



Ministério de Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



COMPARAÇÃO DA SENSIBILIDADE ENTRE AS TÉCNICAS DE HIBRIDIZAÇÃO IN SITU, HISTOPATOLOGIA E IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA EM AMOSTRAS DE PELE

LUIZ CLAUDIO FERREIRA



INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

- A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença de importância em saúde pública.
- Foram registrados uma média de 26.474 casos novos por ano no Brasil, entre 1990 e 2015 (Ministério da Saúde, 2017).
- HISTOPATOLOGIA: Consiste no exame microscópico de cortes de 3 a 5 μm de tecidos fixados em formalina tamponada a 10%, processados para emblocamento em parafina e corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE).

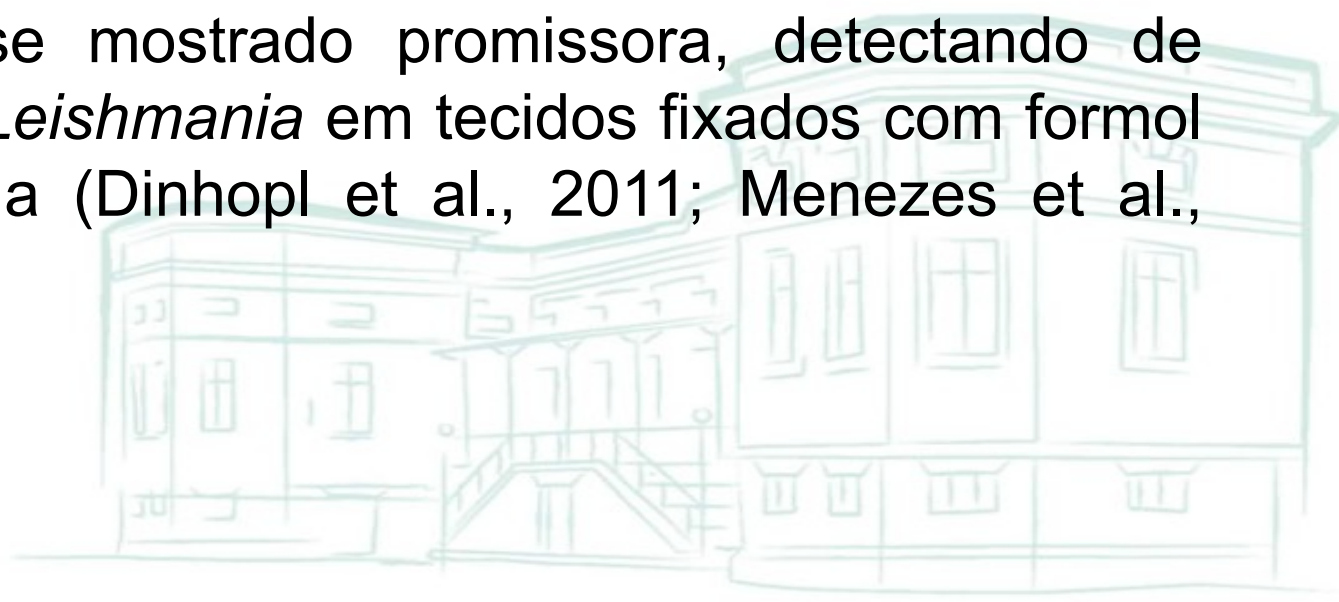
INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

- O correto diagnóstico é importante uma vez que os fármacos utilizados no tratamento da LTA possuem elevada toxicidade (Lima et al., 2007; Gomes et al., 2014)
- Os métodos diagnósticos de confirmação parasitológica têm sensibilidade que alcançam comumente 51 a 70% (Amato et al., 2009, Boggild et al., 2010; Mello et al., 2011; Alves et al., 2013)



INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

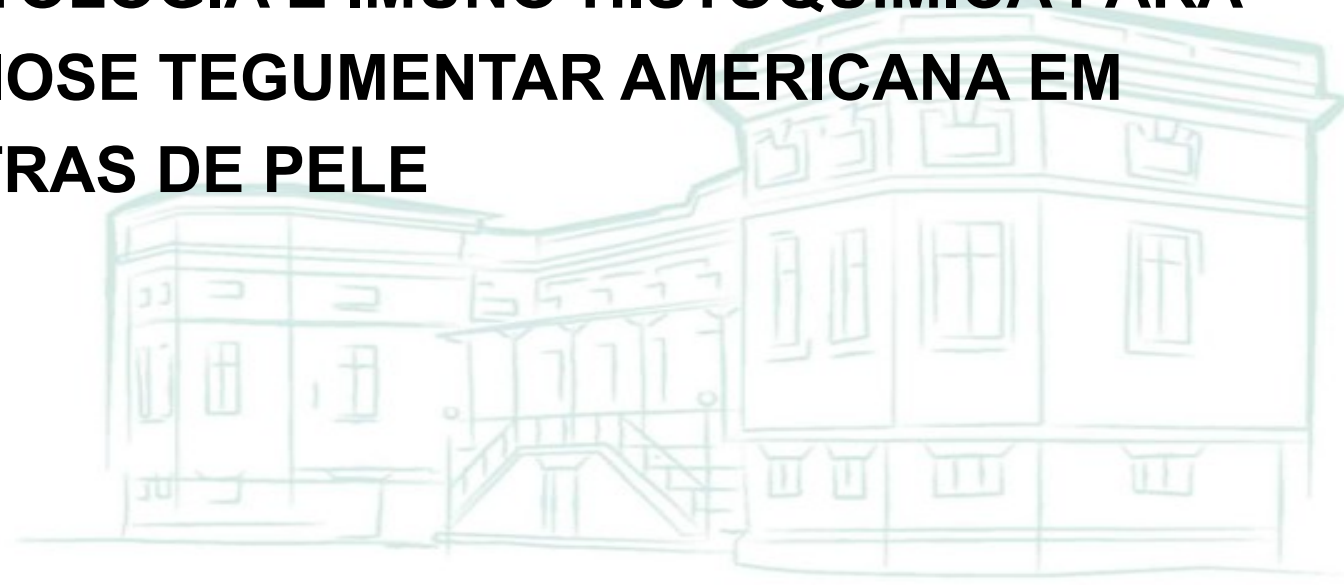
- IHQ: A técnica de imuno-histoquímica baseia-se na detecção de antígenos presentes nos tecidos infectados, por meio da utilização de anticorpos primários específicos.
- Hibridização *in situ* (HIS) tem se mostrado promissora, detectando de maneira inequívoca, espécies de *Leishmania* em tecidos fixados com formol a 10% e emblocados em parafina (Dinhopl et al., 2011; Menezes et al., 2013)





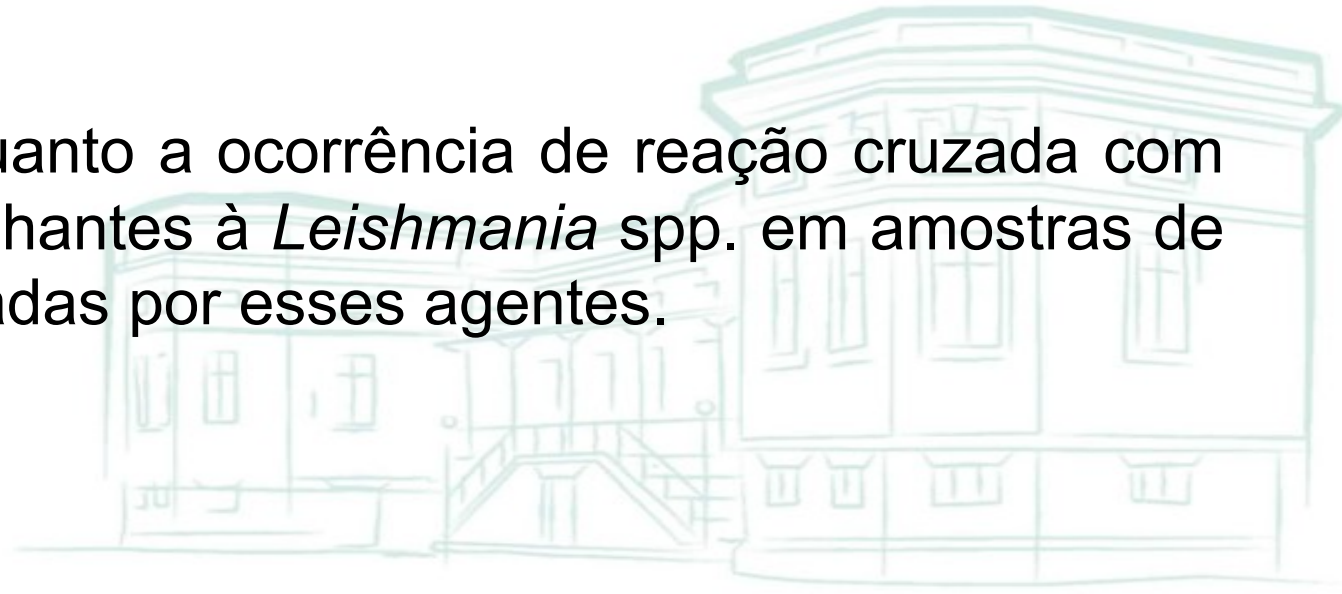
OBJETIVO GERAL

**COMPARAÇÃO DA SENSIBILIDADE ENTRE AS TÉCNICAS DE
HIBRIDIZAÇÃO IN SITU, HISTOPATOLOGIA E IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA
DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA EM
AMOSTRAS DE PELE**



OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a sensibilidade das técnicas de HIS com as das técnicas de histopatologia e IHQ para detecção de *Leishmania* sp. em amostras de lesão cutânea de pacientes com LTA confirmada por cultura parasitológica e causada por *L. braziliensis*.
- Avaliar as técnicas de IHQ e HIS quanto a ocorrência de reação cruzada com fungos histomorfologicamente semelhantes à *Leishmania* spp. em amostras de lesões cutâneas sabidamente infectadas por esses agentes.



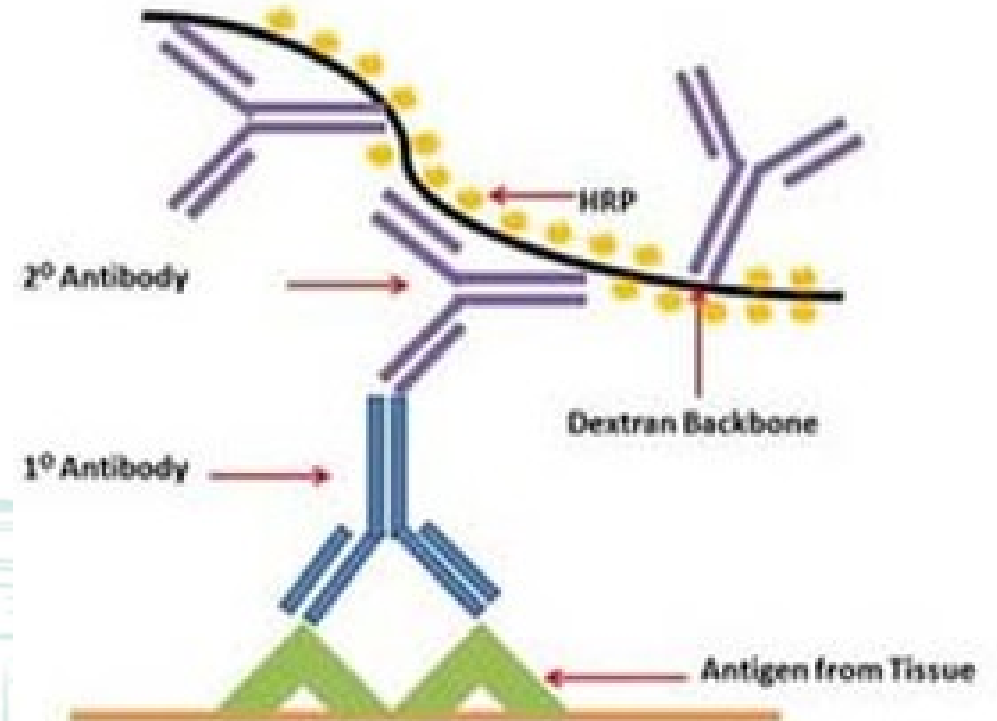
METODOLOGIA

IMUNO-HISTOQUÍMICA

Kit de detecção



↓
Revelação



METODOLOGIA

HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU*

Sonda
genérica 5.8S

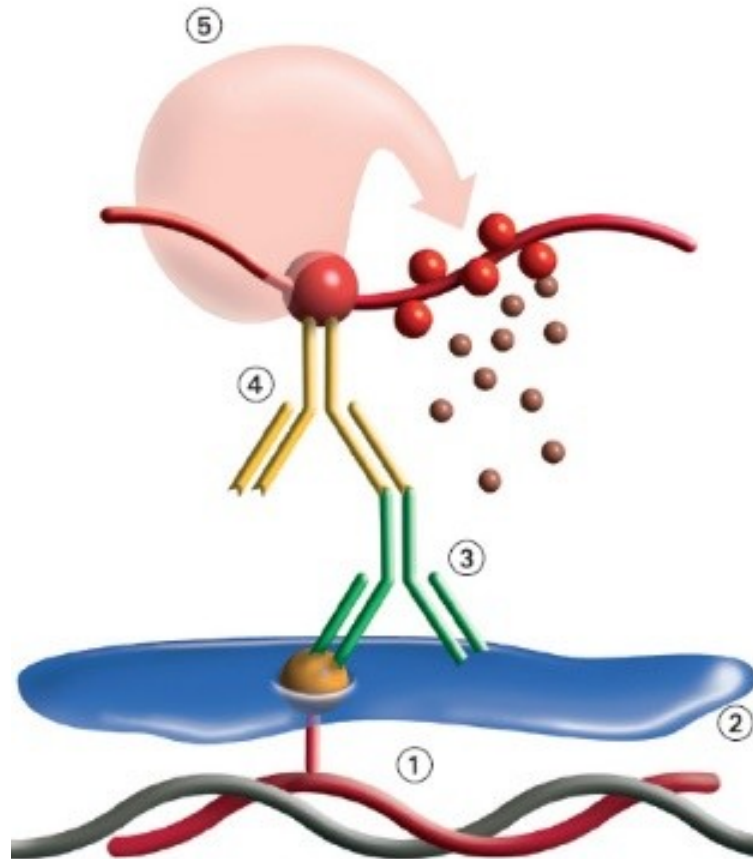


- Marcada com Digoxigenina
- 5'-/5DigN/
ACGGGGGATGACACAATAGAGCTTCTCC- 3'
- Detecta todas as espécies de *Leishmania*
- Alvo: sequência de gene 5.8S RNA ribossomal



METODOLOGIA

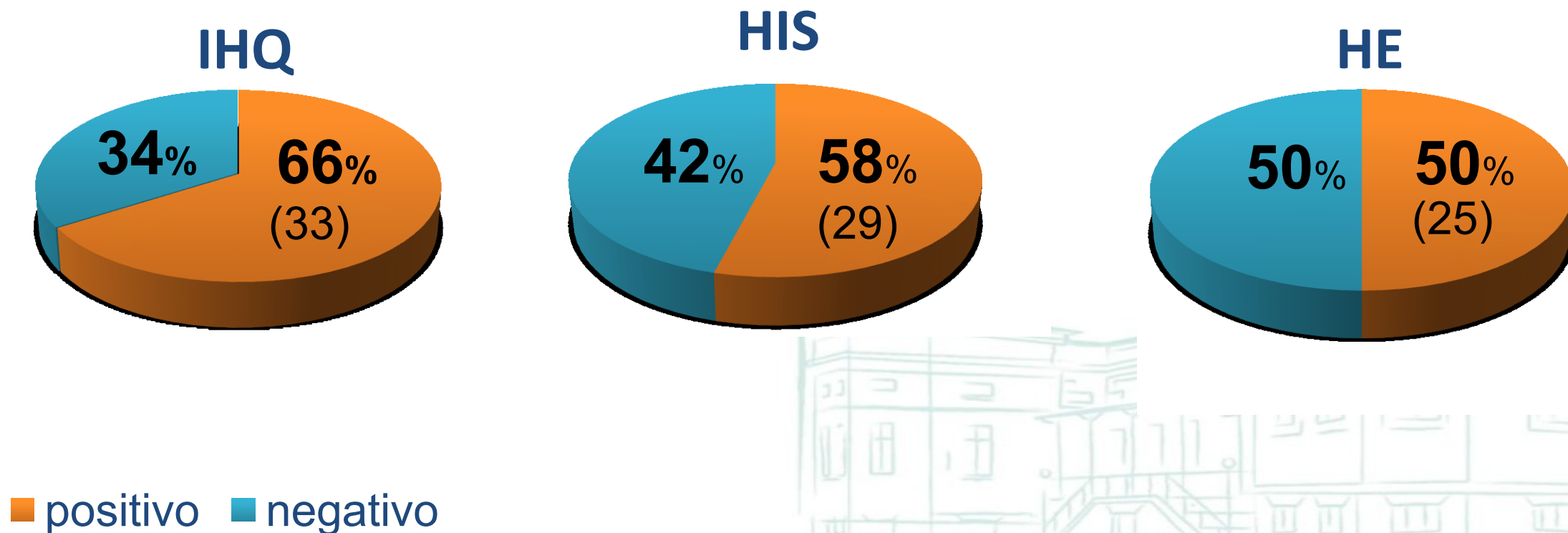
HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU*



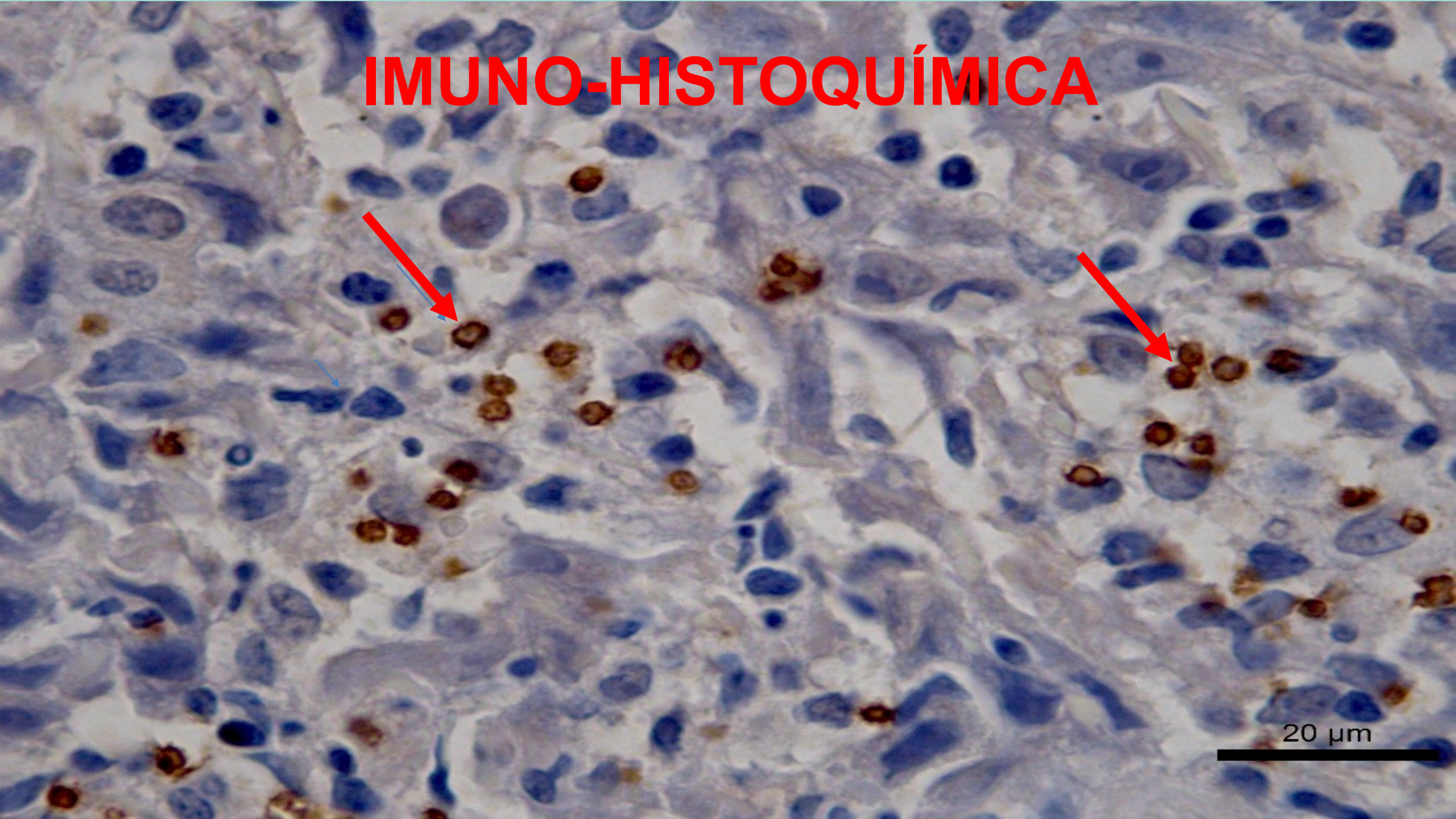


RESULTADO e DISCUSSÃO

COMPARAÇÃO DE SENSIBILIDADES (N=50)



IMUNO-HISTOQUÍMICA

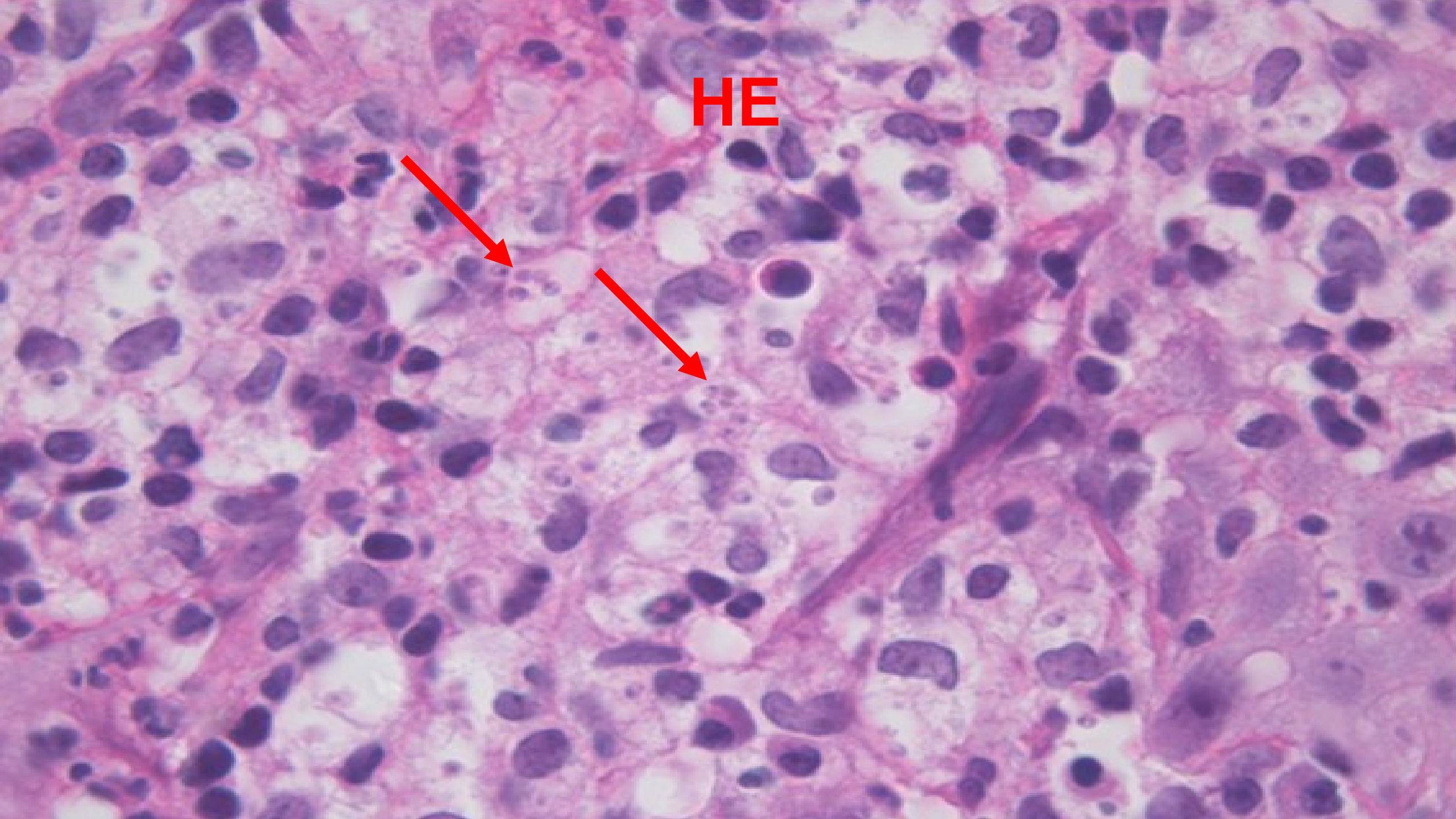


HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU*



20 μ m

HE



RESULTADO e DISCUSSÃO

IMUNO-HISTOQUÍMICA

- Apresentou maior sensibilidade quando comparada às técnicas de HIS e HE;
- A sensibilidade encontrada esteve dentro da faixa de valores de sensibilidade descrita por outros autores, variando de 51 a 70% (AMATO *et al.*, 2009; KENNER *et al.*, 1999; MARQUES *et al.*, 2016; SALINAS *et al.*, 1989; SCHUBACH *et al.*, 2001; SOTTO *et al.*, 1989).

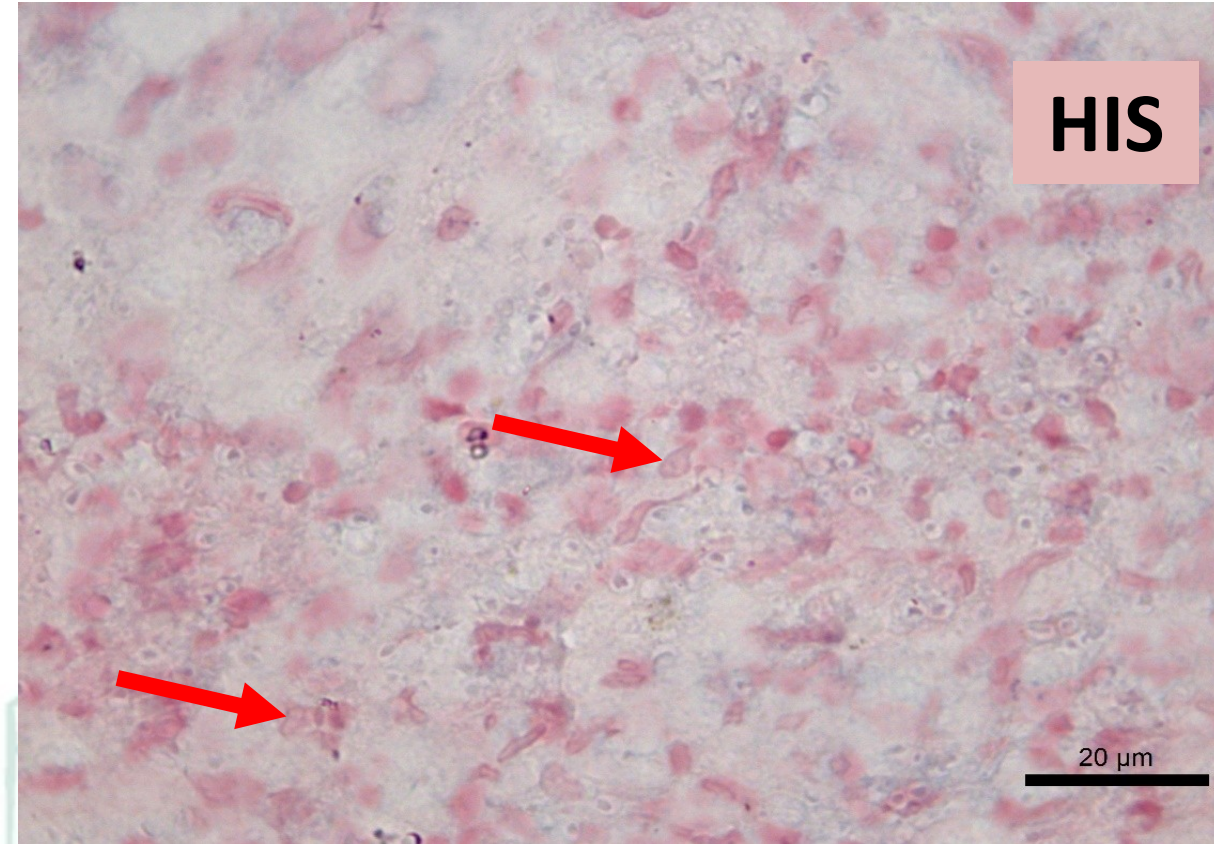
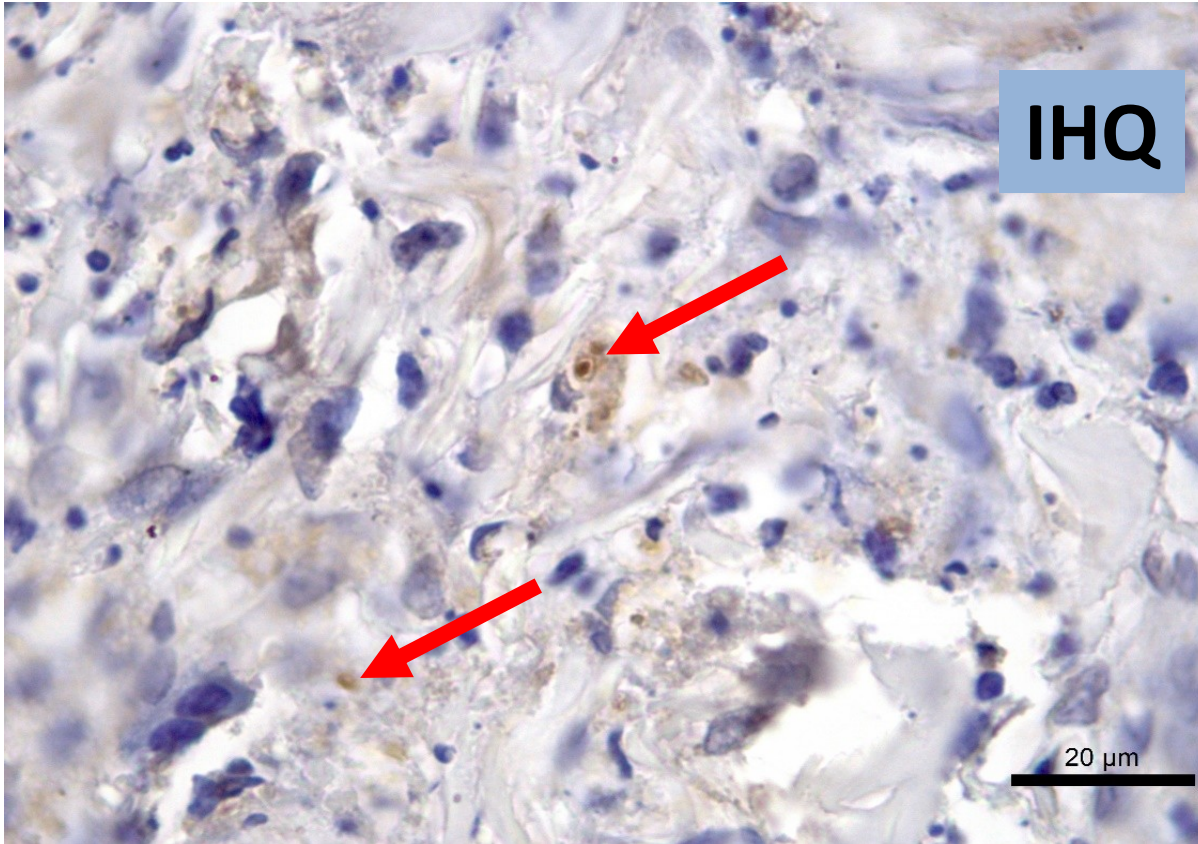
RESULTADO e DISCUSSÃO

HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU*

- Este estudo relata pela primeira vez a avaliação da sensibilidade da técnica de HIS para o diagnóstico da LTA causada por *L. braziliensis* em amostras de pele humana.
- Essa sensibilidade esteve dentro do esperado para um método de diagnóstico parasitológico de LTA e ligeiramente superior à técnica de histopatologia, podendo assim ser aplicada na rotina.



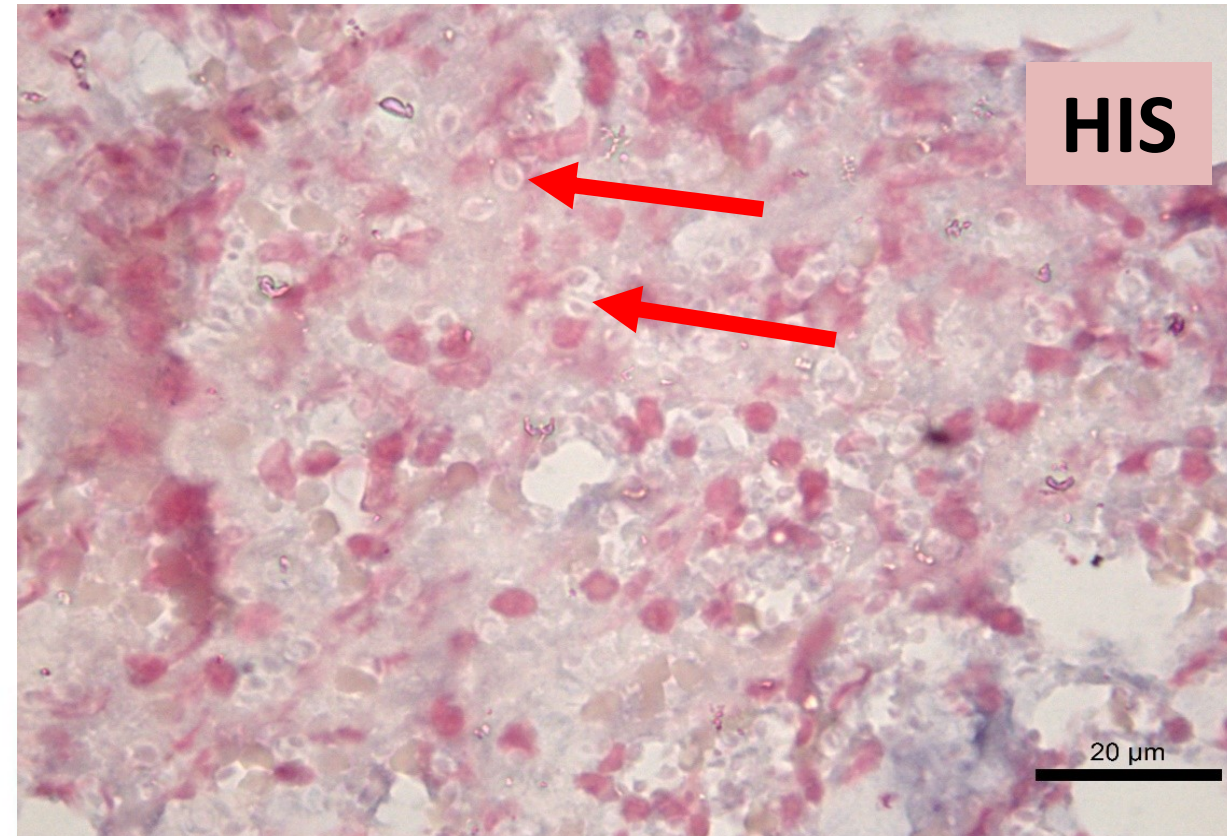
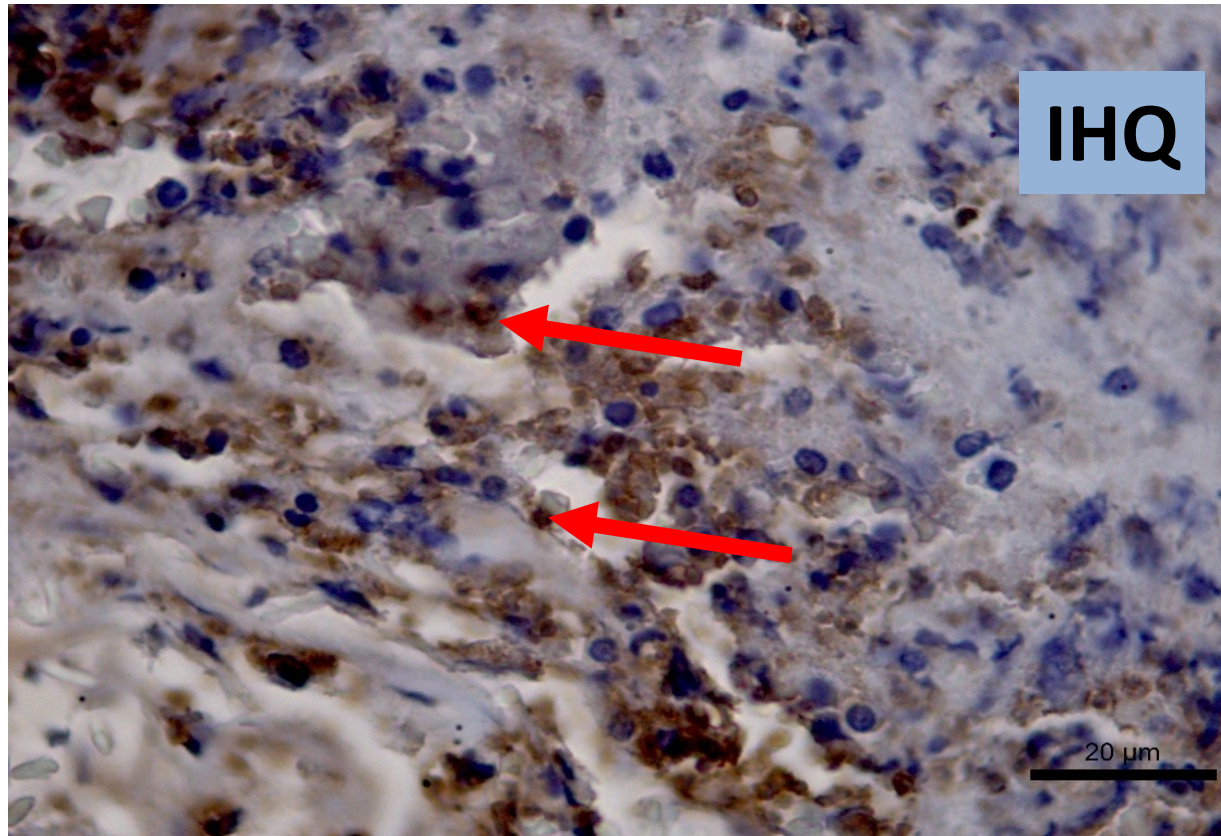
REAÇÃO CRUZADA



Histoplasma spp.



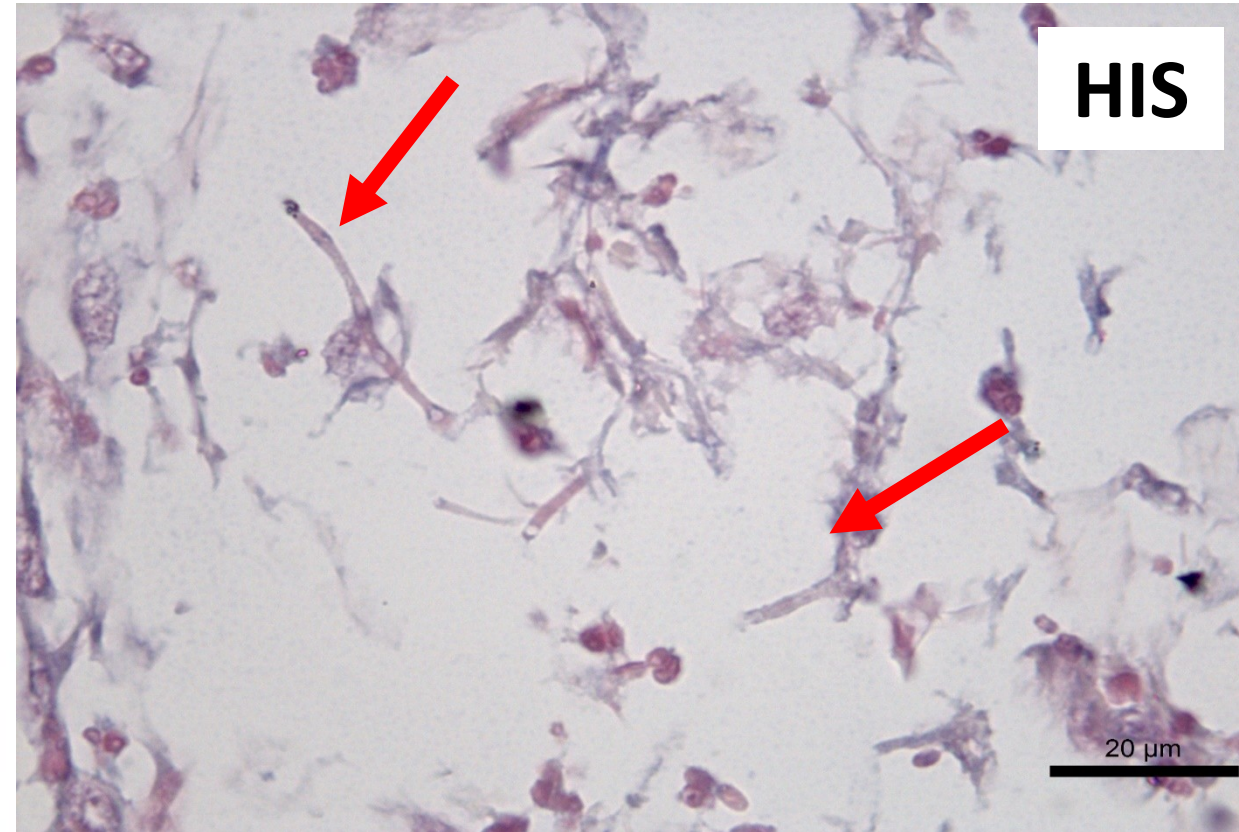
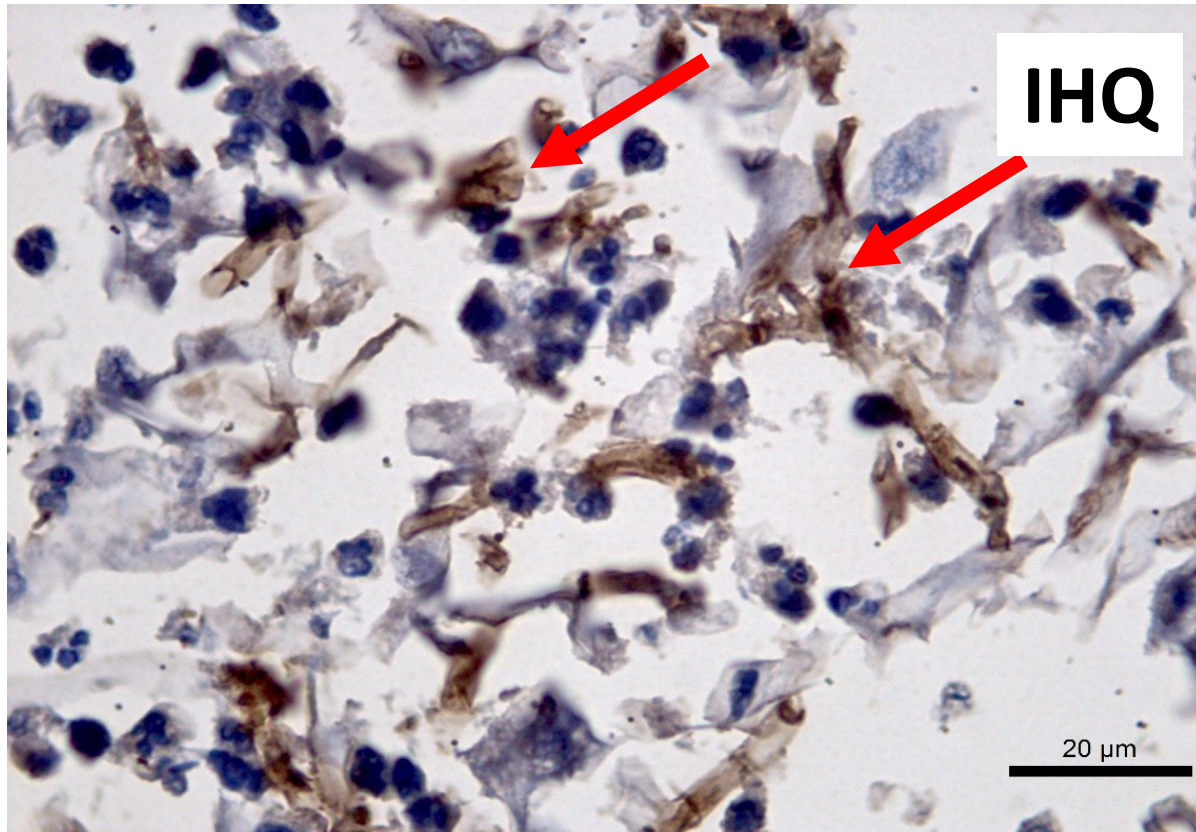
REAÇÃO CRUZADA



Sporothrix sp.



REAÇÃO CRUZADA



Candida spp.

RESULTADO e DISCUSSÃO

Concordância Inter observadores dos valores de kappa para as técnicas de IHQ, HIS e HE no diagnóstico de LTA em amostras de pele de pacientes com LTA causada por *L. braziliensis*.

	OBSERVADOR 1 X 2		OBSERVADOR 1 X 3		OBSERVADOR 2 X 3	
TÉCNICA	Valor Kappa	Grau de concordância	Valor Kappa	Grau de concordância	Valor Kappa	Grau de concordância
HIS	0,801	quase perfeita	0,684	substancial	0,638	substancial
IHQ	0,465	moderada	0,578	moderada	0,747	substancial
HE	0,760	substancial	0,720	substancial	0,878	quase perfeita

CONCLUSÃO

1. A técnica de IHQ revelou maior sensibilidade para o diagnóstico histológico de *Leishmania braziliensis* em amostras de pele quando comparada a HIS e ao método tradicional de histopatologia, sendo importante a sua utilização para melhoria do diagnóstico da LTA.
2. A técnica de IHQ para diagnóstico de *L. braziliensis* apresentou reação cruzada com fungos histomorfologicamente semelhantes a esse parasito, devendo os resultados serem interpretados com cautela e com base em dados clínicos e laboratoriais.



CONCLUSÃO

3. A técnica de HIS para o diagnóstico de *L. braziliensis* foi mais sensível que o método convencional de histopatologia, e não mostrou reação cruzada com fungos histomorfologicamente semelhantes a esse parasito, podendo ser implementada na rotina para confirmação dos casos positivos na imuno-histoquímica.
4. O método convencional histopatológico apresentou sensibilidade inferior às técnicas de HIS e IHQ no diagnóstico de *L. braziliensis*, porém pode ser considerado um método útil para o diagnóstico desse parasito, sobretudo na ausência de IHQ e HIS.



Fim