÊNCIA AOS USUÁRIOS:

Orientações técnicas adicionais a respeito deste produto poderão ser obtidas junto a:

Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos/ Bio-Manguinhos/ Fiocruz

Av. Brasil, 4365 - Manguinhos - CEP: 21040-900 - Rio de Janeiro - RJ | CNPJ: 33.781.055/0015-30

- Indústria Brasileira | SAC: 08000.210.310 ou sac.reativos@bio.fiocruz.br | www.bio.fiocruz.br

PROIBIDA VENDA AO COMÉRCIO



TESTE RÁPIDO QUALITATIVO PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS DE CÃO PARA *LEISHMANIA* EM SORO, PLASMA OU SANGUE TOTAL VENOSO.
(MATERIAL FORNECIDO PARA 20 REAÇÕES)



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



TR DPP® LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Bio-Manguinhos

(USO VETERINÁRIO)

TESTE RÁPIDO QUALITATIVO PARA A DETECÇÃO DE ANTICORPOS DE CÃO PARA *LEISHMANIA*
(material fornecido para 20 reações)

INDICAÇÃO DE USO

O TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos é um teste de triagem imunocromatográfico de uso único para detecção, em cães, de anticorpos específicos para *Leishmania*, em soro, plasma ou sangue total venoso.

O teste é usado para o diagnóstico de leishmaniose visceral canina em associação a outros critérios. O TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos é indicado para uso por profissionais de saúde de acordo com as instruções fornecidas.

INFORMAÇÕES TÉCNICAS

A leishmaniose é causada por um protozoário parasita do gênero *Leishmania*. Essa doença é endêmica em 88 países, totalizando 350 milhões de pessoas. A *Leishmania* está presente em áreas desde a floresta tropical das Américas do Sul e Central aos desertos no Oeste da Ásia, com mais de 90% de todos os casos de leishmaniose visceral (LV) ocorridos em Bangladesh, Nepal, Índia, Sudão e Brasil. Há cerca de 500.000 novos casos anuais de leishmaniose visceral humana^{1,2}. Entre os anos de 1984 a 1999, 37.294 novos casos de LV humana foram relatados pelo Ministério da Saúde³.

A LV, algumas vezes referida como Kalazar é uma doença crônica e potencialmente letal se não tratada antes do aparecimento de sintomas. Sinais clínicos da doença incluem indisposição, anemia, febre, perda de peso e inchaço no baço, fígado e gânglios linfáticos¹.

A infecção pode ser prevenida evitando-se a picada de flebotomíneos através de protetores como vestuário, repelentes ou inseticidas. Tratamentos para LV são muito difíceis e geralmente requerem o uso de antimônio pentavalente ou estibogluconato de sódio¹.

A LV é uma zoonose na qual os canídeos têm sido implicados como importantes reservatórios para o parasita^{4,5}. A transmissão aos humanos ocorre pela picada do flebótomo fêmea infectado. Programas de controles para LV incluem a eutanásia de cães infectados identificados através de teste sorológico. Este procedimento tem provado ser uma importante etapa do controle empregado no Brasil³.

Vários ensaios como a imunofluorescência, hemaglutinação, PCR e ELISA encontram-se atualmente em uso para este diagnóstico^{5,6,7} e os antígenos recombinantes são ferramentas apropriadas para melhorar os métodos de diagnóstico sorológico atuais para leishmaniose visceral canina (LVC).

O TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos é um ensaio de triagem, imunocromatográfico, que emprega uma combinação única de antígenos recombinantes específicos para a detecção de anticorpos específicos para *Leishmania*, em cães. É rápido, simples e fácil de usar e pode ser armazenado à temperatura ambiente (2°C a 30°C).

PRINCÍPIO DO TESTE

O TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos emprega uma combinação de proteína A conjugada a partículas de ouro coloidal e anticorpos específicos da amostra para *Leishmania*. Em seqüência, reage com antígenos recombinantes de *Leishmania chagasi* ligados a uma membrana (fase sólida).

A amostra é aplicada ao poço #1 (AMOSTRA + TAMPÃO), seguida pela adição do tampão de corrida. O tampão propicia o fluxo lateral promovendo a ligação dos anticorpos aos antígenos. Após a migração da amostra e do tampão ao longo do suporte de teste, deve-se adicionar tampão de corrida ao poço # 2 (TAMPÃO). O conjugado se liga aos anticorpos específicos para *Leishmania* produzindo uma linha (roxa/rosa) na área do TESTE (T). Na ausência de anticorpos para *Leishmania* a linha (roxa/rosa) não aparece na área do TESTE (T). Em ambos os casos, a amostra continua a migrar ao longo da membrana produzindo uma linha (roxa/rosa) na área de CONTROLE (C), o que demonstra o funcionamento adequado dos reagentes.

MATERIAL FORNECIDO

Supportes DPP® contendo Proteínas Recombinantes K28 de <i>Leishmania chagasi</i> e a Proteína A Conjugada ao Ouro Coloidal, adsorvidos em membranas de nitrocelulose.	20 supports
Tampão de corrida	1 frasco (6 mL)
Alças coletoras descartáveis (5 µL)	20 alças
Lancetas descartáveis	20 lancetas
Manual de Instrução de uso	1 unidade

MATERIAL COMPLEMENTAR NÃO FORNECIDO

- Cronômetro e ou relógio
- Micropipetador calibrado para 5 µL (como alternativa à alça coletora)
- Luvas descartáveis
- Recipiente seguro para descarte de material biológico
- Álcool 70%

CONSERVAÇÃO E ESTOCAGEM DO MATERIAL

O TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina Bio-Manguinhos deve ser armazenado entre 2 °C e 30 °C. Recomenda-se a conservação do kit em geladeira somente em locais onde a temperatura ambiente ultrapasse 30 °C. Não congele o kit ou os seus componentes. Os suportes de teste devem permanecer lacrados até o momento de sua utilização. O tampão de corrida deve ser mantido em seu recipiente original. Caso o kit seja guardado sob refrigeração assegurar-se de que todos os componentes estejam à temperatura ambiente no momento de sua utilização.

CUIDADOS E PRECAUÇÕES

Somente para uso em diagnóstico *in vitro*.

Somente para uso veterinário.

Este conjunto diagnóstico contém produtos biológicos e químicos podendo representar uma fonte de risco. Ao manusear este conjunto, observe as precauções de biossegurança necessárias.

A qualidade dos resultados obtidos com este conjunto diagnóstico depende do cumprimento das Boas Práticas de Laboratório, tais como:

- O teste deve ser realizado apenas por profissionais de saúde segundo as instruções contidas neste manual;
- Não realizar mais de 5 testes por vez. Esta conduta reduz falhas no procedimento do teste, bem como na interpretação dos resultados;
- As amostras devem ser homogêneas antes do uso;
- As amostras de sangue não testadas imediatamente após a coleta devem ser refrigeradas entre 2 °C e 8 °C, podendo ser usadas em até 3 dias;
- Amostras de soro ou plasma podem ser conservadas entre 2°C e 8°C por 3 dias após a coleta, até que sejam utilizadas no teste. Caso a realização do teste não seja possível dentro deste período, as amostras devem ser congeladas (-20 °C ou abaixo);
- Equipamentos de proteção individual (EPI), tais como luvas descartáveis, óculos e jaleco, devem ser utilizados em todas as etapas de realização do teste;
- Os testes nunca devem ser utilizados após a data de validade;
- Componentes de kits de lotes diferentes nunca devem ser misturados;
- A integridade dos componentes do kit sempre deve ser verificada. Em especial, assegurar-se de que a embalagem dos suportes esteja intacta. Caso algum dos componentes do kit demonstre irregularidade, separe o kit evitando que seja utilizado e entre em contato com o SAC de Bio-Manguinhos;
- Nunca fracionar os kits.
- Não pingar sangue diretamente no suporte de teste. Utilizar sempre a alça coletora fornecida no kit, segundo as orientações abaixo (ver Procedimento do Teste);
- Cuidado ao adicionar a amostra: a alça deve ser mantida em posição vertical e a amostra deve ser aplicada ao centro do orifício ou poço # 1 (AMOSTRA + TAMPÃO) do suporte de teste;
- Cuidado ao adicionar o tampão de corrida: o frasco deve ser mantido em posição vertical e apenas duas gotas do líquido devem ser dispensadas ao poço # 1 (AMOSTRA + TAMPÃO) do suporte de teste onde se encontra a amostra;
- Aguardar cinco minutos e somente após o desaparecimento das cores das linhas T (TESTE) e C (CONTROLE) adicionar quatro gotas do tampão de corrida ao poço # 2 (TAMPÃO);

ATENÇÃO: alguns resultados reagentes podem aparecer em menos de 10 minutos, mas são necessários 10 minutos para detectar um resultado não-reagente. Ler os resultados em ambiente bem iluminado. Não ler os resultados após 25 minutos da adição do tampão de corrida ao poço # 2 (TAMPÃO).

- Após o uso, suportes, ponteiras, lancetas, alças coletoras e luvas devem ser descartadas em água sanitária ou em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% como material biológico potencialmente infeccioso.

COLETA DE AMOSTRA

ATENÇÃO: para o perfeito funcionamento do teste, usar 5µL de amostra e seguir as instruções de procedimento do teste.

O TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina Bio-Manguinhos pode ser realizado com amostra de soro, plasma ou sangue total venoso.

SANGUE TOTAL

Utilizar a lanceta para obter sangue a partir da orelha, patas ou rabo do animal. Para teste imediato utilizar as alças coletoras.

SANGUE TOTAL VENOSO

Coletar o sangue assepticamente nos tubos contendo EDTA, heparina ou citrato de sódio. Certifique-se que o tubo de sangue foi bem misturado antes da amostragem. Siga corretamente o procedimento do teste.

SORO

Obtido do sangue total coletado assepticamente por punção de veia com um tubo limpo sem anticoagulante. Deixar o sangue coagular a temperatura ambiente. Centrifugar o sangue a 2000rpm, durante 10 minutos, a temperatura ambiente. Separar o soro do coágulo para evitar hemólise.

PLASMA

Coletar o sangue total com anticoagulante, centrifugar a 2000rpm, durante 10 minutos, a temperatura ambiente e separar o plasma sobrenadante.

PROCEDIMENTOS PARA A REALIZAÇÃO DO TESTE RÁPIDO TR DPP® LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA BIO-MANGUINHOS:

1. Certifique-se que a amostra a ser testada esteja à temperatura ambiente. Caso esteja refrigerada ou congelada, permitir que a mesma alcance a temperatura ambiente antes de ser testada.

2. Retirar o número necessário de componentes do TR DPP® LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA BIO – MANGUINHOS e colocá-los sobre uma superfície plana. Caso o kit tenha sido guardado sob refrigeração, certifique-se de que os componentes do kit estejam a temperatura ambiente no momento do uso.

3. Retirar o suporte de teste do envelope laminado e identificá-lo com o nome do animal ou número de identificação, além do número do lote do kit de onde o suporte foi retirado.

4. Verificar a integridade de todos os componentes e a existência de 2 (duas) linhas na janela de teste do suporte, sendo 1 (uma) de cor azul e 1 (uma) de cor verde. Caso uma ou mais dessas linhas esteja ausente, separar o suporte de teste para que não seja usado e comunicar o ocorrido ao SAC de Bio-Manguinhos. Em seguida, utilizar um novo suporte de teste para continuar o procedimento.

5. Encostar a alça coletora de 5 µL na amostra a ser testada, permitindo que a alça seja preenchida com a amostra. Alternativamente, podem-se utilizar micropipetas automáticas, calibradas e ajustadas para 5 µL.

6. Segurar a alça coletora na posição vertical e tocar na área de aplicação da amostra, poço # 1 (AMOSTRA + TAMPÃO) do suporte para liberar 5µL de amostra. Certifique-se de que a amostra de sangue total, soro ou plasma migrou/escorreu da alça para o local do teste.

7. Virar o frasco de tampão e manter na posição vertical (sem inclinar) sobre o poço # 1 (AMOSTRA + TAMPÃO). Adicionar 2 (duas) gotas de tampão, lentamente, ao poço # 1 (AMOSTRA + TAMPÃO).

8. Aguardar 5 (cinco) minutos. Após esse tempo, a linha azul (TESTE) e verde (CONTROLE) da janela deve ter desaparecido. Em caso contrário, descartar o suporte de teste e repetir o procedimento desde o início usando um novo suporte.

