

## Técnicas de patologia morfológica e molecular aplicados ao diagnóstico da leishmaniose visceral

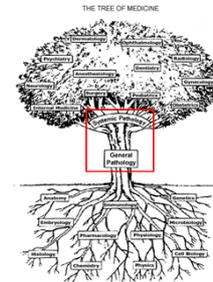
Juliana Mariotti Guerra  
Médica Veterinária  
Pesquisadora Científica  
jumariotti.vet@gmail.com

2019



## INTRODUÇÃO

# PATOLOGIA

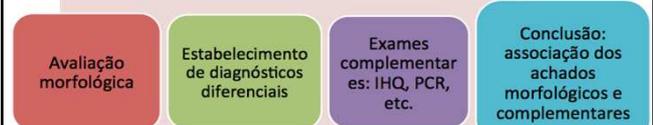


## INTRODUÇÃO

# PATOLOGIA



## INTRODUÇÃO



## INTRODUÇÃO

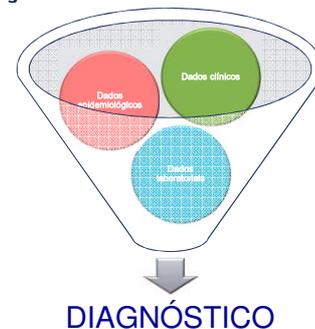
### ■ SAÚDE ÚNICA

Reconhece a inter-relação entre a saúde animal, humana e ambiental.

"Entre a medicina animal e a medicina humana não existem linhas divisórias e nem deve existir." Rudolph Virchow (1821-1902).



## INTRODUÇÃO



## DADOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS

- Dados gerais, do paciente, de residência, antecedentes epidemiológicos, clínica, resultados laboratoriais e tratamentos.

República Federativa do Brasil  
Ministério da Saúde

SINAN  
SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO  
FICHA DE INVESTIGAÇÃO LEISHMANIOSE VISCERAL Nº

**CASO SUSPEITO:**  
Todo indivíduo proveniente de área com ocorrência de transmissão, com febre e esplenomegalia. Todo indivíduo proveniente de área sem ocorrência de transmissão, com febre e esplenomegalia, desde que descartado os diagnósticos diferenciais mais frequentes na região.

1] Tipo de Notificação	2 - Individual
2] Agravado(a)	LEISHMANIOSE VISCERAL
Código (CID10)	B.55.0
3] Data de Notificação	

- Cães: dados da unidade notificante; dados do animal; sinais e sintomas; histórico e deslocamentos do cão; coleta e exames laboratoriais prévios; evolução.

## FERRAMENTAS DIAGNÓSTICAS

- Citologia convencional / parasitológico direto
- Citologia em meio líquido
- Embocado celular
- Exame necroscópico
- Histopatologia
- Colorações histoquímicas
- Imunohistoquímica
- Técnicas moleculares: Hibridização in situ, PCR, sequenciamento.

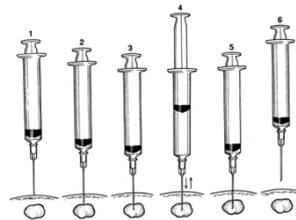
## CITOLOGIA CONVENCIONAL

- Parasitológico direto.
- Pesquisa de formas amastigotas em raspados de lesões cutâneas e aspirados de medula óssea, linfonodo, baço (guiada).
- Colorações do tipo *Romanowsky*
- Sensibilidade: esfregaços esplênicos 93.1 - 98.7%, de medula óssea 52 - 85%, e de linfonodo 52 - 58% em humanos; 34% em esfregaços nodais de cães.
- Especificidade: 100%

Paiva-Cavalcanti et al., 2015; Guerra et al., 2015

## CITOLOGIA CONVENCIONAL

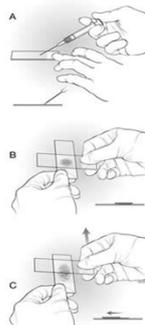
- Métodos de coleta de amostras:
  - Punção por agulha fina: com ou sem aspiração
  - Impressão, escarificação ou esfoliação



[Cowell e Tyler, 2002]

## CITOLOGIA CONVENCIONAL

- Esfregação de lâmina sobre lâmina ("Squash")
- Lâminas secas ao ar
- Identificação do animal no lado oposto ao do material na lâmina
- Armazenar em porta lâminas ou separadas depois de secas
- Não conservar na geladeira
- Não colocar uma lâmina úmida sobre a outra



## CITOLOGIA EM MEIO LÍQUIDO

- Transferência imediata de células coletadas para meio preservativo.
- Objetivos:
  - Minimizar artefatos e uniformizar esfregaços;
  - Automatizar e padronizar a confecção do esfregaço citológico;
  - Reduzir custos de RH
- Possibilidade de produção de mais de um esfregaço;
- Permite a realização de exames complementares.
- Sensibilidade de 20% e especificidade de 100% em esfregaços nodais em cães.

## EMBLOCADO CELULAR

Forma de preparação citológica na qual o precipitado da amostra centrifugada é incluído em parafina e submetido a processamento histológico habitual.

Colheita e fixação das células

Agregação e formação de sedimento

Processamento histológico

Múltiplos cortes

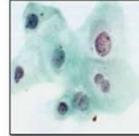
Colorações específicas

Imunocitoquímica

Fernandes et al., 2016

## EMBLOCADO CELULAR

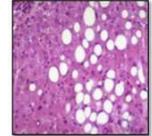
Cytology



Bridge  
(Cell blocks)



Histopathology



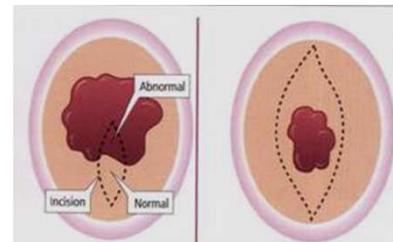
## EXAME NECROSCÓPICO

- Evento efêmero – o momento da necropsia é preciso para análise de todos os órgãos e colheita dos materiais.
- Avaliação minuciosa – externa e interna.



## HISTOPATOLOGIA

- Coleta de amostras:
  - Biópsia incisional, por *punch*, por agulha grossa, excisional
  - Autópsia / Necrópsia



## HISTOPATOLOGIA

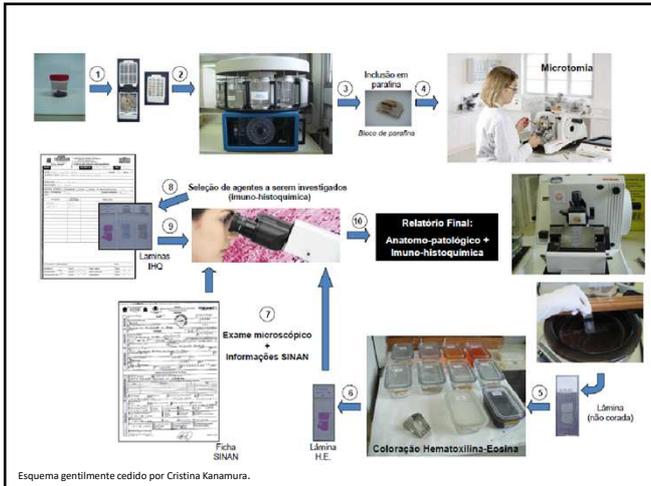
- Fixação adequada do material – Solução de formalina 10% tamponada.
- Quantidade adequada de fixador – (10 vol fixador/ 1 vol tecido)
- Tempo de fixação: mínima de 24 horas.
- Potes adequados: plástico, boca larga, rosqueável.
- Não congelar
- Transportar a temperatura ambiente.
- Fragmentos de todos os órgãos, principalmente fígado, baço, linfonodos, pele (cães), coração, pulmão, rim.



IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS, DAS LESÕES E DAS MARGENS

## HISTOPATOLOGIA

- Estudo microscópico das células e dos tecidos.
- Coloração padrão: hematoxilina e eosina.
- Padrão morfológico das lesões.
- Associação com possíveis etiologias.
- Colorações histoquímicas específicas: Giemsa.
- Permite a realização de exames complementares: imunohistoquímica, hibridização in situ, PCR.
- Conservação do material emblocado em parafina à temperatura ambiente.

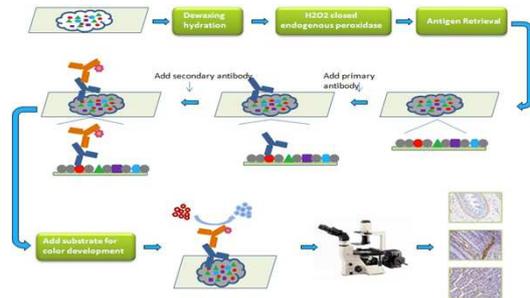


## HISTOPATOLOGIA

- Alterações multissistêmicas.
- Amastigotas podem ser observadas no interior de macrófagos (ocasionalmente outros leucócitos, células endoteliais, fibroblastos e células neoplásicas) em múltiplos tecidos.
- Infiltrado inflamatório com linfócitos, plasmócitos, histiócitos e, menos frequentemente, neutrófilos e eosinófilos.
- Tecidos mais afetados: baço, pele, fígado, linfonodo, rim.
- Lesões cardíacas, oculares, musculares, vasculares e de sistema nervoso.

## IMUNO-HISTOQUÍMICA

■ Método de identificação de antígenos nos tecidos, utilizando o princípio da ligação-específica de anticorpos e antígenos.



## IMUNO-HISTOQUÍMICA

- Sensibilidade: 70.0%.
- Especificidade: 100%

EMBLOCADO CELULAR CITOLÓGICO

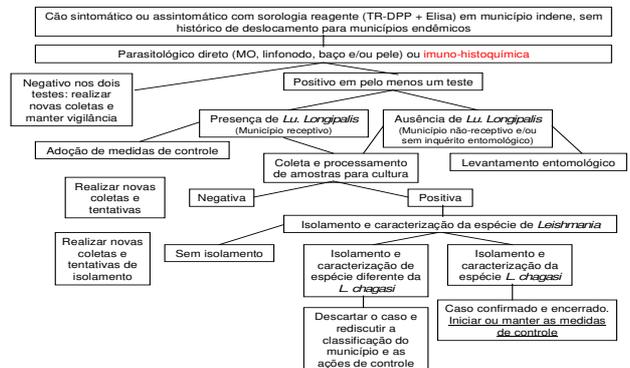
Magno, 2014

## IMUNO-HISTOQUÍMICA

- Sensibilidade: 92.0%.
- Especificidade: 100%

Arquivo pessoal

## FLUXOGRAMA DIAGNÓSTICO



480/2013- CGDT/DEVIT/SVS-MS

Rev Inst Adolfo Lutz

NEVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ  
Artigo Original/ Original Article

**Avaliação do exame imuno-histoquímico para o diagnóstico de *Leishmania* spp. em amostras de tecidos caninos**

Evaluation of immunohistochemical technique for the diagnosis of *Leishmania* spp. in canine tissues samples

RIALAS/1686

Juliana Mariotti GUERRA\*\*, Natália Coelho Couto de Azevedo FERNANDES<sup>1</sup>, Lidia Midori KIMURA<sup>1</sup>, Neusa Kasumi SHIRATA<sup>1</sup>, Jéssica Abatzoglou MAGNO<sup>2</sup>, Marília Ferreira ABRANTES<sup>3</sup>, Karolina Rosa FERNANDES<sup>4</sup>, Maitera Maria Romaneli SILVA<sup>1</sup>, José Eduardo de Raefray BARBOSA<sup>1</sup>, Helena Hilomi TANIGUCHI<sup>1</sup>, Roberto Mitsuyoshi HIRAMOTO<sup>1</sup>, Sudy NONOGAKI<sup>1</sup>, José Eduardo TOLEZANO<sup>1</sup>

## HIBRIDIZAÇÃO IN SITU

■ Método de identificação de sequências específicas de nucleotídeos em células ou cortes histológicos.

DIG-labeled probes  
 Anti-DIG antibody (mouse)  
 Anti-DIG mouse antibody (goat)  
 Enzyme HRP  
 Polymer

## HIBRIDIZAÇÃO IN SITU

- Sensibilidade: 87,5%.
- Especificidade: 100%

Kimura; Nonogaki; Shirata, 2014

## TÉCNICAS MOLECULARES

Paraffin Removal and Tissue Rehydration → Tissue Digestion → Mild Reverse Cross-Link → DNA Purification

FFPE DNA Extraction kit

Interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP)  
*L. infantum chagasi*

Takahashi; Barrel, 2018

## TÉCNICAS MOLECULARES

**Table 2** Advantages and limitations of molecular methods used in leishmaniasis diagnosis

Method	Advantage	Limitation
Conventional PCR (cPCR)	High sensitivity, specificity and accurate results. Many applications in molecular analysis. Easy diagnostic interpretation.	Unable to quantify the target DNA. Qualitative test. Time consuming. Limited detection range of some assays.
Quantitative real-time PCR (qPCR)	Higher sensitivity, specificity and security, quantitative capacity and speedy results. Possibility of species differentiation by melting temperature.	High cost due to equipment (thermocycler). Difficulty in interpreting the results, needing thus of a well-trained operator.
Nested-PCR (nPCR)	Higher specificity and sensitivity. Useful technique for studying the molecular epidemiology in the field.	Time consuming and higher cost. Unable to quantify the target DNA. Qualitative test.
Quantitative Nucleic Acid Sequence-Based Assay (QT-NASBA)	High specificity. It is based on an isothermal reaction and thus overcomes the need for a thermocycler. Ideal for lower tech laboratories. Quantitative capacity. Indicated to detect active diseases; RNA detection.	It uses electrochemiluminescence as tool of detection, which involves more handling steps and procedure time. Assays developed only for RNA detection. Few studies yet.
NASBA coupled with oligochromatography (NASBA-OC)	High specificity. Speedy results. There is no need of complex laboratorial structure. Simple dipstick format for the detection of amplification products. RNA detection.	Unable to quantify the target RNA. Assays developed only for RNA detection. Few studies yet.
Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)	High sensitivity. Low cost. Isothermal reaction, there is no need for a thermocycler. The temperature stability of the reagents enables its use in field conditions.	Unable to quantify the target DNA. Qualitative test. Few studies yet.

Paiva-Cavalcanti et al., 2015

## AGRADECIMENTOS

SECRETARIA DO ESTADO DA SAÚDE – COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS

INSTITUTO ADOLFO LUTZ  
Centro de Parasitologia e Micologia  
Centro de Patologia

SERVIÇOS MUNICIPAIS DE CONTROLE DE ZOOSE

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA DA USP  
Departamento de Patologia

**FAPESP**  
FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

**CNPq**  
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico



**OBRIGADA !!!!**