

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

CARLOS RENATO CALVET DA SILVA

**Implementação de um Programa de Avaliação Externa da
Qualidade em Sorologia para Leishmaniose Visceral Canina**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Imunobiológicos

RIO DE JANEIRO
2007

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Manguinhos / CICT / FIOCRUZ - RJ

S586

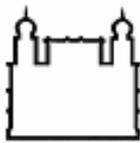
Silva, Carlos Renato Calvet

Implementação de um Programa de Avaliação Externa da Qualidade em Sorologia para Leishmaniose Visceral Canina / Carlos Renato Calvet Silva. – Rio de Janeiro, 2007.

xiii, 74 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Celular e Molecular, 2007.

Trabalho realizado no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos de Manguinhos – Bio-Manguinhos, no Departamento de Reativos para Diagnóstico, sob a orientação da Prof^a. Dra. Sônia Regina Lambert Passos.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos

CARLOS RENATO CALVET DA SILVA

**Implementação de um Programa de Avaliação Externa da
Qualidade em Sorologia para Leishmaniose Visceral Canina**

ORIENTADOR: Prof^a. Dra. Sônia Regina Lambert Passos

Aprovada em: 10 / 04 / 2007

Examinadores:

Prof. Dr. Renato Sergio Marchevsky - Presidente

Prof^a. Dr^a. Claudia Teresa Vieira de Souza

Prof^a. Dr^a. Fernanda Carvalho de Queiroz Mello

Rio de Janeiro

Dedico esta Dissertação a Deus,

pelo dom da vida.

a meus pais

pelo carinho e apoio na minha trajetória,

à minha esposa, Marcelle,

e a meu querido filho Pedro Henrique,

pelo amor.

AGRADECIMENTOS

À orientadora e amiga, Prof^ª. Dr^ª. Sonia Regina Lambert Passos, pelos valiosos ensinamentos e sugestões acuidadas.

À Direção de Bio-Manguinhos, pela oportunidade e pelas condições propiciadas à realização de uma pós-graduação profissional.

Aos Professores, Coordenadora e Secretária do MPTI, que muito contribuíram na minha valorização humana e aos meios acadêmicos para ingresso, manutenção e término do curso.

Aos Amigos, Antonio Gomes Pinto Ferreira, Gerente de Desenvolvimento de Reativos para Diagnósticos; Raouf Emile Gerhard Sykora, chefe de Produção do Departamento de Reativo para Diagnóstico e Dulce Lemos Lopes, chefe do Laboratório de Produção de Painéis Sorológicos, pelo apoio incondicional e incentivo aos trabalhos realizados.

Aos colegas do Departamento de Reativo para Diagnóstico, especialmente aos funcionários Airton Jarbas Pereira e Paulo Roberto da Rocha Aguiar, lotados no Setor de Processamento de Plasma, pelo empenho no processamento das amostras de soro canino e pela produção do painel de Avaliação Externa da Qualidade para leishmaniose visceral canina.

Ao Dr. Eduardo Tolezano do Instituto Adolfo Lutz, pelo fornecimento e caracterização dos soros caninos utilizados na realização desse trabalho.

A Dr^ª. Eliana Furtado da Fundação Ezequiel Dias e a Biotecnologista II Marcelle Bral de Mello de Bio-Manguinhos, pela caracterização das amostras de soro canino.

À Dr^ª. Luciana Tricai Cavalini e ao Dr. Renato Sergio Marchevsky, pelas importantes contribuições durante a Banca de acompanhamento da Dissertação.

Aos companheiros do Mestrado Profissional, no qual dividimos boa parte de nossas manhãs, pela cooperação e companheirismo.

Aos parentes e amigos que – de alguma maneira – participaram desta pesquisa, cuja compreensão foi importante para sua realização.

A todas as pessoas que não foram nominalmente mencionadas, mas que contribuíram para viabilizar este trabalho.

E, finalmente, a Deus, que proporcionou a mim e a minha família os meios possíveis para alcançar a felicidade.

"Qualidade significa fazer certo quando ninguém está olhando."

Henry Ford

***"Veni, vidi, vici"* ("Vim, vi, venci").**

Caio Júlio César

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	ix
LISTAS DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	01
1.1 - Histórico	01
1.2 - Complexo <i>Leishmania (Leishmania) donovani</i>	02
1.3 - Epidemiologia	03
1.4 - Classificação e morfologia	05
1.5 - Hospedeiro	06
1.5.1 - Invertebrado	06
1.5.2 - Vertebrado	07
1.6 - Transmissão	07
1.7 - A doença no cão	08
1.8 - Sinais clínicos	09
1.9 - Patogenia	10
1.10 - Resposta imune	10
1.11 - Diagnósticos parasitológicos	11
1.12 - Diagnósticos sorológicos	11
1.12.1 - Teste de ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)	12
1.12.2 - Teste de Imunofluorescência (IF)	13
1.12.2.1 - Imunofluorescência direta (IFD)	13
1.12.2.2 - Imunofluorescência indireta (IFI)	14
1.13 - Diagnósticos moleculares	14
1.14 - Avaliação Externa da Qualidade	15
2. RELEVÂNCIA DO ESTUDO	19
3. OBJETIVOS	20
3.1 - Geral	20
3.2 - Específicos	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1 - Delineamento do Estudo	21
4.2 - População Alvo.	21
4.3 - Composição dos painéis sorológicos.	21

4.4 - Variáveis de interesse	24
4.4.1 - Dependentes.....	24
4.4.2 - Independentes	24
4.5 - Plano de análise de dados	25
4.6 - Fluxo da AEQ-LVC	25
4.7 - Protocolo padrão de recalcificação	26
4.8 - Considerações éticas	26
5. RESULTADOS	28
5.1 - Perfil das instituições participantes da AEQ-LVC.....	28
5.2 - Resultados da AEQ-LVC.....	31
5.3 - Correlação com a realização de AEQ prévio.....	35
5.4 - Pesquisa Qualitativa.....	36
6. DISCUSSÃO	38
6.1 - Perfil das instituições participantes da AEQ-LVC	38
6.2 - Conformidade.....	41
6.3 - Correlação com a realização de AEQ prévio.....	43
6.4 - Pesquisa Qualitativa	44
7. CONCLUSÕES	45
8. RECOMENDAÇÕES.....	46
9. ANEXOS	47
9.1 - Carta convite	48
9.2 - Questionário.....	49
9.3 - Tabela de Resultados	54
9.4 - Carta encaminhada junto ao painel.....	57
9.5 - Respostas (na Íntegra) às questões abertas do Questionário.....	58
9.6 - Fluxograma	65
9.7 - Resultados do painel das instituições participantes.....	66
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

g	Força da gravidade
µm	Micrômetro
mm	Milímetro
AEQ	Avaliação Externa da Qualidade
aids	Acquired immunodeficiency syndrome
anti-Ig	anti-Imunoglobulina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BPF	Boas Práticas de Fabricação
BPL	Boas Práticas de Laboratório
CCZ	Centro de Controle de Zoonoses
CEP	Comitê de Ética e Pesquisa
CGLAB/SVS/MS	Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública/ Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde
CVL	Canine Visceral Leishmaniasis
DERED	Departamento de Reativos para Diagnóstico
dp	Desvio-padrão
DDT	Dicloro-difenil-tricloroetano
DAT	Direct agglutination test
ELISA	Teste imunoenzimático
FN	Falso-negativo
FP	Falso-positivo
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HTLV	Human T-Lymphotropic Viruses
IF	Imunofluorescência
IFD	Imunofluorescência Direta
IFI	Imunofluorescência Indireta
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
MS	Ministério da Saúde

OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
POP	Procedimento Operacional Padrão
Rho	Coeficiente de correlação
RP	Razão de prevalências
SFM	Sistema fagocítico mononuclear
SUCAM	Superintendência de Campanhas de Saúde Pública
WHO	World Health Organization
VN	Verdadeiro-negativo
VP	Verdadeiro-positivo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Distribuição mundial das leishmanioses	04
Figura 1.2a - Foto de microscopia ótica da forma amastigota da <i>Leishmania</i> spp.	05
Figura 1.2b - Foto de microscopia ótica da forma promastigota da <i>Leishmani</i> spp.	05
Figura 1.3 - Esquema ilustrativo da participação dos hospedeiros invertebrados e vertebrados na transmissão das leishmanioses	08

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.1 - Espécies do complexo <i>Leishmania (Leishmania) donovani</i>	03
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Principais lesões de pele na LVC	09
Tabela 1.2 - Principais sinais clínicos na LVC	09
Tabela 5.1 - Perfil das instituições participantes do Programa de Avaliação Externa Qualidade (AEQ) (N=40) em leishmaniose visceral canina (LVC).....	29
Tabela 5.2 - Número mediano (percentis 25-75) de profissionais por laboratório segundo nível de instrução e tempo em anos de experiência na execução dos testes sorológicos (ELISA e IFI) para LVC.....	30
Tabela 5.3 - Freqüência (percentual) de positividade à sorologia para LVC das instituições participantes da AEQ-LVC.....	31
Tabela 5.4 - Prevalências de conformidade das características institucionais dos participantes na AEQ-LVC	33
Tabela 5.5 - Prevalências de conformidade segundo as características estruturais dos participantes na AEQ-LVC	34
Tabela 5.6 - Correlação das variáveis independentes segundo a realização prévia ou atual de AEQ.	35
Tabela 5.7 - Correlação com participação atual ou prévia em AEQ para diferentes variáveis de estrutura e processo de 40 instituições incluídas em programa de AEQ-LVC.	36

RESUMO

No Brasil, a Leishmaniose Visceral (LV) é uma antropozoonose que representa grave problema de saúde pública, presente em 19 estados da federação, com cerca de 3.500 casos humanos anuais. O agente etiológico da LV é um protozoário do gênero *Leishmania*, cujos vetores são insetos da sub-família *Phlebotominae*, sendo o *Lutzomyia longipalpis* a principal espécie das Américas. O cão é o mais importante reservatório da doença, atuando como hospedeiro doméstico o que torna necessária maior atenção sobre o papel destes animais na transmissão da doença e conseqüente urbanização. O controle da população canina consiste, principalmente, na eliminação de cães infectados e diagnosticados por exames parasitológicos ou sorológicos positivos para a leishmaniose visceral canina (LVC). Resultados sorológicos falso-positivos e falso-negativos podem levar à eutanásia animais supostamente infectados, determinando dados epidemiológicos imprecisos. Bio-Manguinhos produz e distribui os kits de LVC mais utilizados na rede de Laboratório Público do país: incluem-se os testes imunoenzimático (ELISA) e o teste de Imunofluorescência Indireta (IFI). O objetivo desta Dissertação foi pôr em execução um Programa de Avaliação Externa da Qualidade dos testes sorológicos da LVC em instituições localizadas em áreas endêmicas do país. Distribuímos, em outubro de 2006, carta-convite e questionário de cadastramento a 51 instituições responsáveis por realizar o diagnóstico sorológico no país com 78% de adesão (40). Sendo assim, em dezembro de 2006, enviamos um painel sorológico composto por 6 amostras de soro canino, por quatro (4) amostras positivas e duas (2) amostras negativas, todas com certeza diagnóstica confirmada por ELISA e IFI, junto a um protocolo para o preenchimento dos resultados obtidos. Dos 75% laboratórios (30) que realizaram os exames, 30% (9) foram não-conformes, totalizando 10 erros. Os percentuais de resultados incorretos por metodologia obtidos nesse painel de AEQ-LVC foram 3,7% (4/108 / ELISA) e 3,4% (6/176 / IFI). As respostas dos questionários e dos resultados na sorologia dos painéis foram armazenadas em um banco de dados construído em software estatístico SPSS WIN 11.0. Apoiado nas informações do banco de dados, diversos aspectos foram analisadas (percentil, mediana, desvio-padrão). Além disso, correlações entre realização prévia em Programa de Avaliação Externa da Qualidade (AEQ) foram correlacionadas às variáveis de estrutura e processo. A maioria dos laboratórios pertence à Rede Pública, sendo estaduais pouco mais da metade (55%). Apresentam funcionários exclusivos para realização da sorologia para LVC em 70% das instituições, com metade dos serviços contando, pelo menos, com um funcionário com instrução superior. Independente do nível de instrução, a experiência dos funcionários na execução do exame de IFI aproxima-se do dobro (em média 6 anos) daquela relativa à execução do ELISA. Quanto às informações estruturais, itens ligados à qualidade demonstraram que 77,5% das instituições possuem Procedimentos Operacionais Padrão (POP); 95,0% afirmaram utilizar equipamento de proteção individual (EPI) e mais da metade (60%) dos laboratórios não calibra equipamentos e dentre esses um terço (31,3%) o faz com periodicidade irregular ou acima da anual. Por intermédio de painéis sorológicos, o AEQ-LVC pretende contribuir como importante instrumento para melhoria do desempenho dos laboratórios públicos.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is one anthropozoonose that represents a serious problem of public health in Brazil with 3.500 new annual cases in 19 states of the country. The etiological agent of VL is a protozoa of the genus *Leishmania*, whose vectors are insects of the sub-family *Phlebotominae*, being the *Lutzomyia longipalpis*, the main species found in the Americas. The dog is the most important reservoir of the parasite acting as a domestic host, demanding a greater attention on the role of these animals in the transmission of the illness and its consequent urbanization. The control of the canine population consists mainly in the elimination of infected dogs, diagnosed by parasitological examinations or positive serological tests for canine visceral leishmaniasis (CVL). False-positive and false-negative serological results may lead to the euthanasia of supposedly infected animals and the attainment of imprecise epidemiological data. Bio-Manguinhos produces and distributes the most consumed kits for CVL used in Brazil's public laboratory network including immunoenzyme (ELISA) and indirect immunofluorescence (IFI) tests. The objective of the present study was to initiate a Program of External Quality Assessment (EQA) for CVL serological tests, in institutions located in endemic areas of the country. In October 2006, an invitation letter together with an enrollment form was sent to 51 institutions responsible for the serological diagnosis in the country to which 78% (40) had adhered. In December 2006, along with a protocol to be fulfilled with the results a serological panel was sent containing: four (4) positive and two (2) negative samples of canine serum, all of them confirmed by ELISA and IFI. Of the 30 (75%) laboratories that performed the exams, 9 (30%) were not in agreement, totalizing 10 errors. The percentage of incorrect results by methodology obtained for this EQA-CVL panel was 3,7% (4/108) for ELISA and 3,4% (6/176) for IFI. The information obtained from the serological panel results was stored in a data bank, constructed in SPSS WIN 11.0 statistical software. Based on this data bank, some statistical were analyzed. Furthermore, correlations between previous programs of external quality assessment (EQA) were performed to compare structural and process variables. The majority of the laboratories belong to the public network with more than a half (55%) belonging to the state. Exclusive employees that perform CVL serology were found in 70% of the institutions and half of the services possess at least one employee with superior instruction. Independently of the instruction level, the employees experience on IFI is about 2 times greater (6 years) than that related to ELISA tests. Concerning structural information, quality related items showed that 77,5% of the institutions possess Standard Operating Procedures (SOP), 95,0% use Individual Protection Equipment (IPE), more than a half (60%) do not calibrate equipments and amongst the ones that do the calibration, one-third (31,3%) make it with irregularly or over annual periodicity. Through serological panels, the EQA-CVL might contribute as an important instrument to improve the performance of public laboratories.

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Histórico

A Leishmaniose Visceral (LV) foi descrita em 1835, na Grécia, como uma doença febril que acometia principalmente crianças, acompanhada de anemia e esplenomegalia, conhecida como “ponos” (Deus da dor, na mitologia grega). Em 1869, na Índia, foi denominada “Kala-jwar” (febre negra) ou “Kala-azar” (Calazar) que tem o significado de pele negra, em alusão ao escurecimento característico da pele, facilmente notado em indianos de pele clara (Marzochi, 1981).

O patologista escocês William Boog Leishman, em 1900, verificou o óbito de um soldado inglês, em Bengal (Índia), acometido de uma febre local denominada como febre “dum-dum”. Descreveu a presença de estruturas ovais com aproximadamente 2 a 3 micrômetros (μm) de diâmetro, em um esfregaço de sangue obtido do paciente. Em 1903, o capitão James Donovan, por sua vez diagnosticou, em esfregaços da polpa esplênica, estruturas ovais semelhantes àqueles observados por Leishman que, inicialmente, correspondiam ao agente etiológico da doença. O protozoário foi denominado *Leishman-Donovan* e posteriormente *Leishmania donovani*. Ainda em 1903, Laveran & Mesnil o descreveram com o nome de *Piroplasma donovani* (Neves, 2003).

O médico John Sinton, na Índia, observou ainda que a doença ocorria de forma endêmica, em locais definidos, porém com uma distribuição geográfica dispersa. Ao comparar a área de distribuição de insetos hematófagos e pessoas com a Calazar, apontava para os flebotomíneos hematófagos (*Phlebotomus argentipes*) coexistindo com a doença. Apoiado nessa constatação, Sinton publicou relatos, entre 1924 e 1925, detectando o inseto como vetor da *Leishmania donovani* (Chelala, 2004).

No Brasil, o primeiro registro de Calazar ocorreu em 1913. O caso foi descrito pelos achados de necropsia de um imigrante italiano que vivia em Santos (São Paulo) (Alencar et al., 1991).

Em 1934, Penna – estudando fragmentos de fígado obtidos por viscerotomia em cadáveres de indivíduos suspeitos de febre amarela no Brasil – iniciou levantamento de casos de Calazar. Diagnosticaram-se 41 casos de LV em

47 mil indivíduos pesquisados. O maior número de casos confirmados era proveniente da Região Nordeste do Brasil (Cunha, 1942).

A expansão da ocorrência de casos humanos registrados até 1934 coincidiu com os primeiros diagnósticos de laboratório de Calazar canino. Os cães foram encontrados infectados em todos os focos da doença humana. Reconheceu-se, assim, que o cão era importante na disseminação da LV (MS, 2003).

Deane & Deane (1954a), então, identificaram que a raposa *Lycalopex vetulus* atuava como reservatório silvestre no Brasil e, posteriormente, demonstraram que o inseto (flebótomo) *Phlebotomus longipalpis* era responsável pela transmissão da *Leishmania chagasi*. Sugeriram o uso do inseticida dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) para o combate ao inseto vetor, para interromper o ciclo da doença (Deane & Deane, 1954b).

O primeiro caso autóctone de leishmaniose visceral no Município do Rio de Janeiro foi diagnosticado em 1977 em um homem residente na localidade do Rio da Prata, no bairro de Bangu. Na década de 80, devido à ocorrência de novos casos humanos em bairros vizinhos (Realengo, Senador Camará, Campo Grande), o Ministério da Saúde, por intermédio da extinta Superintendência de Campanhas de Saúde Pública (SUCAM), realizou inquérito sorológico canino, (para a leishmaniose canina), abrangendo todas as áreas onde foram encontrados casos humanos de LV (Marzochi et al., 1985).

A prevalência do Calazar canino e a incidência em áreas de casos humanos (Bangu, Realengo, Senador Camará) decresceu de 4,3% em 1982/1983 para 0,38% em 1989 (Nunes et al., 1991).

1.2 - Complexo *Leishmania (Leishmania) donovani*

O complexo *L. (L.) donovani* compreende as espécies causadoras da leishmaniose visceral (Quadro 1.1). No Velho Mundo está representada pela *Leishmania (Leishmania) donovani* e a *Leishmania (Leishmania) infantum*. Na América Latina, o agente etiológico é a *Leishmania (Leishmania) chagasi*, tendo recebido esta denominação em homenagem ao dr. Carlos Chagas. A *L. (L.) chagasi* apresenta estreita homologia genética e imunológica com a *L. (L.) infantum* e epidemiológica com a *L. (L.) donovani* na China (Ferreira et al., 2003; Neves, 2003).

Quadro 1.1 - Espécies do complexo *Leishmania (Leishmania) donovani*

Espécie	Foco de maior incidência	Hospedeiros	Características	Vetor
<i>L. (L.) donovani</i>	África Oriental, Índia e China	Homem	Forma visceral e leishmaniose dérmica pós-calazar em adultos	<i>Phlebotomus argentipes</i>
<i>L. (L.) infantum</i>	Mediterrâneo, Oriente Médio, Europa, África e China	Homem e Cão	Forma visceral em crianças	<i>Phlebotomus perniciosus</i>
<i>L. (L.) chagasi</i>	América do Sul e Central	Homem e Cão	Forma visceral em crianças	<i>Lutzomyia longipalpis</i>

(Adaptado de Genaro, 1995)

1.3 - Epidemiologia

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), as Leishmanioses afetam cerca de dois milhões de pessoas por ano, com 500 mil casos da forma visceral. Estimativas indicam, ainda, que cerca de 350 milhões de pessoas estão expostas ao risco de infecção. Ressalte-se que o Calazar é uma doença que ocorre em diversas regiões do mundo (Figura 1.1), identificando-se diferentes espécies de leishmanias (Singh, 2006). Na Índia, Bangladesh, Nepal e parte da China, ocorrem o Calazar do tipo indiano, conhecido pelo acometimento da pele na maioria dos casos, tendo os humanos adultos como reservatório determinado pela *L. (L.) donovani* (Alencar et al., 1991).

Já o Calazar do Mediterrâneo é encontrado na África, Arábia e Costa do Mediterrâneo, O agente etiológico é a *Leishmania infantum*, cujo alvo mais freqüente são os gânglios linfáticos. O homem é considerado um hospedeiro acidental e as infecções são quase totalmente limitadas às crianças menores de cinco anos de idade. Do Sul do México até o Norte da Argentina, com exceção do Chile, temos a ocorrência do Calazar americano.

No Brasil, contabilizam-se 90% de todos os casos. Nos locais em que ocorre, o agente causador é a *L. (Leishmania) chagasi*, a qual acomete principalmente crianças e adultos jovens. Como reservatórios silvestres podemos citar as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os gambás (*Didelphis*

marsupialis e *D. albiventris*) e, entre os reservatórios urbanos podemos destacar os cães e o homem (Neves, 2003).

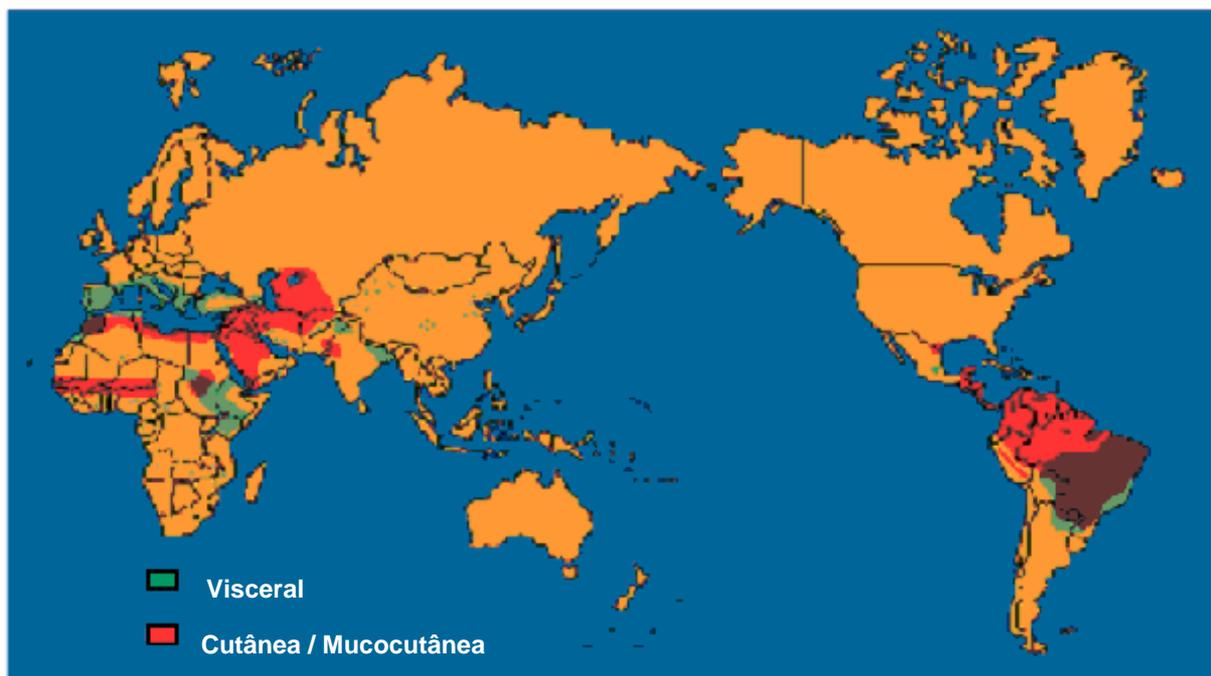


Figura 1.1 - Distribuição mundial das leishmanioses. Adaptado: <http://www.wehi.edu.au/research/divisions/inf/labs/handman/leishmaniasis.htm>

Dentre as principais áreas endêmicas da LV, no Continente Americano, em 19 Estados da Federação, destaca-se o Brasil, em que são notificados anualmente mais de 3.500 casos de LV. Até a década de 90, a Região Nordeste concentrou a maior incidência e contribuiu com 90% dos casos registrados no país (Lacerda, 1993; Marzochi, 1993; Gontijo & Melo, 2004). A doença apresenta caráter endêmico-epidêmico com casos distribuídos desde Roraima até o Paraná. Embora seja predominantemente rural, vem sofrendo um processo de urbanização: cidades de médio e grande porte têm apresentado algumas epidemias, como, por exemplo, São Luís (Maranhão), Teresina (Piauí), Natal (Rio Grande do Norte), Belo Horizonte (Minas Gerais) Montes Claros (Minas Gerais) e Rio de Janeiro (Cabrera, 1999; Alves & Bevilacqua, 2004; Gontijo & Melo, 2004).

Os fatores que determinam os níveis epidêmicos de LV, nos grandes centros urbanos, são a proximidade do convívio do homem com o reservatório canino, bem como o aumento do desmatamento e da densidade populacional do vetor. Soma-se a esses fatores o processo migratório constante (Monteiro et al., 2005).

1.4 - Classificação e morfologia

É um protozoário tripanosomatídeo do gênero *Leishmania* de parasitismo intracelular obrigatório nas células do sistema fagocítico mononuclear (SFM). Apresenta semelhanças morfológicas entre as diversas espécies existentes.

A forma aflagelada ou amastigota está presente nos tecidos dos vertebrados, especialmente em macrófagos, podendo variar de localização no hospedeiro. Medem, de modo geral $3,7 \times 2,1 \mu\text{m}$ (Figura 1.2a). Nos canídeos reservatórios (cães e raposa), os protozoários são encontrados em número elevado na pele do animal. Apresentam a forma arredondada ou ovóide com núcleo grande, oval e excêntrico; junto ao núcleo encontra-se uma estrutura denominada cinetoplasto (extensão da mitocôndria), rica em DNA mitocondrial, o kDNA (Genaro, 1995; Ferreira et al., 2003; Neves, 2003).

A forma flagelada ou promastigota é alongada, também apresentando cinetoplasto na base do flagelo, formado de feixes paralelos de microtúbulos, envoltos em uma bainha citoplasmática. São encontradas livres no trato digestivo médio e anterior do inseto e medem, de modo geral $18,7 \times 1,6 \mu\text{m}$ (Figura 1.2b).

No Novo Mundo, a *Leishmania (Leishmania) chagasi* é a espécie comumente isolada em pacientes e no cão (Genaro, 1995; Ferreira et al., 2003; Neves, 2003).

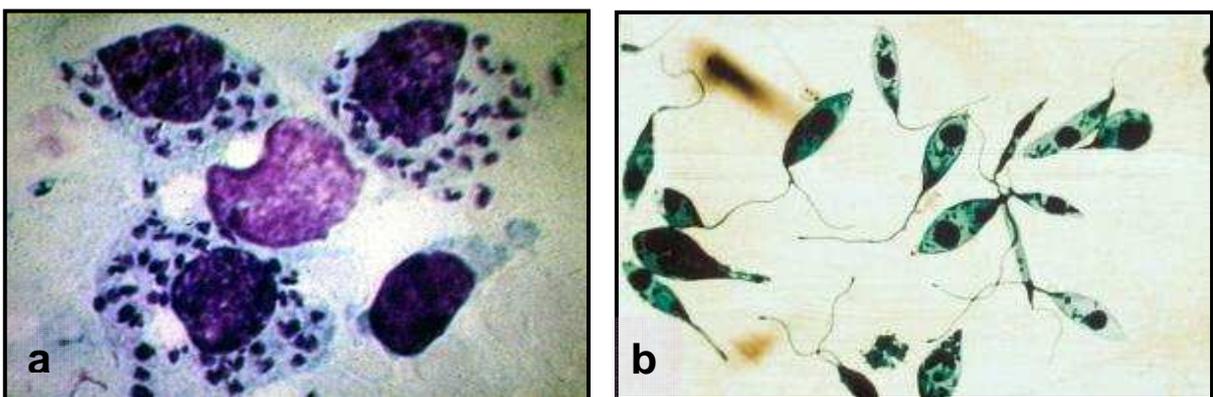


Figura 1.2 - a) foto de microscopia ótica da forma amastigota da *Leishmania spp.* Fonte: www.fcfrp.usp.br b) foto de microscopia ótica da forma promastigota da *Leishmania spp.* Fonte: www.parasitologie.univ-montp1.fr

1.5 – Hospedeiro

1.5.1 - Invertebrados

A Leishmaniose Visceral é uma antropozoonose. Os vetores são insetos da sub-família Phlebotominae, sendo o *Lutzomyia longipalpis* a principal espécie das Américas (Rey, 2002) e considerada, por muito tempo, como a única transmissora da doença.

Porém, Barata et al. (2004) e Marcondes et al. (1998) respectivamente, demonstraram a participação do *Lutzomyia cruzi* como vetor no estado do Mato Grosso do Sul e o *Lutzomyia intermedia*, no litoral do município do Rio de Janeiro. Já o *Lutzomyia longipalpis* está distribuído de forma ampla, sendo encontrado principalmente em quatro das cinco regiões geográficas do país: Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste (Missawa & Lima, 2006).

O *Lutzomyia longipalpis*, conhecido popularmente como “mosquito palha”, mede aproximadamente 2 mm de comprimento, tem o corpo revestido por finas cerdas de coloração clara. É reconhecido pela característica de voar em pequenos saltos e pousar com as asas entreabertas (MS, 2003).

Estes insetos, na fase adulta, estão bem adaptados a diversos ambientes, contudo – na fase larvária – necessitam de baixa incidência de luz e solo úmido e rico em matéria orgânica para garantir a alimentação das larvas. O *Lutzomyia longipalpis* é geralmente encontrado (em ambiente domiciliar e no peridomicílio) próximo a suas fontes de alimento. As fêmeas têm hábitos antropofílicos, pois necessitam de sangue para desenvolvimento dos ovos. Durante a alimentação, introduzem no hospedeiro, pela saliva, um potente peptídeo vasodilatador (maxidilas) que produz vermelhidão capaz de aumentar a infectividade dos promastigotas e influenciar o curso da infecção (Marzochi et al., 2002; Lainson & Rangel, 2005).

A criação de animais domésticos como cães, galinhas e cavalos nos terrenos possibilita fonte abundante de alimentação para o flebotomíneo e pode contribuir para o aumento da densidade da população de vetores (Arias et al., 1996).

1.5.2 - Vertebrados

Numerosos investigadores acreditam que a leishmaniose visceral era em sua origem uma infecção que circulava de forma enzoótica, ou seja, constante entre animais silvestres, como, por exemplo, canídeos ou roedores e que logo, ao incluir cães domésticos no ciclo, torna-se sinantrópica, sendo assim próxima aos homens (Acha & Szyfres, 1989).

Os reservatórios silvestres mais importantes no Brasil são a raposa e marsupiais, que agem como mantenedores do ciclo da doença silvestre. Os cães estão envolvidos como reservatórios domésticos nos ciclos domiciliares e peridomiciliares, devido à sua associação aos ambientes alterados, indicando degradação ambiental. O homem também pode ser fonte de infecção, principalmente quando o Calazar incide sob a forma de epidemia.

Os cães infectados podem (ou não) desenvolver quadros clínicos da doença, cujos sinais são emagrecimento, eriçamento e queda de pêlos, nódulos ou ulcerações (mais freqüentes nos bordos das orelhas), hemorragias intestinais, paralisia de membros posteriores, ceratite com cegueira e caquexia e, nos casos mais graves, o óbito. O reconhecimento das manifestações clínicas destes reservatórios é importante para adoção de medidas de controle da doença. Os canídeos apresentam também intenso parasitismo cutâneo, o que permite uma fácil infecção do vetor e, por este fato, são os mais importantes elos na manutenção da cadeia epidemiológica (Costa et al., 1990; Evans et al., 1992; Marzochi & Marzochi, 1994).

1.6 - Transmissão

Os vetores se infectam ao ingerirem células parasitadas por formas amastigotas durante o repasto sangüíneo. Além do homem, diversos mamíferos (cotias, pacas, raposas, roedores de pequeno porte) naturalmente infectados, constituem também fontes de infecção (Figura 1.3). As amastigotas ingeridas se transformam em promastigotas no tubo digestivo e multiplicam-se rapidamente na luz intestinal dos flebotomíneos (Marzochi et al., 2002).

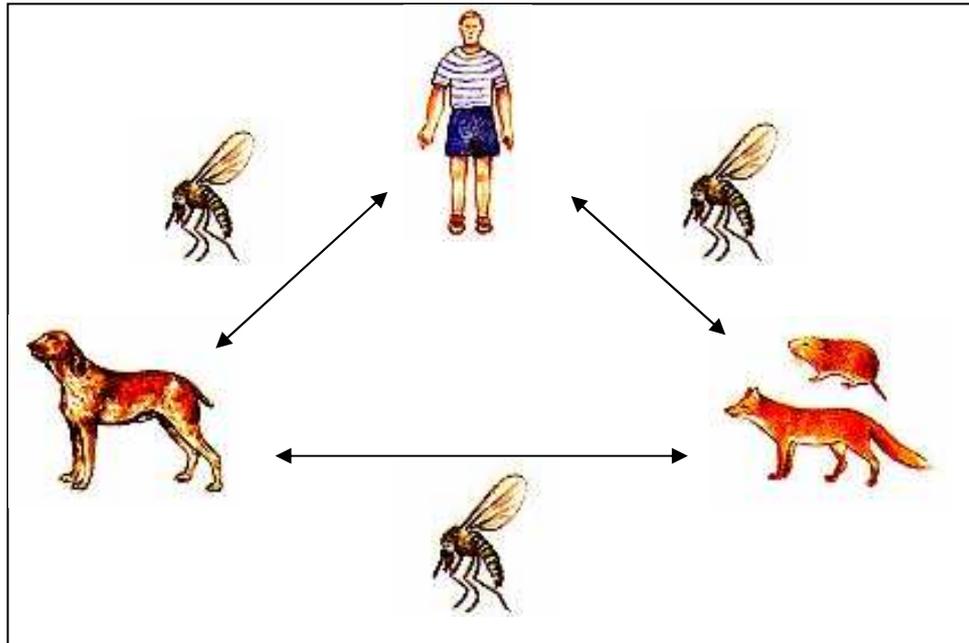


Figura 1.3 - Esquema ilustrativo da participação dos hospedeiros invertebrados e vertebrados na transmissão das leishmanioses.
 Adaptado: <http://www.geocities.com/CollegePark/Classroom/6137/leishhp.html>

A enfermidade em um hospedeiro vertebrado ocorre quando a fêmea de um flebotomíneo parasitado, ao realizar o repasto sanguíneo, acaba liberando formas promastigotas metacíclicas junto com a saliva. Já na epiderme, os parasitos são imediatamente fagocitados por células SFM nos vacúolos parasitóforos. Transformar-se-ão em amastigotas e se multiplicarão por intermédio de fissão binária, ocasionando o rompimento da célula hospedeira, liberando amastigotas que serão novamente fagocitados por macrófagos vizinhos em um processo contínuo, ocorrendo assim a disseminação hematogênica a outros tecidos, como linfonodos, fígado, baço e medula óssea (Ferreira et al., 2003; Markell et al., 2003).

1.7 - A doença no cão

Segundo Genaro (1995), a infecção no cão apresenta o mesmo espectro clínico que a infecção humana, o período de incubação oscila de 3 meses a alguns anos com média de 3 a 7 meses. O quadro clínico varia do aparente estado sadio a um estágio terminal. A LVC apresenta sinais característicos, como lesões cutâneas, em particular na região nasal e orelha, pequenas úlceras rasas,

localizadas mais freqüentemente nas orelhas, focinho, cauda e articulações e queda dos pêlos. Em uma fase mais avançada da doença, ocorre onicogrifose, esplenomegalia, linfadenopatia, alopecia, dermatites, úlceras de pele, ceratoconjuntivite, coriza, apatia, diarreia, hemorragia intestinal, edema de patas e vômito, além de hiperqueratose. Na fase final da infecção, ocorre, em geral, paresia dos membros posteriores, inanição, caquexia e morte.

1.8 – Sinais clínicos

O Calazar canino apresenta diversas características clínicas. O período de incubação pode variar de 3 meses a 2 anos. A doença em cães, com manifestações clínicas, evoluem para óbito em um ano em 88% dos casos. Contudo, nos cães assintomáticos este percentual de óbito é reduzido para 18%, apresentando cura espontânea (negativação nos teste sorológico) em 52% dos casos (Genaro, 1995).

Tabela 1.1 - Principais lesões de pele na LVC

Tipos de lesões na pele	Percentual de cães com LVC
Dermatites esfoliantes	56 - 64,1
Ulcerações	34,4 - 40
Anormalidade nas unhas	20 – 30,5
Hiperkeratose nasal	18,8
Hiperkeratose digital	14,1
Nódulos	2,3 - 6

(Adaptado de Ciaramella et al., 1997; Slappendel & Ferrer, 1998 e Koutinas et al., 1999)

Tabela 1.2 - Principais sinais clínicos na LVC

Sinais clínicos	Percentual de cães com LVC
Envolvimento da pele	81 - 89
Linfadenomegalia	65,2 - 90
Palidez nas mucosas	58
Sinais oculares	18
Emagrecimento / Caquexia	10,1 – 47,5
Esplenomegalia	9,5 – 53,3
Febre	4 – 36

(Adaptado de Ciaramella et al., 1997; Slappendel & Ferrer, 1998 e Koutinas et al., 1999)

1.9 – Patogenia

A partir do momento da picada do flebotomíneo, ocorre a inoculação de formas promastigotas na corrente sangüínea do hospedeiro. Conseqüentemente há a reação inflamatória local, com a formação de um nódulo, sendo pouco descrita essa etapa no Calazar por ser uma reação transitória. Após essa etapa as formas promastigota se modificam para amastigotas, por serem resistentes a temperaturas mais elevadas, e a seguir se disseminam pelo sistema fagocítico mononuclear (SFM) para a medula óssea, linfonodos, baço e fígado (visceralização). Esses órgãos sofrem hiperplasia para responder à injúria. Está descrita a presença de macrófagos infectados em outros órgãos, tais como: sangue, pele, testículos, intestinos, pulmões e rins (Alencar et al., 1991; Genaro, 1995).

1.10 – Resposta imune

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença sistêmica grave, cujas manifestações clínicas estão intimamente ligadas ao tipo de resposta imunológica expressa pelo cão infectado. A LV sintomática em cães tem sido associada a mudanças imunológicas, envolvendo células T, tais como: ausência *in vitro* da produção de interferon- γ e de IL-2 por células mononucleares do sangue periférico.

Associa-se a resistência a LVC à ativação de células Th1, produzindo IFN- γ , IL-2 e TNF- α . O principal mecanismo efetor envolvido na resposta protetora de cães infectados pela *L. (L.) infantum* é a ausência de hipersensibilidade para antígenos de leishmania; diminuição de células T no sangue periférico; ativação de macrófagos pelo IFN- γ e TNF- α para destruir amastigotas intracelulares. O papel das citocinas do tipo Th2 na LVC ainda não tem sido bem definido, porém, em humanos, a infecção pela *L. (L.) chagasi* está associada com a produção de IL-10. Correlacionada com a patologia, as subclasses de IgG1 e IgG2 tem sido utilizadas como o mais adequado indicador para LVC do que a IgG total. Altos níveis de anticorpos IgG1 estão relacionados com manifestações clínicas, enquanto as IgG2 estão associados à infecção assintomática (Barbieri, 2006).

1.11 – Diagnósticos parasitológicos

O diagnóstico parasitológico é o método que mais certeza possibilita ao profissional. Apóia-se na demonstração das formas amastigotas nos tecidos ou no isolamento do microorganismo pelos métodos de cultura. Embora relativamente simples, são métodos invasivos, que implicam em riscos para o animal e tornam-se impraticáveis em programas de Saúde Pública, graças ao grande número de animais avaliados em um curto tempo (Neves, 2003). A especificidade do método atinge cerca de 100%, porém a sensibilidade é de aproximadamente 80% nos cães sintomáticos (Genaro, 1995).

O aspirado de medula óssea esternal é o procedimento mais seguro e indicado, pois apresenta técnica pouco complexa e porcentagens consideráveis de resultados positivos (visualização de amastigotas) em 55 a 86% dos casos. Cultura de células do baço apresenta maior sensibilidade (95 a 97%), porém com maior risco de hemorragias. Culturas de células da medula óssea (90%) e de sangue podem revelar o parasita (Alencar et al., 1991).

Já a punção hepática é desaconselhável por causa da pouca quantidade de parasitos encontrados nesta técnica, porém estudos mais recentes asseguram que tal técnica é indicada para obtenção de parasitas localizados no fígado para culturas aplicadas ao diagnóstico da LVC ou coleta de amostras para realização da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) (Barrouin-Melo et al., 2006).

1.12 – Diagnósticos sorológicos

As técnicas de diagnóstico sorológico são instrumentos indispensáveis para a detecção de IgM e IgG para o Calazar. O diagnóstico da LVC deve sempre ser interpretado em conjunto com informações clínicas, epidemiológicas e laboratoriais. Destacam-se os testes utilizados para o diagnóstico sorológico da LV: teste de aglutinação direta (DAT); teste de imunofluorescência indireta (IFI), teste de ELISA (Teste imunoenzimático) e o teste de immunoblot (Alves & Bevilacqua, 2004).

Atualmente os dois métodos sorológicos mais utilizados no país em programas de controle de LV são o teste de ELISA e a IFI.

1.12.1 - ELISA (Teste imunoenzimático)

Consiste na reação de soros com antígenos de *Leishmania* obtidos a partir de cultura *in vitro*, previamente adsorvidos nas cavidades de microplacas/strips (fase sólida). Uma etapa subsequente consiste na adição dos soros-controle do teste e das amostras a serem analisadas, devidamente diluídos. Possuindo anticorpos específicos, eles irão se ligar aos antígenos. Em uma nova etapa, adiciona-se uma anti-imunoglobulina de cão marcada com a enzima peroxidase e esta se ligará aos anticorpos caso estejam presentes (Voller et al., 1974).

Para evidenciar a reação, utiliza-se uma substância cromógena (tetrametilbenzidina – TMB ou OPD). A ação da peroxidase com o peróxido de hidrogênio forma um composto. Esta reação é interrompida ao adicionarmos o ácido sulfúrico, passando então a apresentar em caso positivo (reagente) uma coloração amarela. Nas cavidades em que não houver anticorpos específicos, a reação será negativa (não-reagente), ou seja, não haverá desenvolvimento de cor. O resultado é expresso de acordo com a densidade ótica, em unidades de absorvância a um raio de luz, em uma reação com diluições fixas. Serão consideradas amostras reagentes as que apresentarem a densidade óptica igual ou superior ao valor do *cut-off* e serão consideradas não reagentes as com valor inferior (Voller et al., 1976). Esta técnica é amplamente utilizada como um teste diagnóstico sorológico devido à simplicidade de automação, ao custo relativamente baixo e acurácia satisfatória com sensibilidade (99,5%) e especificidade (97,1%).

Visando ao aprimoramento de teste diagnóstico para detecção da LVC, por meio de um incremento nos parâmetros de sensibilidade e especificidade, algumas proteínas recombinantes têm sido analisadas principalmente pela técnica de ELISA, como por exemplo, a rGBP (Maalej et al., 2003), desenvolvida para *L. (L.) donovani*; a rORFF (Raj et al., 1999) para *L. (L.) infantum* e as rgp63 (Maalej et al., 2003), rK9 (Bhatia et al., 1999), rK26 (Rosário et al., 2005) e rK39 (Burns Junior et al., 1993) para *L. (L.) chagasi*.

A rK39 ocupa um lugar de destaque na literatura devido as suas altas sensibilidade e especificidade no diagnóstico da LV expressas nos inúmeros resultados que variam de 99,4% e 99,6%, (Scalone et al., 2002), 99% e 100% (Badaró et al., 1996) até 90% e 100% (Carvalho et al., 2003).

O teste de ELISA mais utilizado atualmente no mercado nacional é o EIE – Leishmaniose Visceral Canina. Foi desenvolvido e produzido por Bio-Manguinhos, utilizando a cepa JOF – *leishmania major-like*, fornecida pelo centro de referência regional para leishmaniose da Escola Nacional de Saúde Pública/Fiocruz. Tal conjunto diagnóstico é distribuído a todos os laboratórios da rede pública do país. A padronização do teste foi realizada por Bio-Manguinhos em associação com o Instituto Adolfo Lutz (IAL-SP) (Ferreira et al., 2000).

1.12.2 – Teste de Imunofluorescência (IF)

A IF é um procedimento em que as reações antígeno-anticorpo são observadas por microscopia por meio da utilização de um anticorpo (específico ou não), marcado com fluorocromo (fluoresceína ou rodamina). Os complexos imunes contendo estes anticorpos marcados podem ser detectados pela emissão de luz fluorescente, quando excitadas por uma luz de menor comprimento de onda. A luz emitida pode ser observada com o auxílio de um microscópio de fluorescência. Os fluorocromos podem ser conjugados às regiões Fc de uma molécula de anticorpo, sem afetar a sua especificidade (Madigan et al., 2000).

1.12.2.1 – Imunofluorescência direta (IFD)

A IFD geralmente utiliza anticorpo policlonal, e eventualmente anticorpos monoclonais marcados com fluoresceína para detecção de antígenos. A IF direta tem como vantagens a rapidez e simplicidade. Moreira et al. (2002) verificaram que embora a pesquisa direta de parasitos na LVC em aspirado de linfonodos seja considerado um diagnóstico de certeza (50%), ocorreu aumento na positividade quando as amostras foram submetidas a técnica de IFD (93,4%).

1.12.2.2 – Imunofluorescência indireta (IFI)

Os parasitos (antígenos) são fixados em lâminas e incubados com o soro que se deseja testar, sendo posteriormente tratados com um outro soro que contenha anticorpos específicos para imunoglobulina humana (anti-Ig) conjugada a um fluorocromo, como a fluoresceína. A presença de anticorpos é revelada por meio de microscopia de fluorescência, que utiliza incidência de luz azul e ultravioleta para a leitura.

Será considerado então como reagente o aparecimento de coloração esverdeada, resultado da fluorescência emitida pela fluoresceína, enquanto a ausência de fluorescência será interpretada com não-reagente e os parasitas apresentam somente uma coloração avermelhada (Dufflo, 1989). Da mesma forma que o teste de ELISA o teste para IFI – Leishmaniose Visceral Canina é, atualmente, o mais utilizado. Também foi desenvolvido e produzido por Bio-Manguinhos. O conjunto diagnóstico é distribuído assim como o teste de ELISA (EIE-Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos) a todos os Laboratórios da Rede Pública do país.

1.13 – Diagnósticos moleculares

Com a tecnologia de DNA recombinante, as técnicas moleculares passaram a ser comumente utilizadas para diagnóstico, além de identificação e classificação das espécies de *Leishmania* por intermédio da detecção de ácidos nucléicos específicos do parasito (Marfurt et al., 2003; Minodier et al., 1997).

A técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) é altamente específica, e sensível quando comparada a outros métodos convencionais (Ikonopoulou et al., 2003). É indicada em casos de cães infectados em áreas endêmicas, particularmente assintomáticos, apresentando resultados negativos ou com baixa positividade em kits comerciais (Berrahal et al., 1996). A PCR pode ser utilizada em qualquer amostra biológica, como pele, baço, linfonodo, sangue, fígado e medula óssea (Andrade et al., 2006, Manna et al., 2004). Porém, ainda seu uso está restrito a pesquisa.

Segundo Wortmann et al. (2001), a técnica de RT-PCR (PCR-Transcriptase reversa) é usada para análise qualitativa e quantitativa dos parasitos, por meio de

fluorescência. Apresenta algumas vantagens quando comparada ao método de PCR convencional não ocorre a amplificação de *primer* não específicos; não é necessária a utilização de géis ou hibridização e a chance de contaminação é reduzida, pelo fato de todo processo ser automatizado e realizado em tubo fechado.

1.14 – Avaliação Externa da Qualidade

A AEQ é um instrumento efetivo para identificar problemas em um determinado processo nos laboratórios e fornece uma visão objetiva do desempenho de outros laboratórios. São importantes ações de qualidade, abrangendo a avaliação do laboratório de forma ampla. Envolve a área de pessoal; calibração de instrumentos; documentação e, em um segundo nível, direciona-se à demonstração real dos resultados produzidos pelos laboratórios (Boley, 2004).

Ora, a AEQ deve ser introduzida nas práticas laboratoriais como parte de um processo contínuo de melhorias. Entretanto, não deve ser utilizada como avaliação de competência individual dos membros de uma equipe de profissionais, devendo ser avaliado primeiramente todo o processo de operação de cada etapa do serviço do laboratório (WHO, 2004). As amostras utilizadas em uma AEQ poderão ser utilizadas na elaboração de treinamento para os funcionários, a fim de identificar a necessidade de algum treinamento individual para um determinado profissional (Libeer et al., 2002).

O forte caráter educativo de um AEQ reduz o temor das ações punitivas em caso de erros porque valoriza a importância de encorajar a equipe técnica para assumir a responsabilidade pelo seu trabalho, estimular não só o orgulho pelos resultados corretos, como também a melhora se os resultados não forem tão satisfatórios, implementando ações corretivas a serem observadas em futuras avaliações, ratificando assim a sua utilização (Boley, 2004).

As instituições participantes devem fazer com que todos os funcionários se envolvam efetivamente em uma AEQ. Esta atitude gera comprometimento de toda a equipe com o programa, ampliando o objetivo educacional, analisando todo o processo de qualidade de forma criteriosa o qual compreende sua participação com os resultados esperados, em uma visão ampliada e não

focalizada em um único funcionário. Nos casos de constatação de resultados discordantes, medidas corretivas deverão ser discutidas, analisadas e posteriormente implementadas (Brookman et al., 2004).

O objetivo em uma AEQ para testes sorológicos é investigar a presença (ou ausência) de um determinado analito (antígeno, anticorpo, microorganismo, entre outros) avaliando a competência dos laboratórios em analisar as amostras encaminhadas e tendo, como foco principal, a identificação de qualquer resultado falso-positivo e/ou falso-negativo (Counotte et al., 2000; Simonet, 2005).

A participação em Programas de Avaliação Externa da Qualidade deve ser direcionada de forma mais ampla, ou seja, além da participação em Programas de AEQ organizadas em âmbito nacional, faz-se cada vez mais necessária a participação em AEQ sob administração internacional. Esta nova condição aumenta sensivelmente a credibilidade de uma instituição (Carter et al., 2002).

É Noble (2002) quem afirma que o material ideal para ser utilizado em um AEQ são amostras as mais realistas possíveis, devendo nelas ser evitadas qualquer tipo de alterações (o soro sem a adição de qualquer tipo de conservante ou liofilização). A conversão de plasma em soro pode ser feita por intermédio de adição de íons de cálcio, formando coágulos de fibrina que são retiradas do soro por intermédio de centrifugação. É fundamental que todas as amostras utilizadas em uma AEQ sejam devidamente caracterizadas por centros reconhecidos como de referência, utilizando o maior número possível de testes disponíveis (Middle et al., 1998).

A participação em uma AEQ envolve a realização de um painel de amostras. Cada laboratório participante recebe um conjunto de amostras que deverão ser introduzidos em sua rotina de testes (sorologia) de modo a garantir que o seu desempenho na AEQ reflita exatamente a sua conduta na rotina de serviço do laboratório. O supervisor deve verificar as condições dos resultados de sua responsabilidade antes de serem emitidos, levando em consideração alguns fatores que podem contribuir para um erro de desempenho, como metodologias deficitárias ou falhas em equipamentos.

Ao finalizar os testes nas amostras, cada laboratório deve encaminhar seus resultados à instituição responsável pela análise e consolidação dos resultados, para elaboração de relatórios que descrevam o desempenho individual da instituição participante, preservando seu anonimato. O relatório – com o resultado global de todas as instituições que participaram da AEQ – não as identificam

nominalmente, mais, sim, por um código numérico com a finalidade de manter o sigilo dos resultados (acertos e erros) de cada instituição (Boley, 2004; WHO, 2004).

É importante que o fluxo de resultados entre organizador e laboratório, inclusive a análise dos dados obtidos com uma AEQ, seja distribuído aos participantes de forma rápida e dinâmica. Diante disso, faz-se necessária, a introdução de um sistema de informação no qual a internet possa ser utilizada como instrumento para dinamizar o processo – os resultados são compartilhados no menor tempo possível. O sistema informatizado pode permitir a atuação do organizador com foco na área educacional por meio da disponibilidade de textos, esclarecimento de dúvidas e disponibilidade de acesso a outros endereços eletrônicos (Brookman et al., 2004).

Com a utilização de um sistema informatizado, os resultados são registrados eletronicamente, por funcionários da instituição participante, ou seja, logo após a entrega do painel para AEQ, é estabelecido um prazo para que os participantes acessem a “home-page” utilizando senha de cadastro da instituição e digitando seus resultados com sigilo e segurança. Ao terminar o prazo para envio dos resultados, o acesso dos participantes é restringido.

A partir desse ponto, os relatórios global e individual das instituições – com todos os dados analisados em poucos dias – estariam disponíveis para serem acessados também por intermédio da “home-page”. O investimento neste processo evita alguns aspectos negativos como a) demora no recebimento dos resultados e emissão de relatórios via correio; b) a conseqüente não-inserção dos resultados no computador do organizador de forma manual; c) a diminuição da probabilidade de erro durante a digitação dos resultados por parte do organizador e d) o aumento no custo final do produto, por manter funcionário empenhado exclusivamente em digitar os resultados por um longo período de tempo (Albert et al., 1998).

A participação dos laboratórios em um Programa de AEQ, depois de alguns anos, oferece várias informações que servem de parâmetro para análise de algumas questões como, por exemplo:

- 1) comparação dos seus resultados (desempenho) em relação aos resultados consolidados dos outros laboratórios participantes;

- 2) identificação de problemas relacionados ao processo operacional do laboratório, das técnicas e dos seus reagentes;

- 3) informação e educação para melhoria contínua do desempenho;
- 4) reforço na utilização de BPL e
- 5) aumento na credibilidade no serviço do laboratório.

Além dos benefícios citados, podemos destacar uma variedade de informações baseadas nos resultados, utilizadas como subsídio para implementação de ações de regulação pelas autoridades sanitárias (Carter et al., 2002; Peddecord & Cada, 1980).

O Programa de Avaliação Externa da Qualidade - AEQ dos Testes Sorológicos – é um instrumento útil de avaliação da qualidade e da credibilidade. A adoção desse Programa para leishmaniose canina criará um conjunto de informações (banco de dados), cujo teor poderá ser explorado de forma ampla indicando possíveis falhas e, conseqüentemente, as medidas para saná-las.

A vigilância epidemiológica consiste em uma outra frente de atuação, onde os painéis de Avaliação Externa da Qualidade são fundamentais, pois contribuem para a correta identificação e o mapeamento da doença (leishmaniose), de alto impacto para a saúde pública.

2 - RELEVÂNCIA DO ESTUDO

O Departamento de Reativos para Diagnósticos do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos de Manguinhos – Bio-Manguinhos produz diversos kits e insumos para diagnóstico, além de painéis sorológicos para programas de controle de qualidade. Atende-se, assim, a sua própria missão, devidamente estabelecida em (MS, 2005a)

“Contribuir para a melhoria dos padrões de saúde pública brasileira, através da pesquisa tecnológica e da produção de imunobiológicos capazes de atender à demanda gerada pelo quadro epidemiológico do país.”

A implementação de um Programa de Avaliação Externa de Qualidade para a leishmaniose visceral canina fornecerá, às instituições participantes, um instrumento de controle externo que deve ser utilizado para fortalecer a confiabilidade dos testes diagnósticos, bem como auxiliar na identificação e correção de possíveis falhas existentes no processo. Permite, então, o contínuo aprimoramento no processo de trabalho dos participantes.

Portanto a importância da AEQ é seu poder não só de orientação do sistema com um todo, como também de alavanca da competência de outras ações que possam contribuir para o incremento da consciência de qualidade, tais como controle de qualidade interno e auditorias internas.

Este estudo justifica-se, por conseguinte, por estar totalmente em conformidade com a política adotada por Bio-Manguinhos de dar sustentação às ações de Saúde Pública e epidemiológicas, além de estar fortemente interligado às necessidades apontadas pelos laboratórios da Rede Pública do país em relação à importância da implementação de ações que auxiliem na garantia da qualidade dos testes sorológicos para a leishmaniose visceral canina.

3 - OBJETIVOS

3.1 - Geral

Implementar um Programa de Avaliação Externa da Qualidade em Sorologia, para os testes sorológicos de leishmaniose visceral canina.

3.2 - Específicos

3.2.1 - Descrever os fatores de estrutura e processo relativos às Boas Práticas de Laboratório das instituições participantes;

3.2.2 - Avaliar associação entre conformidade e fatores de estrutura e processos das instituições;

3.2.3 - Descrever a acurácia dos resultados dos exames sorológicos segundo o espectro clínico de LVC utilizado nas amostras do painel;

3.2.4 - Investigar a correlação dos fatores de estrutura e processo de instituições e a participação prévia em AEQ.

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1- Delineamento do Estudo

Trata-se de um estudo seccional (observacional) que consistirá na avaliação do processo e no resultado da adoção de um Programa de Avaliação Externa da Qualidade em Sorologia para leishmaniose visceral canina.

4.2 - População alvo

Inicialmente a meta de instituições que seriam incluídas nesta AEQ-LVC contaria com 51 laboratórios, selecionados pela Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública / Secretaria de Vigilância em Saúde / Ministério da Saúde (CGLAB/SVS/MS). Todos realizam rotineiramente diagnósticos sorológicos de LVC e não foram definidos critérios específicos de exclusão neste primeiro momento, objetivando coletar as variáveis características de cada laboratório a fim de utilizá-los na análise dos dados.

Porém, após a formalização do convite para participar do programa (Anexo 9.1), tivemos a aceitação de quarenta (40) instituições que responderam ao questionário de cadastramento. Dessas, trinta (30) realizaram integralmente sua participação, encaminhando, além dos questionários, os resultados sorológicos dos exames laboratoriais para LVC. Constituem: Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACENS), Laboratórios ligados às Coordenações Regionais da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) e Centros de Controle de Zoonoses (CCZ) dos Estados e Municípios brasileiros.

4.3 - Composição dos painéis sorológicos

Incluem as seguintes etapas:

- 1) Ocorreu a articulação entre a CGLAB/SVS/MS e Bio-Manguinhos para elaborar convênio, garantindo a adoção e manutenção de um Programa de Avaliação Externa da Qualidade dos testes sorológicos em leishmaniose visceral

canina, contribuindo como um instrumento para garantir os resultados sorológicos em LVC obtidos nos Laboratórios e Serviços Públicos do País.

2) Estabeleceu-se parceria com o Instituto Adolfo Lutz para a coleta regular de plasma canino, com sorologia positiva e negativa para leishmaniose visceral canina. Este material serviu como matéria prima para a produção dos painéis sorológicos. O Instituto Adolfo Lutz, de São Paulo, enviou, para Bio-Manguinhos, bolsas de plasma canino (com sorologia e teste parasitológico positivo para LVC) obtidas em serviços de trabalho de campo, na Região de Penápolis, interior de São Paulo.

3) Elaboraram-se os Procedimentos Operacionais Padrão (POP) e protocolos utilizados no processamento do plasma canino e na produção dos painéis sorológicos, visando atender a todas as exigências de Boas Práticas de Fabricação (BPF) exigidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

4) Instituiu-se metodologia para o recebimento, cadastramento e armazenamento das bolsas de plasma canino, de maneira que as amostras recebidas pudessem ser facilmente rastreadas. As bolsas de plasma canino foram devidamente registradas, recebendo um número de controle interno em Bio-Manguinhos e armazenadas, garantindo-se assim a rastreabilidade de qualquer bolsa, caso haja necessidade. Logo após o registro, as bolsas de plasma foram liberadas para a realização do protocolo de recalcificação.

5) Encaminharam-se as amostras para análise (caracterização) sorológica para três laboratórios considerados de referência. Assim, nesta primeira AEQ-LVC, as amostras foram analisadas pelo Instituto Adolfo Lutz, pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED) e por Bio-Manguinhos/Fiocruz. As amostras com resultados unanimemente concordantes nos testes parasitológicos e testes sorológicos (EIE-Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos; IFI-Leishmaniose Visceral Canina – Bio-Manguinhos e o ELISA – Biogene) foram consideradas aptas a compor os painéis sorológicos para avaliar o desempenho dos Laboratórios participantes.

6) Produziu-se um painel com 4 amostras positivas (procurando contemplar o espectro de gravidade clínica da LVC e os níveis de anticorpos distintos) e 2 negativas. Essas amostras são provenientes de área endêmica para LVC (Penápolis - São Paulo) com o diagnóstico de certeza firmado por demonstração do parasita.

O primeiro painel de Avaliação Externa da Qualidade para Leishmaniose Canina, Lote: AEQ-LVC-1 foi composto da seguinte forma:

Amostra 1 – Soro com o código interno do Bio-Manguinhos C4/04 com caracterização positiva (LVC associada a esplenomegalia, emagrecimento e unhas longas);

Amostra 2 – Soro código C12/04 com caracterização positiva (animal assintomático);

Amostra 3 – Soro código C5/04 com caracterização negativa (apresentava como sinais clínicos: esplenomegalia, emagrecimento e dermatite);

Amostra 4 – Soro código C21/04 com caracterização positiva (LVC associada a dermatite);

Amostra 5 – Soro código C20/04 com caracterização positiva (LVC, cuja principal indicação era dermatite);

Amostra 6 – Soro código C6/04 com caracterização negativa (apresentava os sinais clínicos: esplenomegalia e unhas longas).

7) Foi elaborado um questionário que foi submetido à apreciação por um Comitê de especialistas em diagnóstico laboratorial de LVC. Coordenado pela CGLAB/SVS/MS, com vistas a maximizar a validade de face e de construto do mesmo no que diz respeito à variáveis de estrutura e processo potencialmente envolvidas na qualidade de execução dos exames identificados como relevantes.

Este questionário, em seu formato final (Anexo 9.2), foi enviado em outubro de 2006 a 51 Instituições indicadas pela CGLAB/SVS/MS. Para confirmar a intenção em participar do Programa de AEQ-LVC, as instituições deveriam preencher os questionários e os encaminhar novamente (via correio pré-pago), para Bio-Manguinhos. Quarenta instituições (78%) manifestaram a intenção de participar do Programa.

8) Em dezembro de 2006, um painel sorológico foi enviado, utilizando-se a técnica de “mascaramento” de resultados para cada um dos 40 participantes. Tal painel foi encaminhado com formulário para o preenchimento dos resultados obtidos na sorologia e uma carta de encaminhamento do painel sorológico (Anexo 9.3 e 9.4). O prazo final para a devolução (via correio) dos formulários preenchidos pelos laboratórios foi no dia 10 de janeiro de 2007.

4.4 - Variáveis de interesse

4.4.1 – Dependentes

Correspondem aos resultados sorológicos do painel enviado, referente à primeira AEQ-LVC.

Na realização do banco de dados, o termo conformidade foi atribuído às instituições que obtiveram a totalidade de resultados verdadeiro-positivos (VP) e verdadeiro-negativos (VN).

Foram descritos, também, os percentuais de erros segundo a técnica realizada (ELISA e IFI)

4.4.2 – Independentes

As variáveis independentes são aquelas que potencialmente poderiam contribuir para o resultado dos exames liberados pelo laboratório e seu desempenho na AEQ-LVC. Elas subdividem-se em informações de processo e estrutura:

a) Processo: São as atividades envolvidas na execução dos exames.

Exames: total de exames para LVC realizados pelos laboratórios; quantidade percentual de resultados positivos para LVC por instituição e utilização (ou não) de procedimentos operacionais padrão (POP) para executarem a rotina sorológica de LVC.

Calibração periódica dos materiais do laboratório; controle de temperatura dos equipamentos do laboratório; uso de planilhas de controle de utilização e manutenção preventiva de cada equipamento; realização de controle de temperatura ambiental.

b) Estruturais:

Tipo de instituição (Federal, Estadual, Municipal ou Privado); participação da instituição em outras AEQ.

Recursos Humanos: número de funcionários e dedicação exclusiva à sorologia da LVC; carga horária; nível de instrução dos profissionais; tempo de experiência no diagnóstico da LVC; treinamento da equipe; qualificação dos funcionários para o cumprimento das boas práticas de laboratório (BPL) e utilização pelos funcionários dos equipamentos de proteção individual.

4.5 - Plano de análise de dados

Os dados obtidos foram armazenados em um banco de dados, construído em software estatístico SPSS WIN 11.0. Foram analisados quanto à frequência dos resultados laboratoriais verdadeiro-positivos (VP), verdadeiro-negativos (VN), falso-positivos (FP) e falso-negativos (FN) e possíveis associações entre fatores de processo de execução destes exames do painel por cada laboratório e a respectiva performance expressa pelos resultados. Diferenças percentuais foram comparadas pelo teste qui-quadrado, com a significância estatística testada ao nível de 5%. A medida de associação utilizada foi a razão de prevalência com respectivos intervalos de 95% de confiança. Foram descritas as frequências simples das variáveis categóricas e as médias (desvio-padrão – dp) das variáveis contínuas paramétricas e as medianas (percentil 25 – 75) para as categorias não-paramétricas. Para correlação destas variáveis e a participação prévia em AEQ, utilizamos o teste de correlação de Spearman ou Pearson, conforme o caso. O teste de normalidade das distribuições foi o de Kolmogorov-Smirnov (Spiegel, 1972). Os dados qualitativos foram analisados considerando as categorias discursivas ou conteúdo mais freqüente nas 3 questões abertas (Anexo 9.5) (Minayo, 1993).

4.6 – Fluxo da AEQ-LVC

Foi encaminhado, para cada laboratório, um convite de participação e um questionário. Aos que aceitaram participar foi enviado, em dezembro de 2006, um painel com seis (6) amostras elaboradas, como o descrito no item 4.2.1. Os resultados foram enviados a Bio-Manguinhos – conforme formulário de resultados (Anexo 9.3). Em breve, Bio-Manguinhos enviará para cada laboratório e de maneira sigilosa os resultados da AEQ-LVC em relatórios individuais e globais.

Neste ano (2007), está previsto o estabelecimento de um convênio com a CGLAB/SVS/MS, o qual deverá acordar a realização de duas avaliações anuais, seguindo o mesmo esquema de reenvios e devoluções de resultados.

Entre os dois painéis, serão enviados folhetos educativos sobre Boas Práticas de Laboratório e Biossegurança, especialmente no que tange a exames sorológicos de LVC e garantia da qualidade.

4.7 – Protocolo padrão de recalcificação

O método de recalcificação de plasma consiste no reestabelecimento das características de limpidez e incoagulabilidade que o plasma possuía antes do fracionamento das bolsas de sangue total colhidas de cães. A metodologia consiste em adicionar cloreto de cálcio e ácido ϵ -aminocapróico ao plasma, com posterior homogeneização e incubação a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após 48 horas, as amostras, então, são descongeladas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, Adiciona-se Caolin, submetendo-as à agitação por 4 h. A seguir, serão incubadas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por dezoito (18) horas e, finalmente, centrifugadas a $2.688 \times g$ por 1 hora. Após este procedimento, o soro é transferido para um frasco de armazenamento, de onde são retiradas algumas alíquotas para caracterização. Os frascos de soro são mantidos congelados a uma temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Anexo 9.6).

4.8 - Considerações éticas

Para confecção dos painéis foram utilizadas 6 amostras de soro canino. Todos os animais, cujas amostras nos foram enviadas, foram recolhidos nas dependências do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) do município de Penápolis, (SP), para serem avaliados como parte da rotina das atribuições do CCZ. Estes animais eram suspeitos de leishmaniose visceral. Neles foram identificados a raça, idade, tamanho de pêlo, procedência e submetidos ao exame físico para avaliação de sinais clínicos e aos exames sorológicos e parasitológicos para LVC.

A eutanásia dos cães com diagnóstico confirmado de LVC foi realizada segundo o protocolo de rotina executado no CCZ de Penápolis, seguindo a seguinte seqüência: anestesia visando relaxamento/tranqüilização do animal; sedação profunda com pentabarbítúrico e a eutanásia pela utilização de solução de cloreto de potássio.

Contatamos o Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Fundação Oswaldo Cruz, que analisa e avalia os aspectos éticos dos projetos experimentais com seres humanos com a finalidade de verificarmos a necessidade de submeter esse trabalho. Fomos esclarecidos que estávamos desobrigados de solicitarmos abertura de protocolo para análise, pois não havia pertinência da submissão deste Programa de Implementação de Avaliação Externa da Qualidade, que não implicava em pesquisa em seres humanos, apenas em informações institucionais.

Os relatórios para divulgação global dos resultados estão sendo elaborados de forma consolidada, obedecendo à confidencialidade das instituições participantes, identificadas por código numérico, bem como os retornos específicos para cada instituição vêm sendo realizados de modo sigiloso para propiciar uma auto-avaliação. Além disso, aqueles que apresentarem resultado falso-positivo, falso-negativo ou indeterminado, receberão análises individuais contendo orientações técnicas sobre as possíveis causas dos erros observados.

Os resultados das amostras serão apresentados aos participantes, posteriormente, com a devida codificação de verdadeiros / falsos-positivos e negativos.

5. RESULTADOS

Foram cinquenta e uma (51) instituições convidadas a participar do Programa de Avaliação Externa da Qualidade em Sorologia para leishmaniose visceral canina.

Das instituições que, por algum motivo, não responderam ao questionário, cinco (5) estão localizadas na Região Nordeste; quatro (4) no Sudeste e uma (1) no Centro-Oeste. Uma (1) outra instituição localizada na Região Sudeste informou que não realizava o referido exame.

A amostragem da pesquisa nos questionários abrangeu quarenta (40) instituições. Quanto à sua distribuição geográfica, dezenove (19) são da Região Sudeste; treze (13) Nordeste; cinco (5) do Centro-Oeste e três (3) da Norte .

A avaliação sorológica foi realizada em trinta (30) instituições que devolveram a tabela de resultados dentro do prazo estabelecido. Entre essas, a distribuição geográfica incluiu: quatorze (14) da Região Sudeste; dez (10) do Nordeste; quatro (4) do Centro-Oeste e duas (2) da Região Norte.

5.1 - Perfil das instituições participantes da AEQ-LVC

Do universo das quarenta (40) instituições que responderam ao questionário, vinte e duas (22) são estaduais; quinze (15) municipais e três (3) do setor privado. Vinte e uma (21) dessas estão, também, desenvolvendo outro Programa de AEQ coordenados por um Laboratório Organizador (Tabela 5.1).

Em vinte e oito instituições (28), o contingente de funcionários dedicados exclusivamente ao diagnóstico da LVC variava de 1 a 8, com mediana de 2,5 (2,0 – 4,0), desses técnicos. Além disso, 30% trabalham em horário integral (8 horas/dia). Em 47,5% (19), o treinamento está caracterizado por periodicidade irregular. Pôde ser constatado, nos técnicos exclusivos do diagnóstico da LVC, que seu nível máximo de instrução mais freqüente é superior, perfazendo 50% do grupo.

Tabela 5.1 - Perfil das instituições participantes do Programa de Avaliação Externa Qualidade (AEQ) (N=40) em leishmaniose visceral canina (LVC)

Característica da Instituição	N	%
Tipo		
Estadual	22	55,0
Municipal	15	37,5
Privado	3	7,5
Participação em AEQ*		
Participou	21	52,5
Não participou	18	45,0
Funcionário exclusivo LVC		
Sim	28	70,0
Instrução máxima na equipe LVC		
Médio	8	20,0
Superior	20	50,0
Pós-Graduação ⁺	12	30,0
Carga Horária		
Integral - 8 horas	12	30,0
Parcial - 4 horas	5	12,5
Outros - 6 horas	19	47,5
Periodicidade treinamento LVC		
Anual	5	12,5
> anual ou irregular	19	47,5
Não realiza treinamento	16	40,0

* dados faltantes: 1 (2,5%)

+ pós-graduação (especialização ou *stricto-sensu*)

A quantidade mediana dos técnicos de nível médio de instrução situa-se em 2,0, enquanto somente um funcionário de cada laboratório tem nível superior e/ou pós-graduação (Tabela 5.2).

A experiência no teste de ELISA alcançou a mediana de 4,0 anos nos funcionários com pós-graduação, 3,5 nos de nível superior e 3,0 nos técnicos. Quanto ao teste de IFI obteve-se 7,0, 6,0 e 6,0 anos respectivamente. A experiência dos funcionários na execução do exame IFI é cerca do dobro (6 anos) daquela relativa à execução do ELISA, independente do nível de instrução (Tabela 5.2).

Tabela 5.2 - Número mediano (percentis 25-75) de profissionais por laboratório segundo nível de instrução e tempo em anos de experiência na execução dos testes sorológicos (ELISA e IFI) para LVC

Profissionais e experiência	Mediana (percentis 25-75)
Quantitativo (número)	
Técnico	2,0 (1,0 – 2,0)
Superior	1,0 (1,0 – 2,0)
Pós-graduação	1,0 (1,0 – 1,0)
Experiência ELISA (anos)	
Técnico	3,0 (1,0 – 5,0)
Superior	3,5 (2,0 – 6,0)
Pós-graduação	4,0 (2,0 – 17,0)
Experiência IFI (anos)	
Técnico	6,0 (3,0 – 10,0)
Superior	6,0 (2,5 – 9,0)
Pós-graduação	7,0 (3,0 – 18,5)

Nas instituições, a frequência média na rotina de resultados positivos para LVC atingiu 3,0% (IC 95%: 1,5;5,0) com grandes variações percentuais entre os laboratórios (Tabela 5.3).

Tabela 5.3 - Frequência (percentual) de positividade à sorologia para LVC na rotina das instituições participantes da AEQ-LVC

Faixa de percentual	N (%)
0,1% até 5%	7 (17,5)
5,1% até 10%	6 (15,0)
10,1% até 15%	4 (10,0)
15,1% até 20%	2 (5,0)
20,1% até 30%	6 (15,0)
> 30%	2 (5,0)

Dados faltantes: 13 instituições (32,5%)

No conjunto de informações de processo, destacaram-se os itens ligados a Garantia da Qualidade na rotina das instituições. Os procedimentos operacionais padrão (POP) da rotina sorológica estão adotados em 31 (77,5%) dos laboratórios. Na quase totalidade dos participantes (95%) existe EPI adequado ao risco. Mais da metade (60%) dos laboratórios não calibra os equipamentos. Até mesmo naqueles que o fazem (31,3%), há periodicidade irregular ou acima da anual.

A manutenção preventiva dos equipamentos foi identificada em 65,8% dos laboratórios. Em 27 (69,2%) laboratórios, a temperatura dos equipamentos é verificada diariamente, enquanto em 9 (32,1%) a verificação ocorria pela manhã e à tarde. No acompanhamento da temperatura ambiente, 16 laboratórios (41%) declararam tal prática. A planilha de utilização de equipamentos não é rotineiramente aplicada em 21 (53,8%) laboratórios.

5.2 - Resultados da AEQ

Todas as instituições que responderam ao questionário receberam os painéis sorológicos para o diagnóstico da LVC. Após a obtenção dos laudos das análises, nove (30%) dos laboratórios foram consideradas não-conformes totalizando dez erros, uma vez que um laboratório errou por duas vezes (Anexo 9.7). Dentre os erros, seis ocorreram no teste de IFI (5 indeterminados e 1 falso-negativo). Quatro desses correspondiam à amostra negativa e dois, à amostra fortemente positiva de cão sintomático. Da mesma forma, no teste de ELISA, 4 erros foram assinalados (3

falso-positivos e 1 indeterminado) na mesma amostra negativa da IFI (amostra 3) (Anexo 9.7).

Considerando todas as amostras do painel efetivamente realizadas pelos laboratórios participantes, segundo o tipo de técnica, tivemos 108 exames pelo teste de ELISA e 176 exames pelo teste de IFI (Anexo 9.7). Os percentuais de resultados incorretos por metodologia – obtidos no primeiro painel de AEQ-LVC – foram 3,7% (4/108) nos testes de ELISA e 3,4% (6/176) nos testes de IFI.

Nenhuma variável estrutural ou institucional pesquisada estava associada à conformidade na AEQ-LVC (Tabelas 5.4 e 5.5). Algumas tendências não alcançaram significância estatística como o fato das instituições não-conformes tenderem a oferecer menos treinamento aos seus funcionários e, em sua totalidade, com periodicidade mais longa que um ano. O percentual de funcionários exclusivos em relação ao total de funcionários do laboratório foi muito semelhante nos dois grupos, sendo um pouco menor nos não-conformes, enquanto o quantitativo de funcionários exclusivos por laboratório foi idêntico.

Tabela 5.4 - Prevalências de conformidade segundo as características estruturais dos participantes na AEQ-LVC

Característica	Conformes N (%)	RP (IC de 95%)
AEQ prévio		
Sim	12/16 (75,0)	1,17 (0,72; 1,89)
Não *	9/14 (64,3)	1
Categoria da Instituição		
Estadual	11/15 (73,3)	1,26 (0,71; 2,22)
Municipal	7/12 (58,3)	1
Privado	3/3 (100,0%)	**
Funcionário Exclusivo		
Sim	14/21 (66,7)	0,86 (0,54 1,36)
Não *	7/9 (77,8)	1
Carga horária		
Integral - 8 horas	7/8 (87,5)	3,67 (1,64; 8,25)
Parcial - 4 horas	5/5 (100,0)	**
Outros – 6 horas	4/9 (44,4)	1,87 (0,65; 5,38)
Variado	5/21 (23,8)	1
Nível de instrução		
Pós-graduação	5/9 (55,6)	1,29 (0,64; 2,57)
Superior	12/14 (85,7)	1,50 (0,77 ; 2,95)
Médio	4/7 (57,1)	1
Número de funcionários exclusivos		
≥ 4	4/6 (66,7)	1,00 (0,51; 1,95)
≤ 3 *	10/15 (66,7)	1
Treinamento dos profissionais		
Sim	17/23 (73,9)	1,29 (0,65; 2,57)
Não *	4/7 (57,1)	1
Periodicidade de treinamento		
Anual	5/5 (100,0)	1,5 (1,08; 2,08)
> anual ou irregular *	12/18 (66,7)	1

RP: razão de prevalências

* Categoria de referência para análise

** zero em uma das células da tabela 2X2

As instituições em conformidade com os resultados do painel sorológico tenderam, mais freqüentemente, a atender aos seguintes requisitos recomendados pelos manuais de Boas Práticas de Laboratório: possuir POP; utilizar EPI, realizar manutenção preventiva e controle da temperatura ambiente. Mas estas diferenças não alcançaram significância estatística (Tabela 5.5).

Tabela 5.5 - Prevalências de conformidade segundo as características de processo dos participantes na AEQ-LVC

Característica	Conformes N (%)	RP (IC de 95%)
Possui POP		
Sim	18/25 (72,0)	1,44 (0,52; 3,95)
Não *	2/4 (50,0)	1
Utiliza EPI		
Sim	20/28 (71,4)	1,43 (0,35; 5,83)
Não *	1/2 (50,0)	1
Equipamentos calibrados		
Sim	9/13 (69,2)	0,98 (0,61; 1,58)
Não *	12/17 (70,6)	1
Periodicidade de calibração		
anual	5/9 (55,6)	0,56 (0,31; 0,99)
> anual ou irregular *	4/4 (100,0)	1
Verificação de temperatura		
Sim	14/21 (66,7)	0,86 (0,54; 1,36)
Não *	7/9 (77,8)	1
Periodicidade de verificação da temperatura do equipamento		
Manhã	4/8 (50,0)	0,67 (0,27; 1,63)
Manhã e tarde	7/9 (77,8)	1,04 (0,53; 2,02)
Irregular	3/4 (75,0)	1
Manutenção preventiva		
Sim	9/12 (75,0)	1,16 (0,72; 1,87)
Não *	11/17 (64,7)	1
Temperatura ambiente		
Sim	10/13 (76,9)	1,19 (0,75; 1,88)
Não *	11/17 (64,7)	1

RP: razão de prevalências

* Categoria de referência para análise

5.3 - Correlação com a realização de AEQ prévio

Correlacionaram-se com realização de AEQ prévio: o número de funcionários exclusivos, nível máximo de instrução na equipe e, marginalmente, o uso de planilha de controle na utilização de equipamentos. A prática de verificação de temperatura era mais freqüente entre os que fazem a AEQ embora sem significância estatística (Tabela 5.6).

Tabela 5.6 - Correlação das variáveis independentes segundo a realização prévia ou atual de AEQ

Variáveis	AEQ N (%)		P valor (Rho)
	Sim	Não	
Categoria da Instituição			
Estadual	11/21 (52,4)	11/19 (57,9)	0,64 (-0,077)
Municipal e privado	10/21 (47,6)	8/19 (42,1)	
Funcionário exclusivo			
Sim	14/21 (66,7)	14/19 (73,7)	0,64 (-0,076)
Número de funcionários exclusivos			
4 - 8	6/13 (46,2)	1/13 (7,7)	0,03 (0,43)
1 - 3	7/13 (53,8)	12/13 (92,3)	
Nível de instrução			
Pós-graduação	9/21 (19,1)	3/19 (15,8)	0,008 (0,42)
Superior	11/21 (52,4)	9/19 (47,4)	
Médio	1/21 (4,8)	7/19 (38,6)	
Planilha de controle de utilização (equipamentos)			
Sim	12/20 (60,0)	6/19 (31,6)	0,08 (0,28)
Periodicidade de Calibração			
≤ Anual	4/8 (50,0)	7/8 (87,5)	0,12 (-0,41)
> Anual ou irregular	4/8 (50,0)	1/8 (12,5)	
Verificação de Temperatura			
Sim	16/20 (80,0)	11/19 (57,9)	0,14 (0,24)

Rho: coeficiente de correlação

Porém a maioria das características dos laboratórios não estava correlacionada com o fato de ter participado (ou estar participando) de AEQ (Tabela 5.7).

Tabela 5.7 - Correlação com participação atual ou prévia em AEQ para diferentes variáveis de estrutura e processo de 40 instituições incluídas em programa de AEQ-LVC

Variável	Correlação Rho	P valor
Quantidade de técnicos	- 0,143	0,420
Quantidade de superior	0,335	0,081
Quantidade de pós-graduados	- 0,243	0,448
Experiência ELISA técnico	- 0,081	0,728
Experiência ELISA superior	0,186	0,433
Experiência ELISA pós-graduados	-	-
Experiência IFI técnico	0,079	0,664
Experiência IFI superior	0,190	0,343
Experiência IFI pós-graduados	- 0,132	0,683
Treinamentos dos profissionais	0,143	0,378
Periodicidade de treinamento	0,225	0,289
Quantidade de resultados positivos	- 0,089	0,660
Possui POP	0,026	0,875
Utiliza EPI	0,011	0,944
Equipamentos calibrados	- 0,041	0,802
Periodicidade de verificação da temperatura	- 0,008	0,966
Manutenção preventiva	0,166	0,318
Temperatura ambiente	0,187	0,254

Rho: coeficiente de correlação

5.4 - Pesquisa Qualitativa

Nas questões abertas do questionário (Anexo 9.5). Verificamos o seguinte quadro geral: 20 instituições responderam a todos os itens; 10 responderam apenas duas questões e duas delas não expressaram nenhum comentário.

A pesquisa constava de 3 itens dissertativos:

a) No primeiro item sobre Avaliação Externa da Qualidade, em leishmaniose visceral canina, respondido por 31 instituições e 9 abstenções, algumas palavras-chave (como segurança, qualidade e confiabilidade) foram citadas diversas vezes, reforçando a necessidade de ações que dessem respaldo à rotina de trabalho (Anexo 9.5).

b) No segundo item, 33 instituições identificaram dois problemas principais: interrupção no fornecimento dos kits para LVC (no ano de 2006) e problemas variados relacionados à qualidade dos kits para diagnóstico (Anexo 9.5),

c) No terceiro item, 24 instituições opinaram de maneira heterogênea no que diz respeito aos temas abordados, dos quais se ressaltam alguns pontos importantes para a rotina de trabalho dos laboratórios: reclamações relativas ao aumento significativo nas atividades laboratoriais; falta de equipamentos e de funcionários exclusivos para realização da rotina de LVC; problemas gerais de manutenção de equipamentos e área física inadequada do laboratório e, além da necessidade de treinamento mais freqüente com acesso a informações técnicas (Anexo 9.5).

6 - DISCUSSÃO

6.1 - Perfil das instituições participantes da AEQ-LVC

A participação de 78% (40) instituições no primeiro Programa de Avaliação Externa Qualidade para leishmaniose visceral canina afigura-se como representativa, tendo em vista a desconfiança que o ingresso de novos programas voltados à Garantia da Qualidade pode causar. Há também o receio de algum tipo de punição caso os resultados sejam classificados não-conformes (Libber et al., 2002). Por outro lado, a AEQ na área de Hemoterapia resultou em adesão bem maior (96%), possivelmente por regulação específica que instituiu um programa que visava executar inspeções para avaliar a qualidade dos processos nos Serviços de Hemoterapia (Lopes, 2005).

Um total de 30 (75%) instituições retornou os resultados do painel sorológico, até a data limite para análise dos resultados dessa dissertação, o que não era esperado considerando experiências anteriores, além disso, este programa foi gratuito para a instituição participante e de custo elevado para o Organizador. Além disso, o programa de LVC possuía outros aspectos que, em geral, contribuem para uma participação mais expressiva como o caráter não punitivo, sigiloso e educativo (Thakur, 2004). Cabe ressaltar que um Programa de AEQ voluntário dificilmente atinge 100% de participação. Carter et al. (2002) relataram que, em um Programa de AEQ, realizado no Continente Africano com a participação de 81 laboratórios distribuídos por 5 países, nenhum desses participou de todas as rodadas e apenas 30% participaram de 4 ou mais das 9 edições oferecidas.

A continuidade do Programa de AEQ-LVC deverá ser estruturada a partir de financiamento do Governo Federal, por intermédio de convênio com a CGLAB/SVS/MS. Um fato interessante, referente ao perfil dos clientes deste programa, é o fato de incluir 25 (89,3%) instituições participantes vinculadas ao serviço público (Estadual e Municipal), fazendo com que o investimento empregado esteja em grande parte contribuindo para melhoria das ações de saúde pública (vigilância em saúde e sanitária). Os exames sorológicos de LVC constituem atividade de Saúde Pública atribuídos principalmente aos LACEN (Estadual) e CCZ (Municipal), contando com o apoio da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, por intermédio do Programa Nacional de Vigilância e Controle

da LV no Brasil, assegurando-se, então, a efetividade de ações como eliminação de reservatórios caninos, redução da população de flebotomíneos, bem como, proteção para a população humana (MS, 2005b).

O fato de aproximadamente 50% dos laboratórios possuírem experiência prévia em Programas de AEQ é bastante positivo. Contudo, somente a participação prévia em uma AEQ não é garantia de um desempenho satisfatório, King et al. (1999) observaram que cerca de 5 a 30% dos participantes de AEQ apresentam resultados insatisfatórios, mesmo tendo participado anteriormente de AEQ por um longo período (mais de 10 participações). Há divergências entre os autores no que tange à importância do desempenho após algumas participações em AEQ que tende a se estabilizar à medida que os profissionais vão adquirindo experiência (Thompson & Lowthian, 1993). Além disso, um bom resultado na AEQ, não significa qualidade na rotina, pois geralmente os técnicos executam com maior atenção as amostras provenientes de uma AEQ (Libeer, 2001^b).

Segundo Rej (2002), a melhoria no desempenho está relacionada a fatores, tais como a análise criteriosa do serviço do laboratório; a escolha de determinados reagentes e a utilização de equipamentos de qualidade. Salienta que contribuem para um desempenho fraco em uma AEQ:

- 1) falta de treinamento dos profissionais do laboratório;
- 2) número inadequado de profissionais;
- 3) falta de comunicação entre a gerência e os profissionais do laboratório;
- 4) equipamentos inadequados e
- 5) espaço reduzido para realização das tarefas laboratoriais.

Um dos aspectos relevantes para bom desempenho em AEQ teve baixa frequência nas amostras analisadas: funcionários de 40% dos laboratórios participantes não realizam treinamento algum e a maioria dos que são treinados (19/40) o faz irregularmente.

Verificamos que a maioria das instituições (70%) mantém funcionários exclusivos para a realização de sorologia para LVC, com mediana de 2,5 por laboratório. O contingente ideal de funcionários para atender a rotina varia na dependência do volume de amostras destinadas a análise. Porém, o fato de possuir técnicos exclusivos para sorologia de LVC é um aspecto positivo e contribui para o aumento da experiência e aperfeiçoamento.

Segundo o relatório geral do Ministério da Saúde (MS, 2006) que analisou diversos aspectos relacionados à estrutura e ao desempenho dos LACENS – o

percentual de funcionários que não possuem escolaridade de nível superior foi maior que o dobro (44%) da descrita como escolaridade máxima no presente estudo (20%). A escolaridade de nível médio predomina tanto nos LACENS em geral quanto funcionários exclusivos para LVC, apesar da presença de funcionários nível superior na equipe. Sugerindo não ser essencial um nível de escolaridade maior para a realização de rotina sorológica.

A baixa frequência de resultados positivos nas sorologias de LVC (3,0%) realizadas na rotina dos laboratórios participantes pode ser atribuída parcialmente a um viés introduzido pela grande quantidade de dados faltantes (32,5%) nesta questão.

O alto percentual (77,5%) de laboratórios participantes que possuem POP em sua rotina é surpreendente, levando-se em consideração que este percentual é maior que instituições que possuíam experiência anterior em AEQ (57,1%), demonstrando o interesse relacionado a ações que garantam a Qualidade. Os POP devem estar sempre atualizados com as revisões aprovadas pelo gerente da unidade, com a função de monitorar procedimentos ou processos que são de caráter repetitivo (Penders & Hendriksen-Wissink, 1999).

Praticamente a totalidade das instituições (95,0%) utiliza EPI. É inaceitável que, em alguns laboratórios, os técnicos manipulem material com potencial de risco biológico, sem adotar as medidas necessárias para garantir a sua integridade. A gerência da Unidade Operacional tem o dever de assegurar que as precauções relacionadas com a saúde e segurança estejam em conformidade com as normas nacionais e internacionais (MS, 2001).

Já os equipamentos utilizados em laboratório devem dispor de informações necessárias para seu funcionamento e, também devem ser realizadas limpezas periódicas. Registros escritos de utilização, calibração e manutenção devem constar próximo aos equipamentos. A periodicidade dessas ações deve estar estabelecida no POP. Os baixos percentuais de laboratórios participantes que realizam calibração com prazos definidos (31,3%), procedem à manutenção preventiva (34,2%) de equipamentos e utilizam planilha (53,8%) são inaceitáveis e merecem atenção. Por outro lado o custo envolvido na realização desses tipos de serviço provavelmente é um fator primordial para o descumprimento desse procedimento (MS, 2001).

Embora a manutenção dos equipamentos envolvidos diretamente com o diagnóstico do exame sorológico deva ser periodicamente realizada – pois podem interferir diretamente no resultado do teste – mais de dois terços dos participantes

ainda não a realiza. Biól et al. (2002) relatam que, em uma AEQ, direcionada a exames de citologia, realizada pelo Ministério da Saúde do México, constatou-se que não mais do que 70% dos microscópios utilizados em diagnósticos de citologia estavam em perfeitas condições de uso. Após a manutenção ou troca dos microscópios e a realização de cursos de curta duração e “workshops”, verificou-se melhora no desempenho dos profissionais envolvidos no diagnóstico citológico.

Considerados em conjunto, os baixos percentuais detectados relacionados, aos itens estruturais, permitirão um campo de orientação futura com vistas a criar condições favoráveis para o ótimo desempenho dos laboratórios que executam exames LVC no Brasil.

6.2 - Conformidade

Nesta primeira AEQ-LVC, as amostras foram selecionadas obedecendo a critérios estabelecidos pela CGLAB/SVS/MS, segundo parecer técnico do Comitê Assessor, constituído por especialistas em diferentes áreas relacionadas à LVC. As amostras deveriam apresentar resultados (sorológico e parasitológico) bem definidos, ou seja, soros reagentes com título elevado ($> 1:640$) e soros não-reagentes.

Para o primeiro painel não foram selecionadas amostras sorológicas com resultados positivo-fracos (amostra parecidas com as da rotina) que pudessem propiciar resultados discordantes. É importante destacar que alguns laboratórios não conseguiram identificar as amostras verdadeiramente positivas entre as amostras incluídas no painel. Tal fato indica a necessidade de fornecer auxílio técnico aos laboratórios e profissionais que realizam a rotina sorológica. Alguns autores (Strand, 1994; Peddecord & Cada, 1980) sugerem inclusive o uso nos painéis de amostras com concentrações variadas que cubram o espectro encontrado na clínica e aumente o grau de dificuldade – estratégia que poderá ser incluída – em novas rodadas deste Programa AEQ-LVC.

A interpretação do desempenho dos laboratórios nesta primeira AEQ-LVC depende dos critérios de conformidade, se mais estritos, exigindo acerto completo do painel, ou por número de resultados concordantes, considerando o conjunto de exames realizados (Brookman et al., 2004). Na presente AEQ-LVC, 30% dos laboratórios foram não-conformes o que constitui um percentual superior comparado

à primeira avaliação da maioria dos desempenhos de 78 Serviços de Hemoterapia em exames sorológicos para sífilis (21,7%), HIV (19%); hepatite B (12,0%), hepatite C (10,3%) e HTLV (2,7%), mas menor do que o alto percentual (58,9%) de não-conformes no exame de doença de Chagas (Lopes, 2005).

Os percentuais de resultados incorretos por metodologia obtidos no primeiro painel de testes de ELISA (3,7%) e testes de IFI (3,4%) foram menores comparativamente aos obtidos por Dini & Freat (2003) ao analisar um Programa de Qualidade para o diagnóstico da malária na África do Sul, no qual em 7 rodadas (2000 – 2002) a média de resultados incorretos foi 13,8%. Considerando que os testes de IFI e de malária são qualitativos e dependem de treinamento e experiência dos técnicos, no resultado de LVC dos laboratórios participantes o desempenho foi considerado bom. Interessante observar que o percentual de erros no exame automatizado (ELISA) foi praticamente idêntico ao do teste de IFI.

Possivelmente em razão do pequeno tamanho amostral (30 laboratórios) e o número absoluto de não-conformidades (10 no total) nesta primeira AEQ-LVC nenhuma das variáveis investigadas no questionário esteve estatisticamente associada ao resultado do painel. Estudo realizado com mesmo tamanho amostral – que incluiu laboratórios com especialidades variadas, embora não tenha encontrado correlação consistente de nenhuma variável de processo e estrutura com o desempenho nos ensaios de proficiência (Peddecord & Cada, 1980) em geral – apontam para a correlação estatisticamente significativa do resultado. Incluíram o tamanho e complexidade do hospital, carga de trabalho e urbanização e percentual de especialização do supervisor. A tendência de uma freqüência discretamente maior de algumas variáveis relacionadas à manutenção, uso de POP e EPI entre os laboratórios classificados como conformes corrobora a importância atribuída a estas práticas. No entanto, não houve diferença entre os dois grupos em outras variáveis igualmente consideradas importantes no que tange à prática e à periodicidade de calibração e verificação de temperatura dos equipamentos.

A distribuição geográfica dos erros é de difícil interpretação. Os erros de métodos semi-automatizados foram mais freqüentes na Região mais rica do país. Com relação aos exames mais subjetivos (IFI) – que dependem de treinamento – ocorrem na Região menos favorecida (Nordeste) (Biól et al., 2002). Com efeito, todos os não-conformes afirmaram oferecer treinamento irregular. Uma explicação plausível é que os erros estariam sendo cometidos por técnicos não-treinados na parte da técnica (ELISA) que depende do indivíduo. Por outro lado, mesmo tendo

mais recursos, os laboratórios da Região Sudeste poderiam não estar calibrando adequadamente os aparelhos utilizados na técnica. Estas informações podem servir de subsídios para organização das propostas de treinamento e manutenção periódicas.

6.3 - Correlação com a realização de AEQ prévio

Um número maior de funcionários exclusivos para a realização de exames sorológicos da LVC, na faixa de 4 a 8 funcionários, era mais freqüente nas instituições que já participaram previamente de uma AEQ. Possivelmente os fatores que contribuem para uma instituição decidir por participar de uma AEQ e as informações veiculadas durante esta participação influenciam decisões futuras sobre a conformação da equipe em termos quantitativos e qualitativos. Contudo, como não foram investigados a temporalidade da participação prévia em AEQ e o número de funcionários, equipes maiores poderiam ter maior interesse em se submeter a estes programas.

As instituições que participaram previamente de uma AEQ possuíam, com maior freqüência, funcionários com pós-graduação na equipe que realiza o exame de LVC. Mais uma vez nosso estudo não permite inferir causalidade, trata-se apenas de uma correlação positiva. No entanto, observam-se indícios que fatores que estimulam o aperfeiçoamento profissional também contribuem para a participação em programas de qualidade. Em verdade, estudo anterior não constatou correlação significativa da participação no Programa de Acreditação pelo CAP (Colégio Americano de Patologistas) e educação e experiência dos funcionários, supervisores e diretores (Peddecord & Cada, 1980).

As planilhas de controle nos equipamentos, por sua vez, são utilizadas por aproximadamente o dobro das instituições que já realizaram uma AEQ prévia (60%), quando comparadas as que nunca participaram (33%), sugerindo que instituições com experiência prévia em AEQ demonstram uma preocupação em registrar vários dados que abrangem a operação, manutenção e validação dos equipamentos que deverão estar descritos em POP. Entretanto, a meta esperada em Boas Práticas é que todos (100%) utilizem estas planilhas.

6.4 - Pesquisa Qualitativa

Dos 40 participantes que retornaram os questionários, apenas 2 (5%) não desejaram expressar nenhum comentário a respeito das questões abertas. Entretanto, o restante dos participantes revelou entre outros aspectos importantes em suas afirmações que as instituições aprovam e necessitam de ações destinadas à melhoria contínua da qualidade de seus serviços, proporcionando acréscimo de confiança relacionada à instituição e aos seus funcionários. Neste item, a maioria das respostas foi concordante e reiterou a importância da participação de suas instituições em um Programa de Avaliação Externa da Qualidade conforme vários trabalhos sugerem que a participação em AEQ melhora o desempenho de um laboratório ao longo do tempo (Strand, 1994; King et al., 1999, Libeer, 2001^a).

Outro item citado foi a garantia de continuidade no fornecimento de kits diagnósticos, com qualidade comprovada, para que não houvesse desabastecimento aos laboratórios e conseqüentemente paralisação em inquéritos para LVC. Este ponto é básico, tendo em vista que a continuidade e o volume de exames na rotina pode melhorar a proficiência do laboratório por oferecer espécimes mais desafiantes (Strand, 1994).

Os laboratórios sugeriram que algumas dificuldades – como o aumento na rotina sorológica sem um correspondente aumento da força de trabalho, a descontinuidade na manutenção de equipamentos, instalações laboratoriais inapropriadas e a periodicidade irregular de treinamentos – poderiam acarretar erros nos testes executados na rotina do laboratório. Observa-se, então, que os responsáveis preocuparam-se em veicular os possíveis motivos para uma deficiente qualidade nos serviços prestados em geral e, do desempenho no ensaio de proficiência em particular, e citaram itens habitualmente implicados em desempenho laboratorial na literatura (Peddecord & Cada, 1980).

7 - CONCLUSÕES

A análise do banco de dados disponibiliza para as instâncias reguladoras um amplo espectro de informações atualizadas do perfil das instituições que realizam exames de saúde pública em LVC.

1) Ressalta aspectos positivos recomendados por BPL como alto percentual de funcionários dedicados exclusivamente a LVC e expressiva utilização de POP e EPI nas atividades laboratoriais.

2) Revela problemas que merecem atenção especial, como, por exemplo, a carência de treinamento regular dos profissionais e deficiência na calibração e manutenção dos equipamentos.

3) Quanto ao perfil das instituições participantes, verificou-se que

a) a maioria (92,5%) das instituições pertence à Rede Pública de Saúde Estadual e Municipal, o que é esperado tendo em vista a aplicação em Saúde Pública do exame diagnóstico para LVC.

b) a implementação deste Programa de AEQ-LVC viabilizou a participação de 18 (45,0%) instituições que não tinham acesso a esse tipo de instrumento da qualidade, possivelmente por questões de custo.

c) praticamente a metade (47,5%) dos laboratórios apresenta uma carga horária parcial de 6 horas/dia de trabalho na rotina e 40,0% ainda não oferecem qualquer treinamento a seus funcionários.

d) quase um terço (30%) dos laboratórios foram não-conformes, embora os percentuais de erros – considerando todos os exames realizados – tenham sido pequenos (da ordem de 3,4% no teste de ELISA e 3,7% no teste de IFI).

e) a participação prévia em AEQ correlacionou-se com número maior de funcionários exclusivos na equipe, pós-graduação como nível máximo de instrução da equipe, e uso rotineiro de planilhas de controle.

8 - RECOMENDAÇÕES

Duas ações, a nosso ver, poderiam contribuir para a melhoria do desempenho dos laboratórios na execução dos testes sorológicos para LVC:

1) A elaboração de cursos e “workshops”, voltados para os funcionários envolvidos com a rotina sorológica dos diversos laboratórios (LACEN e CCZ) participantes do Programa de Avaliação Externa da Qualidade para LVC. Essa iniciativa iria contribuir para o treinamento dos técnicos obedecendo a prazos estabelecidos, contribuindo para o aperfeiçoamento profissional, além de proporcionar troca de experiência e entrosamento entre os profissionais de diversos estados do país.

2) O financiamento para adoção de um serviço que realize a manutenção e calibração de equipamentos envolvidos diretamente na execução dos testes de sorologia na rede pública de laboratórios, tais como leitores de ELISA e microscópios de imunofluorescência.

Sejam estas recomendações, advindas de uma pesquisa específica, adotadas ou não, fica a sugestão de que melhorias no campo da AEQ-LVC ainda têm de ser realizadas, a bem da comunidade, como se quer de um exercício científico, atuante e capaz de atender a demanda gerada pelo quadro epidemiológico do país – conforme sabiamente estabelece o estatuto do próprio Bio-Manguinhos.

9 – ANEXOS

9.1 – Carta Convite

Ofício s/nº /DERED/2006

Rio de Janeiro, 25 de setembro de 2006.

Prezado(a) Dr(a),

É com muita satisfação que através desta, venho formalizar o convite para cadastramento de sua Instituição no novo Programa de “Avaliação Externa da Qualidade dos testes sorológicos para leishmaniose visceral canina – AEQ-LVC”, em parceria com a Coordenação Geral de Laboratórios da Secretaria de Vigilância em Saúde, do Ministério da Saúde (CGLAB/SVS/MS). Esclareço que a indicação para participação de sua Instituição foi feita pela Dra. Suelene Mamede de Oliveira, da CGLAB/SVS/MS.

O controle externo é um instrumento necessário de avaliação da qualidade e confiabilidade dos testes sorológicos. A implementação de um Programa de Avaliação Externa da Qualidade em Sorologia, contribui para a melhoria contínua dos resultados obtidos nos Serviços Laboratoriais, bem como, representa uma ferramenta educacional de extrema importância.

O resultado deste trabalho deverá influir significativamente no Controle de Qualidade dos serviços de sorologia da leishmaniose visceral canina, sendo de grande impacto social, em apoio às diversas ações estratégicas do Ministério da Saúde.

Em anexo, segue um questionário que deverá ser preenchido e devolvido o mais breve possível, ao endereço do remetente para formalizar a sua intenção em participar do Programa AEQ-LVC. Esclareço que todas as informações fornecidas **serão tratadas de forma estritamente confidencial**.

Atenciosamente,

Dulce Lemos Lopes

Departamento de Reativos para Diagnóstico

Bio-Manguinhos/Fiocruz

9.2 – Questionário

Questionário para cadastramento institucional
Pré-teste para Avaliação Externa da Qualidade
em leishmaniose visceral canina.

Dados Gerais:

1. Nome da Instituição: _____
2. Código: _____
3. Nome do Diretor: _____
4. Nome do técnico Responsável: _____
5. Em que categoria sua Instituição está incluída?
 1. Federal
 2. Estadual
 3. Municipal
 4. Privado

Informações institucionais:

1. Sua instituição participa de outro Programa de Avaliação Externa da Qualidade:

Em caso afirmativo, favor relacionar.

1. Sim, atualmente

Nacional: _____

Internacional: _____

2. Sim, no passado

Nacional: _____

Internacional: _____

3. Nunca participei.

2. O seu serviço de sorologia, possui profissionais que realizam exclusivamente exames para leishmaniose visceral canina ?

1. Sim Quantos: _____ 2. Não

3. Qual a carga horária diária dos funcionários da sorologia?

Integral (8 horas)

parcial (4 horas)

Outros: _____

4. Na tabela abaixo, cite o nível de instrução e o tempo de experiência (em anos) de cada um dos funcionários que realizam exames sorológicos para LVC em seu serviço, como no exemplo:

Opções de nível de instrução: Fundamental; Técnico; Nível superior; Especialistas, Mestres e Doutores.

nº Prof.	Nível de instrução	Tempo de experiência (anos)	
		ELISA	IFI
02	fundamental	10	5

5. Os profissionais de sua equipe realizam treinamentos em Diagnóstico para LVC?

1. Sim
2. Não

5.1. Em caso afirmativo, qual a periodicidade?

1. < semanal
2. semanal
3. anual
4. > anual ou irregular

6. Qual a quantidade (%) aproximada de resultados positivos para leishmaniose visceral canina encontra nas amostras em sua rotina?

Informações estruturais:

1. O seu laboratório tem o Procedimento Operacional Padrão (pop) para a rotina sorológica para LVC:

1. Sim
2. Não
3. Não sei informar

2. Todos os funcionários do laboratório de sorologia utilizam equipamentos de proteção individual (EPI), tais como, luvas descartáveis, jaleco e óculos de proteção?

1. Sim
2. Não

3. Os materiais de seu laboratório (pipetadores e multipipetadores automáticos, balanças, etc.) são calibrados periodicamente?

1. Sim
2. Não

3.1. Em caso afirmativo, qual a periodicidade?

1. < semanal
2. semanal
3. anual
4. > anual ou irregular

4. Nos equipamentos de seu laboratório, tais como, geladeiras. Freezers, estufas a temperatura interna é verificada diariamente?

1. Sim
2. Não

4b.

1. manhã
2. tarde
3. manhã e tarde
4. irregular

5. Os equipamentos de seu laboratório, tais como, centrífugas. leitor de ELISA, Microscópio e lavadora de placas, possuem planilha de controle de utilização?

1. Sim
2. Não

6. A sua instituição possui profissionais que realizam a manutenção preventiva de equipamentos?

1. Sim
2. Não

7. No seu laboratório existe controle de temperatura do ambiente verificada diariamente?

1. Sim
2. Não

Gostaríamos de conhecer a sua opinião. Se houver alguma sugestão ou críticas relacionadas aos itens abaixo descritos, por favor registrar nos espaços correspondentes.

- ❖ **Sobre o Programa de Avaliação Externa da Qualidade em Leishmaniose Canina Visceral:**

- ❖ **Sobre os Kits diagnósticos utilizados em sua rotina:**

- ❖ **Sobre a Rotina de trabalho:**

Se houver quaisquer dúvidas relacionadas ao preenchimento do questionário, favor comunicar-se conosco:

Fundação Oswaldo Cruz / Bio-Manguinhos /
Departamento de Reativos para Diagnóstico
A/C: Dulce Lemos Lopes
Av. Brasil, 4365 - Manguinhos - CEP: 21045-900 - Rio de Janeiro - RJ.
Telefones: (21) 3882-9399 / 3882-9391 Fax: (21) 2260-4727
e-mail: Dulce@bio.fiocruz.br

9.3 – Tabela de Resultados



MINISTÉRIO DA SAÚDE
 SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE
 Esplanada dos Ministérios, Edifício Sede, 1º andar, sala 155
 Cep. 70.058-900 Brasília-DF
 Tel: (61) 3315.3706

Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública - CGLAB/SVS/MS
AVALIAÇÃO EXTERNA DA QUALIDADE DE TESTES SOROLÓGICOS - TABELA DE RESULTADOS AEQ-LVC-01

L E I S H M A N I O S E C A N I N A

Número da Amostra	<u>METODOLOGIAS E RESULTADOS</u>													
	ELISA			Imunofluorescência				Outros I				Outros II		
	NR	I	R	NR	I	R	TÍTULO	NR	I	R	TÍTULO	NR	I	R
1														
2														
3														
4														
5														
6														

NR = Não Reagente

I = Indeterminada

R = Reagente

Metodologia	Número/Nome do Kit	Fabricante	Lote	Datas	
				Validade do Kit	Realização do Teste
ELISA					
Imunofluorescência					
Outros I					
Outros II					

**9.3 – Tabela de Resultados -
Continuação**



MINISTÉRIO DA SAÚDE
SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE
Esplanada dos Ministérios, Edifício Sede, 1º andar, sala 155
Cep. 70.058-900 Brasília-DF
Tel: (61) 3315.3706

AVALIAÇÃO EXTERNA DA QUALIDADE DE TESTES SOROLÓGICOS

leishmaniose visceral canina

Nome: _____

Nº da Instituição: _____

Endereço: _____

CEP: _____ **Cidade/Estado:** _____

Telefone: _____ **Fax: ()** _____

Diretor: _____

E-mail: _____

Responsável pelo serviço de Sorologia: _____

Tel.: _____ **E-mail:** _____

Assinatura: _____

9.3 – Tabela de Resultados - Continuação



MINISTÉRIO DA SAÚDE
SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE
Esplanada dos Ministérios, Edifício Sede, 1º andar, sala 155
Cep. 70.058-900 Brasília-DF
Tel: (61) 3315.3706

INSTRUÇÕES DE PREENCHIMENTO DOS FORMULÁRIOS

Leia com atenção as instruções de uso dos painéis e o rótulo de cada frasco, para prevenir a troca de amostras.

Todas as amostras do painel devem receber tratamento idêntico ao que é dispensado às amostras da sua rotina.

Junto com o painel segue o formulário para resposta. A tabela deve ser preenchida com letra legível. Veja a seguir as instruções para o preenchimento das tabelas que compõe o formulário.

Os resultados dos testes de triagem deverão ser reportados como **NR** (não reagente), **I** (indeterminado) ou **R** (reagente). Além disso, o teste de imunofluorescência deve ter seus títulos relatados.

Relate também o número de lote e data de vencimento de cada conjunto diagnóstico que você utilizou, bem como a data de execução dos testes.

Preencha os campos “NOME DO KIT E FABRICANTE” com letra legível e envie juntamente com esse formulário a bula do conjunto diagnóstico que você utilizou.

ATENÇÃO: Preencha somente os campos relativos aos procedimentos que você efetivamente realiza em sua rotina. **Não submeta as amostras deste painel a testes que você não faz com as amostras da sua rotina.**

Lembre-se que o preenchimento incorreto desse formulário prejudica a análise dos dados da sua instituição e que somente as instituições que acertarem 100% dos parâmetros analisados recebem o certificado de qualidade desse programa.

Enviar os formulários devidamente preenchidos para:

**Fundação Oswaldo Cruz / Bio-Manguinhos /
Departamento de Reativos para Diagnóstico
A/C: Dulce Lemos Lopes
Av. Brasil, 4365 – Manguinhos – CEP: 21045-900 – Rio de Janeiro -RJ
Telefones: (21) 3882-9399 / 3882-9391 FAX: (21) 2260-4727
e-mail: dulce@bio.fiocruz.br**

9.4 – Carta encaminhada junto com painel.



Fundação Oswaldo Cruz

Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – Bio-Manguinhos



Em 11 de Dezembro de 2006.

Prezado(a) Dr(a),

É com muita satisfação que estamos encaminhando o primeiro painel para “**Avaliação Externa da Qualidade dos testes sorológicos para leishmaniose visceral canina – AEQ-LVC**”.

A análise dos dados irá considerar os resultados obtidos na caracterização realizada por laboratórios de excelência. Além disso, serão excluídas as amostras que não obtiverem pelo menos 60% de concordância entre os resultados obtidos pelos participantes.

A utilização de kits fora do prazo de validade e o envio dos formulários após o prazo estabelecido serão critérios de exclusão do participante nesta análise.

Solicitamos a gentileza de lembrar aos técnicos de sua equipe, a importância do preenchimento correto e completo dos formulários de resultados.

Ressaltamos que todos os itens serão avaliados e o preenchimento incorreto de qualquer uma das informações solicitadas, implica em perda de pontos e conseqüentemente a não obtenção do certificado de qualidade.

Os resultados deste painel deverão ser encaminhados, **impreterivelmente até o dia 10 de janeiro de 2007** para:

Fundação Oswaldo Cruz / Bio-Manguinhos /
Departamento de Reativos para Diagnóstico
A/C: Dulce Lemos Lopes

Av. Brasil, 4365 – Manguinhos – CEP: 21045-900 – Rio de Janeiro-RJ
Telefones: (21) 3882-9399 / 3882-9391 FAX: (21) 2260-4727
e-mail: dulce@bio.fiocruz.br

Despedimo-nos agradecendo sua participação, colocando-nos à sua disposição para fornecer qualquer esclarecimento adicional que se faça necessário e também para receber suas críticas e sugestões.

Atenciosamente,

Dulce Lemos Lopes
Responsável pelo Laboratório de produção de painéis sorológicos
– LAPPS/DERED/Bio-Manguinhos/Fiocruz

9.5 – Respostas (na íntegra) às questões abertas do Questionário.

QUESTÃO 1 - Gostaríamos de conhecer sua opinião sobre o Programa de Avaliação Externa da Qualidade em Leishmaniose Visceral Canina:

É positivo, pois dá credibilidade e segurança aos nossos diagnósticos perante a população cada vez mais exigente das instituições públicas, sabendo esta que o laboratório tem avaliação de qualidade do fabricante dos kits, torna-nos profissionais cada vez mais respeitados.

Gostaria de participar de reciclagem para melhorar meus conhecimentos.

Que seja realizado periodicamente.

Extremamente necessário para a qualidade dos resultados dos exames.

Importante e necessário para manutenção das rotinas de inquéritos sorológico canino. Melhoria na padronização técnica, qualidade e confiabilidade dos resultados.

Não temos, mas achamos necessário e importante termos o controle externo.

É necessário para melhoria de qualidade

Será um importante instrumento de avaliação técnica para o direcionamento das ações laboratoriais.

É importante porque permite uma avaliação das atividades (controle de qualidade) e adequação dos procedimentos operacionais padrão (pop).

É de grande importância para avaliar a qualidade dos serviços oferecidos, dando maior confiabilidade aos exames.

O programa de avaliação externa da qualidade contribuirá positivamente nos diagnósticos desse laboratório, no que tange ao apoio e suporte a nós dispensados, se realmente houver continuidade, haja visto a falta de equipamentos e manutenção nos equipamentos existentes e reposição de materiais descartáveis(ex: lamínulas, ponteiras, tubo p/ centrifuga, etc).

Muito importante uma avaliação externa, melhora a qualidade do serviço, aumenta ou diminui o grau de confiabilidade.

É importante para avaliação das atividades desenvolvidas nas rotinas no laboratório do CCZ.

Importante para avaliação e fundamental para aprimoramento da qualidade principalmente considerando o número de amostras recebidas e processadas mensalmente – 18.000.

É necessário fazer esse controle.

Considero de extrema importância o programa AEQ-LVC que poderá proporcionar a melhoria da qualidade dos exames laboratoriais e conseqüentemente maior confiabilidade no serviço.

Acho bom, pois será uma ferramenta a mais para testar a qualidade de nossos serviços, e até mesmo uma oportunidade de corrigir possíveis falhas.

É com grande satisfação que iremos participar deste programa pois, sua importância esta intrinsecamente ligada a segurança no fornecimento do laudo, não deixando dúvidas para eventuais contestações.

É essencial, e sinto falta dele há tempos. Não há a quem recorrer no meu estado para tirar dúvidas, pois o LACEN não trabalha com LV.

Importante ferramenta para que as instituições se enquadrem nas boas praticas laboratoriais e que por conseqüência forneçam um serviço de maior qualidade.

Envio regular da avaliação externa da qualidade.

É de grande importância, pois dessa forma esse novo modelo de avaliação trará uma resposta mais rápida aos anseios dos profissionais deste laboratório: realizar diagnóstico com qualidade e prestar serviços laboratoriais com excelência a população deste Estado.

O programa realizado pela FUNED através do LACEN, tem sido muito importante, pois tem treinado, avaliado e conduzido os nossos profissionais na elevação, avaliação e divulgação dos resultados.

Deveria ser introduzido periodicamente, também para outros diagnósticos pois trata-se de ótima ferramenta para avaliar nosso desempenho.

Fundamental para que se possa ter conhecimento da real situação da rede de laboratórios de diagnóstico da LVC.

É de suma importância para o serviço de Leishmaniose para que possamos trabalhar com mais segurança e apoio.

Uma boa oportunidade para medirmos a qualidade nos procedimentos.

Envio regular da Avaliação externa da qualidade.

Se faz necessário, mesmo para a segurança dos nossos resultados. Todavia temos a dificuldade de enviar as amostras para controle.

QUESTÃO 2 – Gostaríamos de conhecer sua opinião sobre os Kits utilizados em sua rotina:

Já tivemos problemas com kits com resultado falso positivo, mais o problema foi resolvido.

Que não haja interrupção no fornecimento.

Em alguns kits de Elisa o controle positivo dá valores abaixo do esperado na validação do teste. O kit de IFI algumas vezes não reproduz resultados.

Elisa: elevada variação do cut-off em um mesmo lote, índice de positividade de até 50% das amostras.

IFI: Variação de quantidade de antígeno, freqüentemente os controles + e – não se reproduzem.

O Elisa tem alta sensibilidade com valor de corte (cut-off) baixo. O kit IFI, tem apresentado queda na titulação, num período extremamente curto, que em alguns kits, inviabiliza a sua utilização.

Observamos em 1 lote do kit IFI presença de fluorescência na lâmina de controle negativo.

Temos dúvida se há possibilidade de intercorrência nos resultados considerando que as amostras são colhidas em papel de filtro e os controles são soros.

O controle positivo só dá reação positiva até o título de 1:320.

Kits com validade vencendo dentro de um mês; Lâminas de qualidade ruim, dificultando o diagnóstico.

Acho que deveria existir no mercado brasileiro mais variedades (opções) de kits. Hoje só existem dois kits registrados.

Apresentação e itens é boa, porém há um problema de repetibilidade.

Kit Elisa – foram irregular

Kit IFI – Não foi possível a titulação, dessa forma impossibilitando a realização do exame.

IFI – Utilizamos antígenos de L. (L) chagasi e conjugado anti-cão produzido em nosso laboratório.

Elisa – Utilizamos kit de Bio-Manguinhos em trabalhos de pesquisa.

O desabastecimento prejudica planejamento e compromete o programa de prevenção e controle do município.

Este ano (2006) tivemos problema com a interrupção no fornecimento dos kits o que prejudicou o andamento dos trabalhos.

Poderiam conter informações mais detalhadas sobre os antígenos

utilizados, possíveis problemas etc. na bula que acompanha o kit.

Os Kits da Bio-Manguinhos para diagnóstico da LVC oferecem resultados bastante reprodutíveis. A porcentagem de falsos positivos encontrados na técnica de Elisa é baixa (até 1%). Os problemas referentes aos kits são raros.

Boa qualidade e prático, pois consta-me que anteriormente era necessário preparar alguns reagentes, que hoje vem pronto, bem como as lâminas.

Quando se realiza uma titulação de conjugado e termina o antígeno do lote de IFI, e então abre-se uma nova caixa de IFI de lote diferente, pode-se usar o conjugado do lote antigo com o antígeno do novo lote, uma vez que sempre sobra conjugado quando acaba o kit?

Por algumas vezes a rotina do diagnóstico ficou prejudicada por conta do atraso no fornecimento do kit ifi canino, mais a 2 quantidades de exames que é preconizada no kit nos fornece uma boa margem de tempo na nossa rotina de trabalho.

Melhorar as amostras para controle positivo (aumentar a titulação talvez), pois alguns kits apresentaram controle positivo com pouca fluorescência.

Os exames realizados revelam grande quantidade de resultados inconclusos e conflitantes do mesmo animal. No geral são bons.

São kits fornecidos pela Bio-Manguinhos que constantemente apresentam problemas em sua qualidade dos reagentes, na qualidade dos produtos e na irregularidade na distribuição.

Regularidade – melhorar

Qualidade – melhorar

Alguns kits para LVC apresentam divergências dos resultados entre Elisa e IFI, ou seja, a imunofluorescência positiva não foi confirmado pela FUNED.

No período em que ocorre a paralisação no fornecimento dos kits, a rotina laboratorial sofre descontinuidade, gerando descontentamento dos pacientes, proporcionando manifestações públicas.

O kit de Elisa utilizado teve uma melhora acentuada em sua sensibilidade, mas precisa melhorar mais. Já a IFI tem sido utilizado como triagem e também como adjuvante e até confirmatório de resultados obtidos no Elisa.

Os antígenos usados para os kits não são específicos com isso os títulos sempre são baixos (IFI) tanto em cães como para humanos. Em alguns testes de Elisa e IFI canino os resultados divergentes mesmo com densidade ópticas elevadas no Elisa (positivo).

Baixa especificidade (inespecíficas)

*Baixa reprodutibilidade
Alta sensibilidade*

Somente em algumas ocasiões não são atendidos os nossos pedidos.

Devido algumas discordâncias entre os 2 métodos (EIE e IFI), sugerimos que um percentual das amostras negativas no EIE (ex: 10 %) sejam testadas no IFI.

QUESTÃO 3 – Gostaríamos de conhecer sua opinião sobre a rotina de trabalho:

É suficiente para realização dos trabalhos.

Possuímos uma rotina de trabalho em torno de 4500 exames de LVA/mês com tendência de aumento significativo devido ao avanço rápido da doença nos municípios e o aumento dos municípios em que a doença está se instalando.

Rotina grande, não temos funcionários de dedicação exclusiva ao LVA canino. Trabalhamos com outros programas de diagnóstico em saúde pública e não temos problemas que o diagnóstico da LVA canino apresenta.

Aquisição de equipamentos de utilização exclusiva para a rotina de trabalho.

Melhoria na qualidade dos kits fornecidos para agilizar o diagnóstico com maior segurança. Fornecimento regular de kits para atender à demanda do programa.

Recursos humanos insuficientes para atender à demanda da região.

Gostaríamos que Fiocruz – Bio-Manguinhos promovesse um encontro para expor (falar) sobre os kits de EIE, IFI e demonstração quanto a execução dos testes de LCV com seus produtos.

A metodologia utilizada para diagnóstico era através de amostras sanguíneas em papel de filtro. Com a mudança para amostra sorológica a partir de agosto/2006, estamos em fase de adaptação pois os municípios que compõem esta gerência regional, foram capacitadas para coleta e procedimentos preliminares e estão se adequando gradativamente.

Toda manutenção de equipamentos e aparelhos são de competência da prefeitura, que muitas vezes não atendem nossas solicitações.

Satisfatória.

A demanda de MG vem sendo crescente.

Informamos que o laboratório foi implantado no CCZ em dez/2005, e

ainda estamos adequando as estruturas físicas existentes. Dessa forma ainda realizamos modificações para melhorar a qualidade dos exames realizados.

As amostras são testadas por meio de IFI, sendo que as para as amostras reagentes recomenda-se a coleta de material para diagnóstico parasitológico e molecular realizado em nosso laboratório. Os laudos das amostras reagentes, vindo de clínicos e laboratórios, só são liberadas mediante informação da procedência e deslocamento do animal. Os animais com sorologia reagente, sem histórico de passagem por área endêmica e residentes no município de São Paulo, são investigados pela instituição. A nossa rotina compõe-se de amostras oriundas de clínicas e lab. Veterinários, vigilância epidemiológica do município de São Paulo e outros municípios quando solicitado.

O trabalho é realizado buscando manter a qualidade e agilidade necessária para subsidiar as ações de campo.

Nossa rotina, no diagnóstico de LVC, é pequena, porém o técnico é experiente no diagnóstico devido a experiências anteriores.

O laboratório do CCZ de Ibirité realiza o diagnóstico de LVC, utilizando as técnicas de Elisa e IFI. Além disso, são realizados exames de Kato Katz para o programa de controle da esquistossomose e também trabalhos de entomologia, com a identificação de larvas e insetos adultos, vetores de doenças como a dengue e leishmaniose.

Gostaríamos de treinamentos em tempos menores, ou seja, com maior regularidade. E que os kits não faltassem tanto, pois atrapalha o andamento do serviço.

Na nossa rotina, os testes são feitos com eluato de amostras de sangue colhidas em papel de filtro. Gostaria de receber informações e artigos técnicos a respeito da confiabilidade e da relação existente entre testes realizados com soro ou com papel de filtro (eluato).

Está diretamente ligada a presteza no envio de kits para nossa instituição.

A média diária de exames é de 400 animais, o que cansa na leitura, pois só fazemos IFI. Houve uma melhoria na qualidade do trabalho quando passamos a coletar sangue na veia e usar soro em lugar do eluato.

É de externa importância haver um controle tanto no que diz respeito à qualidade profissional envolvido no diagnóstico sorológico quanto aos equipamentos utilizados para tanto. Que esses profissionais sejam constantemente atualizados e recebam um bom suporte técnico para trabalhar com segurança.

Dificultada pelo sistema de coleta realizado pelos municípios (papel de filtro, continuidade, número de amostras).

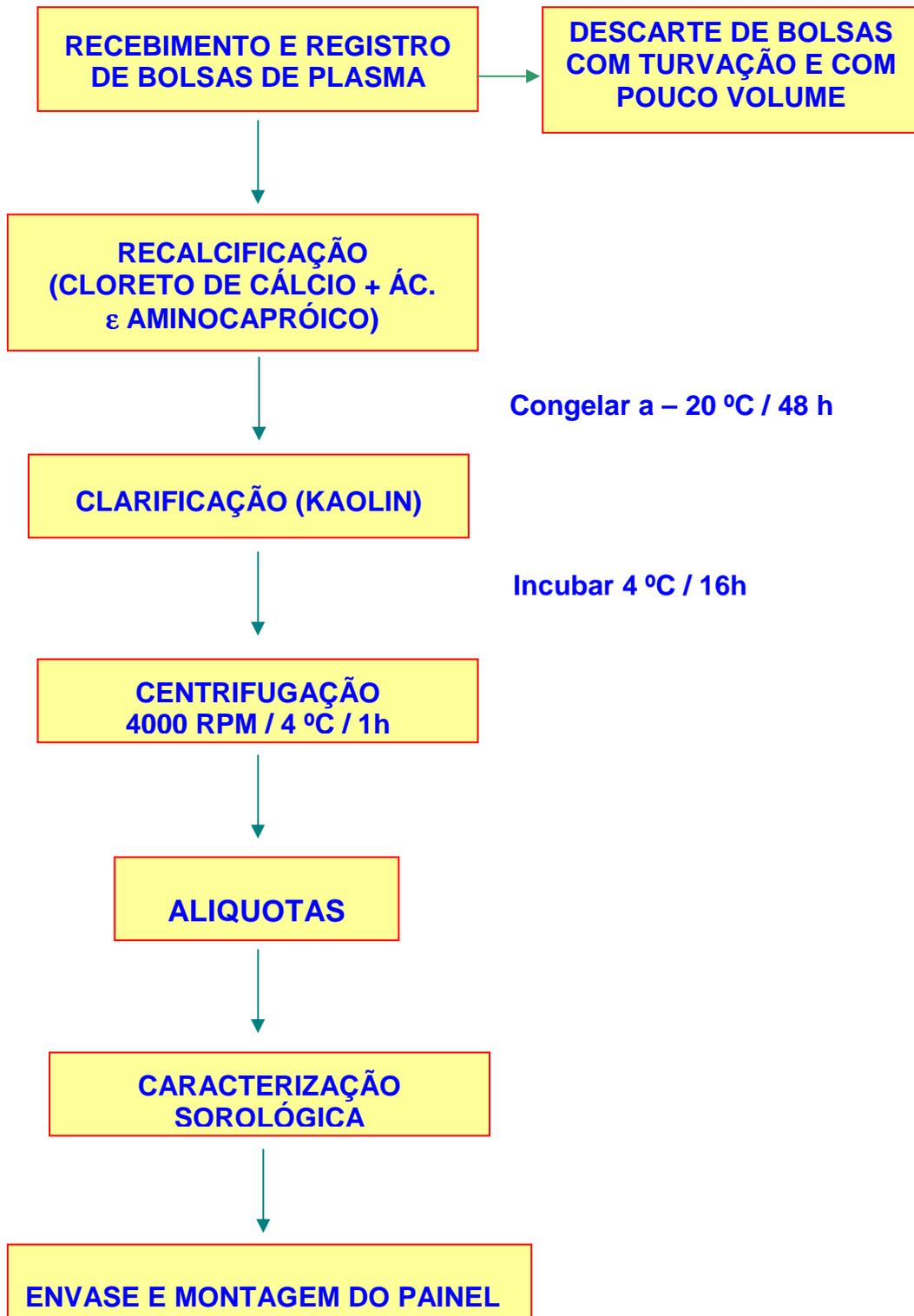
Está dentro da normalidade.

Temos observado ultimamente que o número de parasitos no antígeno está escasso, prejudicando o teste na hora da leitura.

*A nossa sala de trabalho é pequena e dificulta a rotina de trabalho.
Os problemas de validação dos kits geram abastecimento inadequado dos laboratórios e conseqüentemente atraso na rotina de trabalho.*

9.6 – Fluxograma

Fluxograma do processamento das bolsas e do protocolo padrão de recalcificação.



9.7 – Resultados do painel das instituições participantes.

IDENT		EIE								IFI						
Código do Lab	Prazo de Entrega	Validade	A1	A2	A3	A4	A5	A6	Validade	A1	A2	A3	A4	A5	A6	
2	OK	-	-	-	-	-	-	-	OK	R	R	NR	R	R	NR	
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
4	OK	-	-	-	-	-	-	-	OK	R	R	NR	R	R	NR	
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
6	OK	OK	R	R	NR	R	R	NR	OK	R	R	S/R	R	R	S/R	
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
8	OK	OK	R	R	NR	R	R	NR	OK	R	R	NR	R	R	NR	
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
11	OK	OK	R	R	R	R	R	NR	OK	R	R	NR	R	R	NR	
14	OK	-	-	-	-	-	-	-	OK	R	R	I	R	R	NR	
15	OK	-	-	-	-	-	-	-	OK	R	R	NR	R	R	NR	
16	OK	-	-	-	-	-	-	-	OK	R	R	NR	R	R	NR	
17	OK	OK	R	R	NR	R	R	NR	OK	R	R	NR	R	R	NR	
18	OK	OK	R	R	NR	R	R	NR	OK	R	R	NR	R	R	NR	
19	OK	OK	R	R	NR	R	R	NR	OK	R	R	NR	R	R	NR	
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
21	OK	OK	R	R	NR	R	R	NR	OK	R	R	NR	R	R	NR	
22	OK	-	-	-	-	-	-	-	OK	R	R	NR	R	R	NR	
23	OK	OK	R	R	NR	R	R	NR	OK	R	R	NR	R	R	NR	
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
25	OK	-	-	-	-	-	-	-	OK	R	R	NR	R	R	NR	
26	OK	OK	R	R	NR	R	R	NR	OK	R	R	NR	R	R	NR	
27	OK	OK	R	R	I	R	R	NR	OK	R	R	NR	R	R	NR	
28	OK	OK	R	R	R	R	R	NR	OK	R	R	NR	R	R	NR	
29	OK	-	-	-	-	-	-	-	OK	NR	R	NR	R	R	NR	
30	OK	-	-	-	-	-	-	-	OK	R	R	I	R	R	NR	
32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
33	OK	-	-	-	-	-	-	-	OK	R	R	NR	R	I	NR	
35	OK	OK	R	R	R	R	R	NR	OK	R	R	I	R	R	NR	
36	OK	OK	R	R	NR	R	R	NR	OK	R	R	NR	R	R	NR	
39	OK	OK	R	R	NR	R	R	NR	OK	R	R	NR	R	R	NR	
40	OK	OK	R	R	NR	R	R	NR	OK	R	R	NR	R	R	NR	
41	OK	OK	R	R	NR	R	R	NR	OK	R	R	S/R	R	R	S/R	
42	OK	OK	R	R	NR	R	R	NR	OK	R	R	NR	R	R	NR	
43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
44	OK	-	-	-	-	-	-	-	OK	R	R	I	R	R	NR	
45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
46	OK	-	-	-	-	-	-	-	OK	R	R	NR	R	R	NR	
49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
51	OK	OK	R	R	NR	R	R	NR	OK	R	R	NR	R	R	NR	

Legenda

R Reativo
 NR Não Reativo
 I Indeterminado
 S/R Sem resultado

10 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acha PN, Szyfres B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 2 ed. Washington: OPAS, 1989.

Albert A, De Moor G, Libeer JC. External quality assessment (EQA) of Belgian clinical laboratories. The telematics paradigm. Clinica Chimica Acta. 1998; 270: 43-54.

Alencar JE, Neves J, Dietze R. Leishmaniose Visceral (Calazar). In: Veronesi R. Doenças infecciosas e parasitárias. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1991. 86: 706-717.

Alves WA, Bevilacqua PD. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquérito epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. Caderno de Saúde Pública. 2004; 20: 259-265.

Andrade HM, Reis AB, Santos SL, Volpini AC, Marques MJ, Romanha AJ. Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. Veterinary Parasitology. 2006; 140: 231-238.

Arias JR, Monteiro PS, Zicker F. The Reemergence of Visceral Leishmaniasis in Brazil. Emerging Infectious Diseases. 1996; 2: 145-6.

Badaró R, Benson D, Eulálio MC, Freire M, Cunha S, Netto EM, et al. rK39: A cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. The Journal of Infectious Diseases. 1996; 173: 758-761.

Barata RA, Silva JCF, Costa RT, Fortes-Dias CL, Silva JC, Paula EV. Phlebotomine sand flies in Porteirinha, an area of American Leishmaniasis transmission in the state of Minas Gerais – Brasil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2004; 99: 481-487.

Barbiéri CL. Immunology of canine leishmaniasis. Parasite Immunology. 2006; 28: 329-331.

Barrouin-Melo SM, Larangeira DF, Filho AA, Trigo J, Julião FS, Franke CR, et al. Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniosis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals. The Veterinary Journal. 2006; 171: 331-339.

Berrahal F, Mary C, Roze M, Berenger A, Escoffier K, Lamouroux D, et al. Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. American Journal Tropical Medicine Hygiene. 1996; 55: 273-277.

Bhatia A, Daifalla NS, Jen S, Badaró R, Reed SG, Skeiky YAW. Cloning, characterization and serological evaluation of K9 and K26: two related hydrophilic antigens of *Leishmania chagasi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1999; 102: 249-261.

Biól AF, Garcia-Malo F, Canepa MLA, Doncel S, Espinoza R, Moreno R, et al. Implementation and evaluation of a National External Quality Control Program for Cervical Cytology in México. *Salud pública de México*. 2002; 44 (5): 431-436.

Boley N. Use and abuses of PT. Accreditation and quality assurance. 2004; 9: 633-634.

Brookman B, Papadakis I, Squirrell A, Evans S, Ellison S, Örnemark U, et al. Proficiency testing in analytical chemistry, microbiology and laboratory medicine: working group discussions on current practice and future directions. *Accreditation and quality assurance*. 2004; 9: 635-641.

Burns Junior JM, Shreffler WG, Benson DR, Ghalib HW, Badaró R, Reed SG. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detect specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*. 1993; 90: 775-779.

Cabrera MAA. Ciclo enzoótico de transmissão da *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Cunha e Chagas, 1937) no ecótopo peridoméstico em Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro – RJ: estudo de possíveis variáveis preditoras. 1999; 84p. [Tese de Mestrado] – Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública.

Carter JY, Lema OE, Adhiambo CG, Materu SF. Developing external quality assessment programmes for primary health: care level in resource limited countries. *Accreditation and quality assurance*. 2002; 7: 345-350.

Carvalho SFG, Lemos EM, Corey R, Dietze R. Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of brazilian visceral leishmaniasis. *American Journal Tropical Medicine Hygiene*. 2003; 68: 321-324.

Chelala C. Perspective the poor man`s disease. [on-line]. 2004 [capturado em 20 de janeiro de 2006]. Disponível em http://www.himalmag.com/2004/march_april/perspective.htm.

Ciaramella P, Oliva G, Luna RD, Gradoni L, Ambrosio R, Cortese L et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *The Veterinary Record*. 1997; 141: 539-543.

Costa CHN, Pereira HF, Araújo MV. Epidemia da Leishmaniose Visceral no estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. *Revista de Saúde Pública*. 1990; 24: 361-372.

Counotte G, Van Dijk D, Van Loenen-Imming DC, Oussoren W, Van der Vat B, Visser RG. *Eurachem guide on selection, use and interpretation of PT schemes*. Holanda, 2000.

Cunha AM. A soroaglutinação das leishmanias. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1942; 37: 35-37.

Deane LM, Deane MP. Encontro de leishmanias nas vísceras e na pele de uma raposa em zona endêmica de Calazar, nos arredores de Sobral, Ceará. *O Hospital*. 1954a; 45: 419-421.

Deane LM, Deane MP. Infecção experimental do *Phlebotomus longipalpis* em caso humano de Leishmaniose Visceral. *O Hospital*. 1954b; 46: 487-489.

Dini L, Freaux J. Quality assessment of malaria laboratory diagnosis in South Africa. *Transactions of the Royal Society of tropical Medicine and Hygiene*. 2003; 97: 675-677

Dufflo B. Exame imunológico parasitário. In Fréjaville JP, Kamoun P. *Manual de exames de laboratório*. 1 ed. São Paulo: Atheneu; 1989: 98.

Evans TG, Teixeira MJ, McAuliffe IT, Vasconcelos IAB, Vasconcelos AW, Sousa AQ, et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis in northeast Brazil. *The Journal of Infectious Diseases*. 1992; 166: 1124-1132.

Ferreira AGP, Silva ED, Silva ED, Araújo ALFM, Larosa RM, Tanigushi R, et al. Kit EIE/LVA Canina/Bio-Manguinhos: Adaptação para processamento de amostras de sangue coletadas em papel filtro. In: XVI Reunião aplicada em Doenças de Chagas; IV Reunião aplicada em Leishmaniose. Uberaba/MG, 2000.

Ferreira MU, Foronda AS, Schumaker TTS. *Fundamentos biológicos da parasitologia humana*. 1ed. São Paulo: Manole; 2003: 37-46.

Genaro O. Leishmaniose Visceral americana. In: Neves DP. *Parasitologia Humana*. 9 ed. São Paulo: Atheneu; 1995: 64-81.

Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. 2004; 7: 338-349.

Ikonomopoulos J, Kokotas S, Gazouli M, Zavras A, Stoitsiou M, Gorgoulis VG. Molecular diagnosis of leishmaniosis in dogs comparative application of traditional diagnostic methods and the proposed assay on clinical samples. *Veterinary Parasitology*. 2003; 113: 99 -113.

Koutinas AF, Polizopoulou ZS, Saridomichelakis MN, Argyriadis D, Fytianou A, Plevraki KG. Clinical considerations on canine leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989 – 1996). *Journal of the American Animal Hospital Association*. 1999; 35: 376-383.

King B, Boley N, Kannan G. The correlation of laboratory performance in proficiency testing with other QA characteristics. *Accreditation and quality assurance*. 1999; 4: 280-291.

Lacerda MM. The brazilian leishmaniasis control program. Research and control of leishmaniasis in Brazil. Proceedings of a National Workshop; 1993 Setembro 13-17; Recife, Brasil. Centro de pesquisa Aggeu Magalhães; 1993.

Lainson R & Rangel EF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American viscera leishmaniasis, with particular reference to Brazil – A Review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2005; 100: 811-827.

Libeer JC. Role of external quality assurance schemes in assessing and improving quality in medical laboratories. *Clinica Chimica Acta*. 2001^a; 309: 173-177.

Libeer JC. External quality assurance programmes in medical laboratories. *Accreditation and quality assurance*. 2001^b; 6: 151-153.

Libeer JC, Richardson H, Bullock D, Heuck C, Tholen D, Martin R, et al. Addressing issues associated with the development and management of PT programs and with their optimum use. *Accreditation and quality assurance*. 2002; 7: 320-334.

Lopes DL. Confiabilidade dos testes sorológicos realizados pelos Serviços de Hemoterapia participantes do Programa de Avaliação Externa da Qualidade em Sorologia (2001/2003). Rio de Janeiro; 2005; Mestrado Profissional [Dissertação Mestrado Profissional em Tecnologia de Imunobiológicos – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos – Departamento de Reativos para Diagnóstico) em parceria com o Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Celular] Instituto Oswaldo Cruz.

Maalej IA, Chenik M, Louzir H, Salah AB, Bahloul C, Amri F, et al. Comparative evaluation of ELISAs based on ten recombinant or purified *Leishmania* antigens for the serodiagnosis of mediterranean visceral leishmaniasis. *American Journal Tropical Medicine Hygiene*. 2003; 68: 312-320.

Manna L, Vitale F, Reale S, Caracappa S, Pavone LM, Morte RD, et al. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*. 2004; 125: 251-262.

Marcondes CB, Lozovei AL, Vilela JH. Distribuição geográfica de flebotomíneos do complexo *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera, Psychodidae) Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 1998; 31: 51-58.

Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Brock Biology of Microorganisms. 9 ed. Rio de Janeiro: Prentice-Hall do Brasil; 2000: 872.

Mancianti F, Falcone ML, Giannelli C, Poli A. Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent-soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniasis. Veterinary Parasitology; 1995: 59: 13-21.

Marfurt J, Niederwieser I, Makia ND, Beck HP, Felger I. Diagnostic genotyping of Old and New World *Leishmania* species by PCR-RFLP. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2003; 46:115 -124.

Markell EK, John DT, Krotoski WA. Parasitologia Médica. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2003: 136-149.

Marzochi MCA, Coutinho, SG, Souza, WJ, Amendoeira, MR. Leishmaniose Visceral (Calazar). Jornal brasileiro de Medicina. 1981; 41: 69-84.

Marzochi MCA, Coutinho SG, Sabroza PC, Souza MA, Souza PP, Toledo LM, et al. Leishmaniose Visceral Canina no Rio de Janeiro – Brasil. Caderno de Saúde Pública. 1985; 1: 432-446.

Marzochi MCA. Possibilities for control of leishmaniasis given the current situation in Brazil. Research and control of leishmaniasis in Brazil. Proceedings of a National Workshop; 1993 Setembro 13-17; Recife, Brasil. Centro de pesquisa Aggeu Magalhães; 1993.

Marzochi MCA, Marzochi KBF. Tegumentary and Visceral Leishmaniasis in Brazil - Emerging Anthroozoonosis and Possibilities for Their Control. Caderno de Saúde Pública. 1994; 10 (suplemento 02): 359-375.

Marzochi MCA, Marzochi KBF, Schubach AO. Leishmaniose Visceral Americana (Calazar Americano ou Neotropical). In: Cimerman B, Cimerman S. Parasitologia Humana. 2 ed. São Paulo: Atheneu; 2002: 65-80.

Middle JG, Libeer JC, Malakhov V, Penttilä I. Characterisation and evaluation of external quality assessment scheme serum. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 1998; 36 (2): 119-130.

Minayo, MCS. O desafio do Conhecimento: Pesquisa Qualitativa em Saúde. São Paulo – Rio de Janeiro: HUCITEC-ABRASCO, 1993.

Ministério da Saúde – Gerência-Geral de Laboratórios de Saúde Pública. Critérios para habilitação de Laboratórios segundo os princípios das boas Práticas de Laboratório (BPL). Brasília MS, 2001.

Ministério da Saúde – Secretaria de Vigilância Sanitária. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília MS, 2003.

Ministério da Saúde – Fiocruz / Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos. Bio-Manguinhos – Relatório de Atividades. [on line]. 2005a [capturado 20 de janeiro de 2007]. Disponível em [https:// intranet.bio.fiocruz.br](https://intranet.bio.fiocruz.br)

Ministério da Saúde – Secretaria de Vigilância Sanitária. Nota técnica - vacina anti-leishmaniose visceral canina [on-line]. 2005b [capturado em 22 de janeiro de 2007]. Disponível em http://portalsaude.gov.br/portal/arquivos/pdf/leishimune_nota_tecnica.pdf

Ministério da Saúde – Gerência-Geral de Laboratórios de Saúde Pública. Relatório situacional dos LACEN – 2005 (ano-base 2004). Brasília MS, 2006.

Minodier P, Piarroux R, Gambarelli F, Joblet C, Dumon H. Rapid identification of causative species in patients with old world Leishmaniasis. *Journal of clinical microbiology*. 1997; 35 (10): 2551-2555.

Missawa NA & Lima GBM. Distribuição espacial de *Lutzomyia Longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) no estado de Mato Grosso. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2006; 39: 337-340.

Monteiro EM, Silva JCF, Costa RT, Costa DC, Barata RA, Paula EV, et al. Leishmaniose Visceral: Estudo de flebotomínios e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2005; 38: 147-152.

Moreira MAB, Luvizotto MCR, Nunes CM, Silva TCC, Laurenti MD, Corbett CEP. Aplicação da técnica de imunofluorescência direta para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina em aspirado de linfonodo. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 2002; 39: 103-106.

Neves DP, *Parasitologia Dinâmica*. São Paulo: Atheneu; 2003: 79-84.

Noble MA. *Advances in microbiology EQA. Accreditation and quality assurance*. 2002; 7: 341-344.

Nunes M P, Jackson J M; Carvalho R W, Furtado N J, Coutinho S G. Serological survey for canine cutaneous and visceral leishmaniasis in areas at risk for transmission in Rio de Janeiro where prophylactic measures had been adopted. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1991; 86: 411-417.

Peddecord KM, Cada RL. Clinical laboratory proficiency test performance. American Society of Clinical Pathologist. 1980; 73 (3): 380-385.

Penders TJ, Hendriksen-Wissink AJG. Practical implementation of a quality system in a hospital clinical chemistry laboratory. Accreditation and quality assurance. 1999; 4: 99-101.

Raj VS, Ghosh A, Dole VS, Madhubala R, Myler PJ, Stuart KD. Serodiagnosis of leishmaniasis with recombinant ORFF antigen. American Journal Tropical Medicine Hygiene. 1999; 61: 482-487.

Rej R. Proficiency testing and external quality assurance: crossing borders and disciplines. Accreditation and quality assurance. 2002; 7: 335-340.

Rey L. Bases da Parasitologia Médica. 2 ed. Rio de Janeiro; Guanabara Koogan; 2002: 50-70.

Rosário EY, Genaro O, França-Silva JC, Costa RT, Mayrink W, Reis AB, et al. Evolution of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2005; 100: 197-203.

Scalone A, De Luna R, Oliva G, Baldi L, Satta G, Vesco G, et al. Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. Veterinary Parasitology. 2002; 104: 275-285.

Simonet BM. Quality control in qualitative analysis. Trends in Analytical Chemistry. 2005; 24 (6): 525-531.

Singh S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. Indian Journal of Medical Research. 2006; 123: 311-330.

Slappendel RJ, Ferrer L. Leishmaniasis, in: Greene CE. Infectious diseases of the dog and cat. 2 ed. Philadelphia: WB Saunders CO; 1998: 450-458.

Spiegel MR. Estatística. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil; 1972.

Strand CL. Proficiency Testing: One Important Component of Continuous Quality improvement. American Journal of Clinical Pathology. 1994; 393-394.

Thakur VS. Total quality management, laboratory accreditation and external quality assessment schemes. Jugoslov Medicinske Biohemije. 2004; 23: 311-315.

Thompson M, Lowthian PJ. Effectiveness of analytical quality control is related to the subsequent performance of laboratories in proficiency tests. *Analyst*. 1993; 118: 1495-1500.

Voller A, Bidwell DE, Huldt G, Engvall E. A microplate method of ELISA and its application to malaria. *Bulletin of the World Health Organization*. 1974; 51: 209-211.

Voller A, Bidwell DE, Bartlett ANN. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice. *Bulletin of the World Health Organization*. 1976; 53: 55-65.

World Health Organization. External quality assessment of transfusion practice: Guidelines on establishing an EQA scheme in blood group serology. Geneva: WHO, 2004.

Wortmann G, Sweeney C, Houg HS, Aronson N, Stiteler J, Jackson J, et al. Rapid diagnosis of leishmaniasis by fluorogenic polymerase chain reaction. *American Journal Tropical Medicine Hygiene*. 2001; 61(5): 583-587.