

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS
MESTRADO PROFISSIONAL EM PESQUISA CLÍNICA

Luiz Claudio Ferreira

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

Rio de Janeiro
2017

Luiz Claudio Ferreira

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

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Pesquisa Clínica do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, para obtenção do grau de mestre.

Orientador (es): Dr. Rodrigo Caldas Menezes
Dr. Leonardo Pereira Quintela

Rio de Janeiro

2017

Ferreira, Luiz Claudio .

COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DE HIBRIDIZAÇÃO IN SITU, HISTOPATOLOGIA E IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA DIAGNÓSTICO DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA EM AMOSTRAS DE PELE / Luiz Claudio Ferreira. - Rio de janeiro, 2017.

52 f.; il.

Dissertação (Mestrado Profissional) - Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica, 2017.

Orientador: Rodrigo Cladas menezes.

Co-orientador: Leonardo Pereira Quintella.

Bibliografia: f. 12-52

1. Imuno-histoquímica. 2. Leishmaniose. 3. Hibridização in situ. 4. Histopatologia. 5. Diagnóstico. I. Título.

Luiz Claudio Ferreira

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

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado
Profissional em Pesquisa Clínica do Instituto
Nacional de Infectologia Evandro Chagas, para
obtenção do grau de mestre.

Orientador (es): Dr. Rodrigo Caldas Menezes
Dr. Leonardo Pereira Quintela

Aprovada em ___ / ___ / ____

BANCA EXAMINADORA

Dra. Tullia Cuzzi Teichner (Presidente)
Doutora em Dermatologia
INI- FIOCRUZ

Dra. Luisa Helena Monteiro de Miranda (Membro)
Doutora em Ciências
INI- FIOCRUZ

Dr. Júlio Vianna Barbosa (Membro)
Doutor em Ciências
IOC- FIOCRUZ

Dra. Maria Inês Fernandes Pimentel (Suplente)
Doutora em Dermatologia
INI- FIOCRUZ

À minha mãe, Sebastiana da Conceição Souza,
exemplo de mulher.

À meu pai, Amaral Antônio Ferreira, por todo o
ensinamento na nossa breve jornada, saudade
eterna.

À minha esposa Fernanda Prado Roque Ferreira e
minha filha Mariana Prado Roque Ferreira: tudo é
por vocês.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Dr. Rodrigo Caldas Menezes e Dr. Leonardo Pereira Quintela, pela confiança e oportunidade de desenvolver esse trabalho. Obrigado pela incansável dedicação e valiosíssimos ensinamentos.

À Dra. Janice Mery Chicarino de Oliveira Coelho, chefe do Serviço de Anatomia Patológica do INI-Fiocruz, por todo apoio e incentivo durante o projeto de mestrado.

À Dra. Maria de Fátima Madeira, por sua imensa contribuição durante todo projeto, sempre que precisamos nos atendeu com muito carinho e atenção.

À Dra. Maria Inês Fernandes Pimentel, por todo seu exemplo de generosidade e profissionalismo ao colaborar na seleção das amostras para o respectivo projeto.

À Dra. Marília Santini de Oliveira, pela boa vontade e estímulo ao estudo durante a coordenação do curso de Mestrado MPPC do INI-Fiocruz.

À Dra. Cláudia Valette Rosalino, pela assistência e motivação durante a coordenação do Mestrado MPPC do INI-Fiocruz.

Ao Dr. Armando de Oliveira Schubach, por todas as contribuições nas diferentes fases do mestrado, um exemplo de profissional na coordenação do mestrado MPCC do INI-Fiocruz.

Aos Meus Amigos do serviço de Anatomia Patológica do INI-Fiocruz: Antônio Carlos da Silva, Francisco das Chagas de Carvalho Rodrigues, Marcos Francisco Lucas de Almeida e Maria Dulce Portugal Estrada Espinoza, expresso aqui minha gratidão por todas as colaborações nas diferentes etapas do Projeto. Equipe essa brilhante, que nessa jornada do mestrado souberam me oferecer todo apoio nos momentos que mais precisei. Podem ter certeza que essa etapa da minha vida teve a contribuição de cada um de vocês e levarei comigo durante minha jornada estabelecida por Deus. Muito obrigado por me deixarem fazer parte dessa família.

Ao programa Jovem Cientista do Nosso Estado, FAPERJ, processo E-26/102.247/2013, e ao LAPCLIN-DERMZOO/IPEC/FIOCRUZ pelo apoio financeiro a este projeto.

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

RESUMO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma antropozoonose causada por diferentes espécies de protozoário do gênero *Leishmania*, que causam lesões na pele e/ou mucosas de vias aerodigestivas superiores de humanos e outros mamíferos. O diagnóstico definitivo de LTA é baseado em exames laboratoriais que detectam o parasito na lesão, o que muitas vezes é difícil pela baixa carga parasitária. Nesse contexto, a técnica de hibridização *in situ* (HIS) tem se mostrado promissora, detectando espécies de *Leishmania* em tecidos. Este estudo objetiva comparar as técnicas de hibridização *in situ* usando sonda genérica, histopatologia e imuno-histoquímica para diagnóstico de leishmaniose tegumentar americana humana em amostras de pele. Foram selecionadas 50 amostras de biopsia de pele obtidas de pacientes atendidos no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), Fiocruz, no período de 2000 a 2005, nos quais foi possível o diagnóstico de LTA por isolamento em cultura e caracterização de *Leishmania braziliensis*. As amostras foram fixadas em formol, incluídas em parafina e examinadas pelas técnicas de HIS usando sonda genérica para *Leishmania*, imuno-histoquímica (IHQ) e histopatologia, para avaliação da sensibilidade dos três métodos, utilizando a cultura parasitológica como padrão ouro. Para avaliação de reações cruzadas pelas técnicas de HIS e IHQ, foram também incluídas amostras adicionais de três pacientes com diagnóstico de micoses cutâneas causadas por *Sporothrix* spp., *Candida albicans* e *Histoplasma capsulatum*. As sensibilidades das técnicas de IHQ, HIS e histopatologia na detecção de formas amastigotas foram de 66%, 54% e 50%, respectivamente. A técnica de HIS não apresentou hibridização cruzada com antígenos fúngicos, enquanto a IHQ apresentou reação cruzada com todas as espécies de fungos aqui estudadas. A técnica de HIS apresentou boa sensibilidade na detecção de formas amastigotas e ausência de reação cruzada com espécies de fungo, de modo que o seu emprego é recomendado na rotina diagnóstica do Serviço de Anatomia Patológica do INI, Fiocruz.

Palavras-chave: Leishmaniose Cutânea, diagnóstico, hibridização *in situ*, imuno-histoquímica.

Luiz Claudio Ferreira **EVALUATION OF THE *IN SITU* HYBRIDIZATION TECHNIQUE FOR THE DIAGNOSIS OF AMERICAN TEGUMENTARY LEISHMANIOSIS IN SKIN SAMPLES**

ABSTRACT

American tegumentary leishmaniasis (ATL) is an anthroponosis caused by different protozoan species belonging to the *Leishmania* genus, and causes lesions on the skin and/or mucosa of the upper airways of humans and other mammals. A definitive ATL diagnosis is based on laboratory tests that detect the parasite in the lesions, which is often difficult due to low parasite loads. In this context, the *in situ* hybridization (ISH) technique was shown to be promising, by satisfactorily detecting *Leishmania* species in tissues. The aim of this study was to compare the techniques of *in situ* hybridization using a generic probe, histopathology and immunohistochemistry to diagnose American tegumentary leishmaniasis in skin samples. The sample comprised fifty skin biopsy specimens from patients seen at the Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases (INI), Fiocruz, between 2000 and 2005, in which LTA diagnosis was confirmed through parasite isolation in culture followed by characterization of *Leishmania braziliensis*. The specimens were fixed in formalin, embedded in paraffin and analysed through ISH, using a generic probe for *Leishmania*, immunohistochemistry (IHC) and histopathology, for evaluating the sensitivities of the three different methods, using parasite culture as a reference standard. Additional specimens from three patients diagnosed with cutaneous mycoses caused by *Sporothrix* spp., *Candida albicans* e *Histoplasma capsulatum* were also included to evaluate cross-reactions in ISH and IHC. The sensitivities of IHC, ISH and histopathology for detecting amastigotes of *Leishmania* were 66%, 54% and 50%, respectively. The ISH technique did not show cross-hybridization with fungal antigens, while IHC presented cross-reactions with all the fungal species herein evaluated. The ISH technique showed good sensitivity in the detection of amastigote forms and the lack of cross-reactions with fungal species, so that its use is recommended in the diagnostic routine at the Anatomical Pathology Service at INI, Fiocruz.

Key words: Tegumentary Leishmaniasis, *in situ* hybridization, immunohistochemistry.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BCIP	5-bromo-4-cloro-3 indolil fosfato
BSA	Albumina Sérica Bovina
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DAB	Diaminobenzidina
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
HE	Hematoxilina-eosina
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
IHQ	Imuno-histoquímica
INI	Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas
ISH	Hibridização <i>in situ</i>
LC	Leishmaniose Cutânea
LCM	Leishmaniose Cutaneomucosa
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose Visceral
NBT	4-nitro blue cloreto de tetrazolium
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
SEAP	Serviço de Anatomia Patológica
TBS	Tris-Buffered-Saline

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Casos positivos e negativos para formas amastigotas de <i>Leishmania</i> sp. pelas técnicas de HIS, IHQ e HE em amostras de pele de pacientes com LTA causada por <i>L. braziliensis</i>	31
Tabela 2 - Comparação do número de casos positivos e negativos para formas amastigotas de <i>Leishmania</i> sp. obtidos pelas técnicas de HIS e IHQ em amostras de pele de pacientes com LTA causada por <i>L. braziliensis</i>	34
Tabela 3 - Comparação do número de casos positivos e negativos para formas amastigotas de <i>Leishmania</i> sp. obtidos pelas técnicas de HIS e HE em amostras de pele de pacientes com LTA causada por <i>L. braziliensis</i>	34
Tabela 4 - Comparação do número de casos positivos e negativos para formas amastigotas de <i>Leishmania</i> sp. obtidos pelas técnicas de IHQ e HE em amostras de pele de pacientes com LTA causada por <i>L. braziliensis</i>	34
Tabela 5 - 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 <i>L. braziliensis</i>	35
Tabela 6 - Resultados das técnicas de HIS usando sonda genérica para <i>Leishmania</i> spp. e IHQ usando anticorpo anti- <i>Leishmania</i> spp. em amostras de pele de pacientes infectados pelos fungos <i>Sporothrix</i> spp., <i>Candida</i> spp., e <i>Histoplasma</i> spp	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Pele, LTA, HIS. Formas amastigotas de <i>Leishmania</i> sp. marcadas em azul escuro (setas)	32
Figura 2 - Pele, LTA, IHQ. Formas amastigotas de <i>Leishmania</i> sp. marcadas em castanho (setas)	32
Figura 3 - Pele, LTA, HE. Formas amastigotas de <i>Leishmania</i> sp. no interior de vacúolos parasitóforos de macrófagos (setas) na derme em meio a reação inflamatória composta principalmente por macrófagos, havendo também linfócitos e plasmócitos em menor número e raros neutrófilos.	33
Figura 4 - Pele infectada por hifas de <i>Candida</i> spp. marcadas em castanho por anticorpos anti- <i>Leishmania</i> spp. (setas). IHQ	37
Figura 5 - Pele infectada por <i>Candida</i> spp. Não houve marcação em hifas utilizando a sonda genérica para <i>Leishmania</i> spp. (setas). HIS	37
Figura 6 - Pele infectada por <i>Sporothrix</i> sp. Observam-se leveduras marcadas utilizando soro anti- <i>Leishmania</i> spp. (setas). IHQ	38
Figura 7 - Pele infectada por <i>Sporothrix</i> sp. Não houve marcação em leveduras utilizando sonda genérica de <i>Leishmania</i> spp. (setas). HIS	38
Figura 8 - Pele infectada por <i>histoplasma</i> spp. Observo-se marcação utilizando Soro <i>Anti-Leishmania</i> spp. (setas). IHQ	39
Figura 9 - Pele infectada por <i>Histoplasma</i> spp. Não houve marcação cruzada utilizando sonda genérica para <i>Leishmania</i> spp. (setas). HIS	39

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Leishmaniose tegumentar americana	12
1.1.1 <u>Agentes etiológicos</u>	12
1.1.2 <u>Epidemiologia</u>	13
1.1.3 <u>Sinais clínicos</u>	14
1.1.4 <u>Diagnóstico</u>	14
1.1.4.1 INTRADERMORREAÇÃO DE MONTENEGRO	15
1.1.4.2 TESTES SOROLÓGICOS	16
1.1.4.3 TESTES PARASITOLÓGICOS	16
1.1.4.3.1 <i>Exame direto ou citopatológico</i>	16
1.1.4.3.2 <i>Cultura parasitológica</i>	17
1.1.4.3.3 <i>Inoculação intradérmica em animais de laboratório</i>	17
1.1.4.4 HISTOPATOLOGIA	18
1.1.4.5 IMUNO-HISTOQUÍMICA	19
1.1.4.6 HIBRIDIZAÇÃO IN SITU	20
1.1.4.7 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	21
2 JUSTIFICATIVA	22
3 OBJETIVOS	24
3.1 Objetivo geral	24
3.2 Objetivos específicos	24

4 METODOLOGIA	25
4.1 Amostra	25
4.2 Cultura parasitológica e caracterização isoenzimática	25
4.3 Histopatologia	26
4.4 Imuno-histoquímica	26
4.5 Hibridização <i>in situ</i>	27
4.6 Leitura das lâminas	29
4.7 Análise estatística	30
4.8 Considerações éticas	30
5 RESULTADOS	31
5.1 Comparação de sensibilidades	31
5.2 Avaliação da ocorrência de reações ou hibridizações cruzadas	35
6 DISCUSSÃO	40
7 CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leishmaniose tegumentar americana

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma antropozoonose causada por diferentes espécies do protozoário do gênero *Leishmania*, que causam lesões na pele e/ou mucosas de vias aerodigestivas superiores de humanos e outros mamíferos domésticos e silvestres (WHO, 2010). Nas Américas, a LTA é endêmica em diversos países, desde o sul dos Estados Unidos até o Norte da Argentina (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017b).

A transmissão das espécies de *Leishmania* causadoras de LTA para os humanos e animais ocorre por meio da picada de fêmeas infectadas de dípteros da família Psychodidae, sub-família Phlebotominae, denominados flebotomíneos. No Novo Mundo, os flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* são os vetores biológicos do gênero *Leishmania*. As principais espécies de flebotomíneos envolvidas na transmissão da LTA no Brasil são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *L. whitmani*, *L. umbratilis*, *L. intermedia*, *L. wellcomei* e *L. migonei* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017b).

1.1.1 Agentes etiológicos

São atualmente reconhecidas 11 espécies dermatrópicas de *Leishmania* causadoras de LTA humana. No Brasil, a doença ocorre em todos os estados e já foram identificadas 7 espécies: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (Leishmania) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis*, que são as que mais comumente causam lesão tegumentar e, de ocorrência mais rara, *L.V lainsoni*, *L.V shawi*, *L.V naiffi* e *L.V lindenbergi* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017b; WHO, 2010). A espécie mais frequente é a *L.V braziliensis* (WHO, 2010).

1.1.2 Epidemiologia

A LTA constitui um problema de saúde pública em 85 países, distribuídos em quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia), com registro anual de 0,7 a 1,3 milhão de casos novos. No continente americano, há registro de casos desde o sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina, com exceção de Chile e Uruguai. É considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma das seis mais importantes doenças infecciosas, pelo seu alto coeficiente de detecção e a capacidade de produzir deformidades (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017b).

O desmatamento e a construção de residências próximas a florestas, sobretudo em encostas de serras, propiciou a adaptação dos flebotomíneos ao domicílio e peridomicílio e também do parasito a novos vetores e hospedeiros reservatórios. Essas alterações ambientais favoreceram a transmissão de *Leishmania* a animais domésticos e humanos, levando a urbanização da LTA no Brasil e outros países sul-americanos (DA-CRUZ; PIRMEZ, 2013; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017b; WHO, 2010).

No Brasil, em 1909, foram pela primeira vez descritas formas amastigotas de *Leishmania* spp. em úlceras cutâneas e nasobucofaríngeas em indivíduos que trabalhavam na construção de rodovias no interior de São Paulo. Desde então, a LTA vem sendo descrita em vários municípios de todas as Unidades Federadas. Em média, são registrados cerca de 25.763 casos/ano, com coeficiente de incidência de 11,3 casos/100.000 habitantes nos últimos 5 anos. A região Norte apresenta o maior coeficiente (54,4 casos/100.000 habitantes), seguida das regiões Nordeste (22,9 casos/10.000 habitantes) e Centro-Oeste (14,7 casos/100.000 habitantes) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017b). Entre os anos de 1990 e 2015, foram registrados 675.090 casos de LTA no Brasil, com uma média de 26.474 casos por ano (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017a). No ano de 2015, foram registrados 19.395 casos no país, sendo 75% deles nas regiões Norte e Nordeste. O estado com maior número de casos em 2015 foi o Pará, seguido de Bahia e Mato Grosso. No estado do Rio de Janeiro, foram registrados 23 casos em 2015, havendo uma média anual de cerca de 203 casos entre 1990 e 2015 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017a). A doença é de importância em saúde pública no país, não somente pelo número de casos e ampla distribuição geográfica, mas também por ser capaz de causar lesões destrutivas, desfigurantes e também incapacitantes (GONTIJO; CARVALHO, 2003),

além dos efeitos adversos do tratamento que podem ser graves (LIMA *et al.*, 2007; GOMES *et al.*, 2014).

1.1.3 Sinais clínicos

A LTA apresenta um amplo espectro de formas clínicas e se caracteriza, principalmente, pela presença de úlceras rasas, únicas ou múltiplas, de formato redondo a oval, de borda elevada e assoalho de aspecto granuloso na pele ou mucosas (GONTIJO; CARVALHO, 2003). Também podem ser observadas lesões atípicas: exofíticas, sem borda definidos, verrucosas, pápulas e lesões acneiformes disseminadas. A LTA apresenta três formas de acordo com a localização das lesões: cutânea, mucosa ou mucocutânea. A ocorrência de linfadenopatia regional é frequente (GONTIJO; CARVALHO, 2003). A forma cutânea difusa ocorre em pacientes com comprometimento da resposta imunológica e, no Brasil, é causada pela espécie *L. (L.) amazonensis*. Clinicamente, a forma cutânea difusa caracteriza-se por lesões nodulares ou placas, raramente ulceradas, extensivas e difusas. A forma mucosa é causada principalmente por *L.V braziliensis*, sendo uma evolução da forma cutânea inicial com lesões já cicatrizadas ou em atividade e normalmente afeta indivíduos com lesões cutâneas tratadas inadequadamente, precedida de disseminação hemática do parasito. Caracteriza-se por infiltração das mucosas, deformidades e destruição de estruturas faciais, especialmente o septo nasal, e com menor frequência a mucosa oral e orofaringe. Nos pacientes de LTA coinfectados com o vírus HIV, as lesões cutâneas variam de pápulas a úlceras únicas ou múltiplas. Lesões atípicas, como máculas ou pápulas, e disseminadas podem ser encontradas em áreas não expostas, tal como a região genital. Adicionalmente, pode ocorrer visceralização da LTA (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017b).

1.1.4 Diagnóstico

O diagnóstico da LTA pode ser realizado por exames clínicos associados aos dados epidemiológicos e exames laboratoriais. O diagnóstico clínico, baseado no aspecto das lesões e na história epidemiológica do paciente, é difícil e apenas

presuntivo, devido ao amplo espectro de apresentações clínicas da LTA, que muitas vezes se assemelham a outras enfermidades. São doenças de diagnóstico clínico diferencial: úlceras de estase, úlcera tropical, úlceras de membros inferiores por anemia falciforme, piodermites, neoplasias cutâneas, sífilis, tuberculose cutânea, hanseníase virchowiana, micobacterioses, esporotricose, histoplasmose, lobomicose, paracoccidioidomicose, cromomicose, rinosporidiose, piodermites, sarcoidose, psoríase, vasculites, picadas de insetos, etc. Portanto, os exames laboratoriais são fundamentais para o fechamento do diagnóstico (GOMES *et al.*, 2014; GONTIJO; CARVALHO, 2003; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017b). Os exames laboratoriais para o diagnóstico da LTA podem ser imunológicos, parasitológicos e moleculares.

1.1.4.1 INTRADERMORREAÇÃO DE MONTENEGRO

Os métodos imunológicos utilizados para diagnóstico da LTA são a intradermorreação de Montenegro (IDRM) e os testes sorológicos. Em geral, são testes com boa sensibilidade e baixa especificidade. A IDRM é comumente utilizada e baseia-se em uma reação de hipersensibilidade tardia a antígenos extraídos de formas promastigotas de *Leishmania*. O teste é realizado por meio da aplicação intradérmica de 0,1 ml do antígeno na face anterior do antebraço. O resultado é considerado positivo quando o diâmetro da endureção da pele é igual ou superior a 5 mm, após 48 ou 72 horas da inoculação. (GONTIJO; CARVALHO, 2003; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017b; MONTENEGRO, 1926). A sua sensibilidade varia de 84% a 100%, sendo de grande valor presuntivo no diagnóstico da LTA e em inquéritos epidemiológicos de áreas endêmicas. Adicionalmente, possui baixo custo e é pouco invasiva. Entretanto, possui especificidade limitada, em torno de 75%, não diferencia doença atual e pregressa, não distingue doença de infecção e é geralmente negativa nas formas cutâneo difusas e em pacientes com imunossupressão. Casos falsos positivos podem ocorrer devido a reações cruzadas com doenças de Chagas, micoses subcutâneas, tuberculose e hanseníase (GOMES *et al.*, 2014).

1.1.4.2 TESTES SOROLÓGICOS

Os testes sorológicos baseiam-se na detecção de anticorpos anti-*Leishmania* por meio das técnicas de reação de imunofluorescência indireta (RIFI), que é a mais utilizada, ELISA e testes de aglutinação. São utilizados principalmente em inquéritos epidemiológicos, sendo pouco utilizados na rotina devido à limitada sensibilidade, uma vez que títulos se revelam baixos na maioria dos casos. Possui também falhas de especificidade, pois pode haver reação cruzada na Doença de Chagas, leishmaniose visceral, paracoccidioidomicose, pênfigo foliáceo e micoses profundas. A sensibilidade da RIFI varia de 27,7 a 100% e a do ELISA de 67 a 96%. A sensibilidade depende também das espécies de *Leishmania* presentes (GOTO; LINDOSO, 2010).

1.1.4.3 TESTES PARASITOLÓGICOS

O diagnóstico definitivo da LTA é realizado pela confirmação do parasito diretamente nas lesões por meio dos exames parasitológicos ou moleculares. Os exames parasitológicos são métodos de certeza, que permitem detectar infecção ativa por meio da observação de formas amastigotas de *Leishmania* no caso do exame direto e técnicas histológicas ou de formas promastigotas desse parasito na cultura parasitológica. São técnicas de alta especificidade, porém de sensibilidade limitada, uma vez que é frequente a escassez de parasito nas lesões quando a espécie causadora envolvida é do subgênero *Viannia* (DA-CRUZ; PIRMEZ, 2013). Adicionalmente, a sensibilidade dos métodos parasitológicos é inversamente proporcional ao tempo de evolução da doença (RAMIREZ *et al.*, 2000).

1.1.4.3.1 Exame direto ou citopatológico

A técnica parasitológica mais utilizada pelo baixo custo, praticidade e rapidez é o exame direto. Essa técnica é realizada a partir de amostras obtidas da lesão tegumentar por escarificação, punção por aspiração ou fragmento de lesão obtido por procedimento de biopsia da borda que é submetido a impressão por aposição

em lâmina de microscopia. Esse material obtido é fixado em álcool metílico e corado por corantes do tipo Romanowsky como Giemsa, Leishman ou panóptico rápido. A sensibilidade desse método é de 42,5 a 70% usando a cultura parasitológica como padrão de referência (MELLO *et al.*, 2011). Apesar de ser um método específico, diagnóstico falso positivo pode ocorrer por confusão de formas amastigotas de *Leishmania* spp. com outros microorganismos como *Sporothrix* spp. e *Histoplasma capsulatum* e artefatos (DE MELLO *et al.*, 2014; SÃO THIAGO *et al.*, 1998).

1.1.4.3.2 Cultura parasitológica

A cultura parasitológica seguida de especiação pela técnica de eletroforese enzimática multilocus é o método de referência para identificação de *Leishmania* em nível de espécie (MELLO *et al.*, 2011; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017b). Amostras obtidas por biópsia ou por punção por aspiração da lesão são semeadas em meio de cultura bifásico Novy-Neal-Nicolle (NNN) e meio Schneider contendo 10% de soro fetal bovino (MELLO *et al.*, 2011). A sua sensibilidade varia de 36% a 78% (BOGGILD *et al.*, 2010; MELLO *et al.*, 2011; WEIGLE *et al.*, 1987). Todavia, os resultados da cultura parasitológica são demorados, levando de 5 a 30 dias (em média 15 dias) para serem completados e há apenas um pequeno número de centros de referência que realizam atualmente a técnica de eletroforese enzimática multilocus (DE ALMEIDA *et al.*, 2011; WHO, 2010). Adicionalmente, esse método é susceptível à contaminação microbiológica, necessita de equipamentos e reagentes nem sempre disponíveis em áreas endêmicas e pode ser de difícil realização devido a pobre adaptação de alguns isolados ao meio (MAIA; CAMPINO, 2008; MELLO *et al.*, 2011).

1.1.4.3.3 Inoculação intradérmica em animais de laboratório

Outra forma de diagnóstico parasitológico é a inoculação intradérmica de amostras obtidas de lesão em animais de laboratório susceptíveis, de preferência o hamster (*Mesocricetus auratus*), nas patas posteriores ou focinho. Possui uma boa

sensibilidade e a vantagem de que esses animais se adaptam às condições de trabalho de campo. Entretanto, é um método de custo elevado, há risco de acidentes durante inoculação, envolve questões éticas no uso de animais, além do longo tempo necessário para a evolução da lesão no modelo animal (2 a 9 meses, em média) e a eficácia do isolamento apresenta grande variação conforme a espécie de *Leishmania* (BERMAN, 1997; GOMES *et al.*, 2014; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017b).

1.1.4.4 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). É utilizada rotineiramente no diagnóstico de LTA em áreas endêmicas. Essa técnica detecta infecção ativa por formas amastigotas de *Leishmania* spp. O diagnóstico das formas amastigotas de *Leishmania* spp. por essa técnica é baseado nas suas características morfológicas celulares dessa forma parasitária tais como: forma esférica a ovóide, tamanho de 2 a 3 μm , núcleo redondo e presença de cinetoplasto em forma de bastão e também na sua localização no interior de vacúolos parasitóforos de macrófagos. Embora apresente uma menor sensibilidade do que a cultura parasitológica e PCR (reação em cadeia da polimerase), as técnicas de histopatologia e imuno-histoquímica (IHQ) são específicas e, diferentemente das técnicas citadas anteriormente, permitem a observação de formas amastigotas de *Leishmania* nos tecidos (DE QUEIROZ *et al.*, 2011). Essa visualização do parasito nos tecidos é importante, pois permite a correlação dos parasitos com as lesões associadas e quantificação da carga parasitária (DE QUEIROZ *et al.*, 2011). Entretanto, a histopatologia e IHQ não permitem a identificação de *Leishmania* em nível de espécie. São técnicas comumente usadas no diagnóstico da LTA e utilizam amostras da lesão obtidas por procedimento de biopsia fixadas em formalina tamponada a 10% e emblocadas em parafina. A sensibilidade da histopatologia varia em torno de 17 a 64% (ALVES *et al.*, 2013; QUINTELLA *et al.*, 2009; SALINAS *et al.*, 1989). Com relação à especificidade, microorganismos histomorfológicamente semelhantes como *Histoplasma capsulatum* e *Trypanosoma cruzi* podem levar a um diagnóstico errado ou inconclusivo (MENEZES *et al.*, 2013).

1.1.4.5 IMUNO-HISTOQUÍMICA

A técnica de imuno-histoquímica ganhou popularidade na década 1970 e baseia-se na detecção de antígenos no tecido (TAYLOR, 1978). É um método imunológico que permite a visualização de antígenos presentes nos tecidos infectados, por meio da utilização de anticorpos primários específicos. A reação de positividade deste método ocorre através da ocorrência de ligações antígeno-anticorpo, demonstradas pela formação de reação colorimétrica no tecido visualizado ao microscópio óptico (RAMOS-VARA, 2005).

Para visualizar essa reação ao microscópio óptico, faz-se necessária a utilização de sistemas de detecção que utilizam enzimas-substrato-cromógeno que se depositam no local da reação antígeno-anticorpo, possibilitando sua visualização em cortes histológicos. Para detecção de formas amastigotas de *Leishmania* no tecido, a maioria dos estudos relata utilização de soro de coelhos imunizados com promastigotas obtidas de cultura. A espécie de *Leishmania* utilizada para imunização não parece influenciar na reação, visto que se tem descrito reação cruzada entre diversas espécies nesta técnica, (QUINTELA *et al.*, 2009). Por se tratar de um exame também morfológico, deve-se ser criterioso como na coloração de rotina pela hematoxilina-eosina (HE). O diagnóstico depende de achados de estruturas com forma e tamanho que sejam compatíveis com amastigotas. Essa técnica também permite a detecção de antígenos de *Leishmania* spp. em macrófagos (AMATO *et al.*, 1998). A detecção de antígenos de *Leishmania* spp. em células endoteliais tem resultado fisiopatológico incerto, mas também já foi relatada (SCHUBACH *et al.*, 2001).

A técnica de imuno-histoquímica é uma excelente ferramenta complementar para confirmação dos resultados da técnica de histopatologia usando coloração HE, pois apresenta sensibilidade significativamente maior do que essa na detecção de formas amastigotas de *Leishmania*, além de ser específica. A sensibilidade da técnica de imuno-histoquímica comumente varia entre 51 e 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). Considerando a sensibilidade, custo, complexidade na execução, equipamentos e instalações necessários, a IHQ está entre as técnicas de visualização (histopatologia e exame direto) e o PCR

(QUINTELLA *et al.*, 2009). Assim como a histopatologia e o exame direto, a IHQ não permite a identificação da espécie de *Leishmania*. Adicionalmente, podem ocorrer reações cruzadas com *Histoplasma*, *Paracoccidioides* e *Trypanosoma* (ALVES *et al.*, 2013; QUINTELLA *et al.*, 2009; SALINAS *et al.*, 1989). Outra desvantagem da IHQ é a falta de anticorpos comerciais anti-*Leishmania* para tecidos fixados em formalina a 10% e emblocados em parafina (DINHOPPL *et al.*, 2011).

1.1.4.6 HIBRIDIZAÇÃO IN SITU

A técnica de hibridização *in situ* (HIS), desenvolvida no final da década de 60 (GALL *et al.*, 1969), é atualmente comumente utilizada em medicina humana e veterinária para o diagnóstico histológico de patógenos tais como vírus, bactérias e protozoários (MOSTEGL *et al.* 2011). Entretanto, somente recentemente foi testada no diagnóstico da infecção por *Leishmania* em humanos (FRICKMANN *et al.*, 2012) e cães (DINHOPPL *et al.*, 2011; MENEZES *et al.*, 2013) em tecidos. Essa técnica combina biologia molecular com histopatologia e geralmente é aplicada em tecidos fixados em formalina a 10% e processados para emblocamento em parafina (MOSTEGL *et al.*, 2011). O objetivo da ISH é detectar o agente infeccioso, demonstrando a presença de segmentos específicos de seus ácidos nucleicos (DNA ou RNA) na amostra tecidual (MOSTEGL *et al.*, 2011; SEGALÉS *et al.*, 1999). Para realização da técnica, é preciso um molde de ácido nucleico (DNA ou RNA) no interior do tecido a ser testado (ácido nucléico alvo), uma sonda de ácido nucléico marcada, geralmente um oligonucleotídeo, e um sistema de detecção para demonstrar a reação de hibridização (SEGALÉS *et al.*, 1999). A principal vantagem é permitir de forma simultânea a visualização de formas amastigotas no tecido e a especificação delas com o uso de sondas específicas (MENEZES *et al.*, 2013). Existem dois tipos de hibridização *in situ* em tecidos: a cromogênica (HISC) e a fluorescente (HISF). Na HISC, a sonda é marcada por um antígeno, digoxigenina ou biotina, que é detectado por meio de reação antígeno-anticorpo revelada por reação cromógeno-substrato, gerando um sinal colorido, visível à microscopia óptica. Por sua vez, na HISF a sonda é marcada com fluorocromo visível somente em microscópio de fluorescência (TANNER *et al.*, 2000).

1.1.4.7 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A técnica de PCR é a técnica mais sensível para o diagnóstico da LTA americana, detectando DNA de *Leishmania* em biopsias de lesões tegumentares congeladas ou fixadas em formalina tamponada a 10% e emblocadas em parafina. A sensibilidade da técnica de PCR para diagnóstico da LTA varia de 87 a 98%, com especificidade de 100% (AMEEN, 2010; ANDRADE *et al.*, 2011; GOMES *et al.*, 2008; SATOW, 2013; VEGA-LOPES, 2003;). Os alvos mais comumente utilizados são kDNA (DNA do cinetoplasto) e SSU rRNA (subunidade menor do RNA ribossômico). Outra grande vantagem da técnica de PCR é que ela permite a identificação da espécie de *Leishmania*, ou pelo menos do subgênero. Por meio da técnica de PCR em tempo real é possível quantificar a carga parasitária e obter resultados mais rápidos e com menor possibilidade de contaminação quando comparados aos resultados da técnica de PCR convencional (GOTO; LINDOSO, 2010). As desvantagens da PCR são falta de padronização dos diferentes protocolos utilizados entre laboratórios, possibilidade de contaminação, não diferencia infecção ativa de não ativa. Adicionalmente, como não permite a visualização de formas amastigotas do parasito no tecido, não possibilita a correlação do parasito com as lesões associadas (MENEZES *et al.*, 2013).

2 JUSTIFICATIVA

A LTA é uma doença de importância em saúde pública, com uma média de 26.474 casos novos por ano entre 1990 e 2015 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017a; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017b). Os exames laboratoriais visando a detecção do parasito na lesão são fundamentais para confirmação do diagnóstico, uma vez que a história epidemiológica, o aspecto clínico das lesões e a IDMR positiva são apenas presuntivos. O correto diagnóstico é importante uma vez que os fármacos utilizados no tratamento da LTA possuem elevada toxicidade (GOMES *et al.*, 2014; LIMA *et al.*, 2007).

O exame laboratorial padrão ouro para o diagnóstico de LTA é a cultura parasitológica, porém ela apresenta limitações de acurácia, assim como os demais métodos laboratoriais utilizados, sobretudo quando há baixa quantidade de parasitos nas lesões, o que é frequente na LTA (DA-CRUZ; PIRMEZ, 2013; GOMES *et al.*, 2014). Portanto, o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico, mais sensíveis e específicos, é importante para preencher as lacunas dos testes atualmente existentes. As técnicas histológicas, incluindo a histopatologia e a IHQ são muito úteis no diagnóstico da LTA, principalmente pela sua alta especificidade. Portanto, são muito utilizadas na rotina, sobretudo em laboratórios de referência. Entretanto, essas técnicas são pouco sensíveis e, apesar de possuírem alta especificidade, resultados falso positivos podem ocorrer. Nesse aspecto, a técnica 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). A técnica de HIS usando tanto uma sonda específica para o complexo *L. donovani* como uma sonda específica para o gênero *Leishmania* apresentaram uma boa sensibilidade e especificidade, superiores às técnicas de histopatologia e imuno-histoquímica, quando testadas em amostras de pele de cães (MENEZES *et al.*, 2013). As sensibilidades da HIS usando a sonda específica, HIS usando sonda genérica, imuno-histoquímica e histopatologia foram, respectivamente, 74,5%, 70,6%, 69,5% e 57,6%. A especificidade de ambas as sondas utilizadas foi de 100% e não houve hibridização cruzada com fungos e

protozoários histomorfologicamente semelhantes a *Leishmania* (MENEZES *et al.*, 2013). Em humanos, Frickmann *et al.* (2012) testaram com êxito a técnica de HIS para o diagnóstico de LTA, porém usando uma sonda genérica diferente da desenvolvida por Dinhopl *et al.* (2011) e marcada com fluoresceína ao invés da marcação por digoxigenina utilizada nas sondas desenvolvidas por Dinhopl *et al.* (2011) e Menezes *et al.* (2013). Entretanto, ainda não foi realizada uma avaliação da acurácia da técnica de HIS em amostras de lesões tegumentares fixadas em formol tamponado a 10% e emblocadas em parafina para o diagnóstico da LTA humana. Confirmada sua elevada sensibilidade, a técnica de HIS irá possibilitar um melhoramento da acurácia das técnicas histológicas e poderá ser implementada na rotina de diagnóstico da LTA, no Serviço de Anatomia Patológica (SEAP) do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a técnica de hibridização *in situ* para diagnóstico de leishmaniose tegumentar americana em amostras de pele.

3.2 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.V braziliensis*.
- Avaliar as técnicas de IHQ e HIS quanto a ocorrência de reação cruzada com fungos e protozoários histomorfologicamente semelhantes à *Leishmania* spp. em amostras de lesões cutâneas sabidamente infectadas por esses agentes.

4 METODOLOGIA

4.1 Amostra

Foi utilizada uma amostra de conveniência de 50 espécimes de pele com lesão, coletadas por meio de biópsia, de pacientes com diagnóstico de LTA causada pela espécie *L. V braziliensis*. O diagnóstico foi feito pelo isolamento de *L. braziliensis* em cultura parasitológica e sua posterior caracterização por meio da técnica de eletroforese de enzimas multilocus. Esses pacientes foram retrospectivamente selecionados de um banco de dados mantido pelo Laboratório de Vigilância em Leishmanioses, que armazena informações sobre pacientes atendidos no INI, Fiocruz, no período de 2000 a 2005, e que possuíam diagnóstico de leishmaniose. As amostras de pele foram fixadas em formalina tamponada a 10% e processadas para emblocamento em parafina. Os cortes histológicos dessas amostras foram processados não somente para técnica de HIS, mas também para realização das técnicas de histopatologia e IHQ, visando à comparação dos resultados de sensibilidade por elas obtidos. As técnicas de HIS, IHQ e histopatologia foram realizadas no SEAP do INI/ Fiocruz.

Para avaliar se as técnicas de HIS e IHQ apresentavam reação cruzada com fungos causadores de micoses cutâneas, foram examinadas espécimes de pele coletado por meio de biópsia, fixadas em formalina tamponada a 10% e emblocadas em parafina, de três pacientes com diagnóstico de infecções cutâneas por *Sporothrix* spp., *Candida albicans* e *Histoplasma capsulatum*, confirmadas por cultura ou histopatologia.

4.2 Cultura parasitológica e caracterização isoenzimática

Para realização da cultura parasitológica, os fragmentos teciduais coletados foram mergulhados imediatamente em solução salina, semeadas em meio de cultura bifásico NNN e meio Schneider (Sigma-Aldrich) contendo 10% de soro fetal bovino e

incubados a 26-28°C. As formas promastigotas de *Leishmania* isoladas foram identificadas por eletroforese enzimática multilocus, utilizando cinco sistemas enzimáticos (CUPOLILLO *et al.*, 1994; MADEIRA *et al.*, 2009). A cultura parasitológica foi realizada no Laboratório de pesquisa clínica e Vigilância em Leishmanioses do INI/ Fiocruz.

4.3 Histopatologia

Para histopatologia, cortes seriados de 5 µm dos blocos de parafina contendo os tecidos foram corados pela HE e desparafinizados em xilol e reidratados em concentrações decrescentes de etanol (CARSON; HLADICK, 2009).

4.4 Imuno-histoquímica

Para realização da técnica de IHQ, cortes seriados de 5 µm dos blocos de parafina contendo os tecidos foram colocados em lâminas silanizadas (Erviagas, ERV – SF PLUS) e desparafinizados em xilol e reidratados em concentrações decrescentes de etanol. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito em solução de peróxido de hidrogênio a 30% e metanol (45 ml de peróxido de hidrogênio e 55 ml de metanol) por 40 min a temperatura ambiente ao abrigo da luz. A recuperação antigênica foi realizada em tampão de citrato de sódio (pH = 6,0) a 65 °C em banho-maria durante 30 min. Para o bloqueio de ligações inespecíficas, foi utilizada solução bloqueadora de proteínas Lab Vision™ Ultra V Block (Thermo Scientific, California, EUA) por 10 min a temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram incubados *overnight* com soro policlonal de coelho anti-*Leishmania* na diluição de 1:500. O soro anti-*Leishmania* foi produzido no Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses do INI, Fiocruz, por imunização de coelhos com formas promastigotas de *L. chagasi* segundo protocolo de Quintella *et al.* (2009). A reação para detecção de *Leishmania* spp. foi desenvolvida usando o Kit The HiDef Detection™ HRP Polymer System (Cell Marque, Massachusetts, EUA, n° de catálogo 954D-30) de acordo com protocolo recomendado pelo fabricante, conforme descrito a seguir. Após incubação com anticorpo anti-*Leishmania* spp., os cortes histológicos foram submetidos à duas lavagens de 5 min com solução salina

tamponada com TRIS (TBS - Tris-Buffered-Saline, TBS IHC Wash Buffer with Tween 20, Cell Marque, Rocklin, California, EUA). Em seguida, os cortes histológicos foram incubados por 20 min à temperatura ambiente com amplificador do kit. Após esses 20 min, os cortes foram submetidos a duas lavagens de 5 min com TBS. Após, as lavagens os cortes histológicos foram incubados por 20 min à temperatura ambiente com detector de polímero conjugado à peroxidase. Após mais duas lavagens de 5 min com TBS, os cortes foram incubados com o cromógeno diaminobenzidina (DAB) (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, EUA). As formas amastigotas foram coradas em castanho pela reação do cromógeno DAB com a peroxidase. Após esta etapa, os cortes foram lavados com três banhos em água destilada durante 2 min e, logo após, submetidos à contracoloração com hematoxilina de Harris. Para montagem, as lâminas foram imersas em água destilada durante 1 min, desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e montadas em entellan (Merck). Cortes histológicos de tecidos intensamente parasitados com formas amastigotas de *Leishmania* foram incubados com soro homólogo não-imune como controle negativo e com soro policlonal de coelho anti-*Leishmania* como controle positivo.

4.5 Hibridização *in situ*

Cortes de 5 µm de espessura dos blocos de parafina foram colocados em lâminas comercialmente silanizadas (Erviagas, ERV – SF PLUS), desparafinizados em xilol e reidratados em concentrações decrescentes de etanol. Em seguida, foram lavados em água corrente durante 3 min e em água destilada durante 2 min. Foi utilizado o kit ZytoFastPlus CISH implementation kit AP-NBT/BCIP® (Zytovision GmbH, Bremerhaven, Germany) de acordo com as recomendações do fabricante. O tratamento proteolítico foi feito utilizando-se pepsina durante 5 min a 37° C. A seguir, as lâminas foram lavadas com dois banhos de 1 min em água destilada e receberam tratamento de condicionamento celular, utilizando tampão citrato de sódio (pH = 6,0) a 98 °C em banho-maria, durante 30 min. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com dois banhos de 1 min em água destilada e desidratadas em concentrações crescentes de etanol e secas em estufa a 37° durante 10 min. Em seguida, as lâminas foram incubadas com a sonda de oligonucleotídeos para o gênero *Leishmania* (5'-ACGGGGATGACACAATAGAGCTTCTCC -3') ligada à digoxigenina

na extremidade 5', na diluição de 1:1000 em solução tampão de hibridização Hybridization Solution H7782 (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, EUA). A seguir, as lâminas foram cobertas com lamínula plástica HybriSlips (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, EUA), seladas com cola Fixogum® (Marabu GmbH & Co. KG, Bietigheim-Bissingen, Alemanha) e colocadas no aparelho hibridizador Thermobrite (StatSpin Spin, Inc., Westwood, MA, EUA). No hibridizador, foi realizada desnaturação a 75°C por 5 min e, logo a seguir, hibridização a 37°C *overnight*. No dia seguinte, foram retirados o selante e as lamínulas e as lâminas foram submetidas a três banhos de estringência: o primeiro à temperatura ambiente durante 5 min, o segundo a 55°C durante 5 min e o terceiro à temperatura ambiente durante 5 min. Foi utilizada solução salina tamponada com TRIS (TBS - Tris-Buffered-Saline) na concentração de 1X para cada banho. Após os banhos de estringência, as lâminas foram incubadas com anticorpos monoclonais anti-digoxigenina produzidos em coelhos por 30 min a 37°C. Após três banhos de 1 min em TBS 1X à temperatura ambiente, as lâminas foram incubadas com anticorpo anti-anticorpo de coelhos conjugado com polímero e fosfatase alcalina por 30 min a 37°C. Após três banhos de 1 min em TBS 1X à temperatura ambiente, os cortes foram submetidos à revelação do sinal com 5-bromo-4-cloro-3 indolil fosfato (BCIP) e 4-nitro blue cloreto de tetrazolium (NBT) por 30 min a 37°C em câmara escura. Após esta etapa, os cortes foram lavados com três banhos em água destilada durante 2 min e, logo após, submetidos à contracoloração com corante nuclear vermelho rápido durante 5 min. Para montagem, as lâminas foram imersas em água destilada durante 1 min, desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e montadas em entellan (Merck). Este protocolo foi adaptado de Boechat *et al.* (2016).

4.6 Leitura das lâminas

A interpretação microscópica foi realizada por três observadores:

A) Observador 1: médico patologista do SEAP do INI-Fiocruz, com experiência de cerca de 15 anos no diagnóstico histopatológico e imuno-histoquímico de doenças infecciosas, especialmente LTA.

B) Observador 2: médico veterinário patologista do Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos do INI-Fiocruz, também com ampla experiência no diagnóstico histopatológico, imuno-histoquímico e HIS em leishmanioses com inúmeras publicações e orientações no tema.

C) Observador 3: aluno do Curso de Mestrado Profissional em Pesquisa Clínica (MPPC) do INI-Fiocruz, com experiência laboratorial no diagnóstico histopatológico e imuno-histoquímico das leishmanioses, responsável pela realização das técnicas de IHQ e HIS do SEAP/ INI-Fiocruz, que é referência no diagnóstico de doenças infecciosas.

Todas as lâminas foram examinadas ao microscópico óptico para a pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania* e o resultado final das leituras foi obtido a partir do observador com maior sensibilidade.

As amostras de tecido coradas pela HE para detecção de amastigotas foram considerada positivas na presença de pelo menos uma estrutura com aspectos morfotintoriais característicos (tamanho e afinidade tintorial do citoplasma, do núcleo, e do cinetoplasto, formato arredondado ou piriforme), e considerando-se também a sua localização no interior de vacúolos parasitóforos de macrófagos.

As amostras de tecido submetidas a reação de IHQ para detecção de formas amastigotas foram consideradas positivas quando observada ao menos uma estrutura marcada em castanho, e morfologicamente compatível com uma forma amastigota. Também foram considerados a forma, o tamanho, a textura e a localização no interior de vacúolos parasitóforos de macrófagos.

As amostras de tecido submetidas a reação de HIS para detecção de formas amastigotas consideradas positivas quando observada ao menos uma estrutura marcada em azul escuro. Também consideraram-se a forma, o tamanho e a localização da estrutura no interior de vacúolos parasitóforos de macrófagos.

As amostras de tecido contendo formas fúngicas para pesquisa de reação cruzada foram consideradas positivas sempre que se observou a marcação dessas formas em castanho pelo cromógeno utilizado.

4.7 Análise estatística

Os dados foram armazenados no software Statistical Package for Social Sciences (versão 20) para Windows e analisados usando o software R Project for Statistical Computing for Windows software (versão 3.3). Os resultados do observador que detectou o maior número de amostras positivas para *Leishmania* spp. nas diferentes técnicas de diagnóstico avaliadas foram utilizados para o cálculo de sensibilidade de cada técnica. As sensibilidades e os respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%) foram calculados usando a cultura parasitológica como técnica padrão-ouro. A concordância inter observadores em cada técnica avaliada foi estimada pelo índice Kappa, de acordo com Landis e Koch (1977).

4.8 Considerações éticas

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) do INI, Fiocruz (protocolo número 51629615.0.0000.5262).

5 RESULTADOS

5.1 Comparação de sensibilidades

Os resultados de sensibilidade para o diagnóstico de *Leishmania* spp. encontrados pelas técnicas de IHQ, HIS e HE foram de 66%, 54% e 50%, respectivamente. O número de amostras positivas e negativas para cada técnica avaliada encontra-se descrito na tabela 1.

Tabela 1 – Casos positivos e negativos para formas amastigotas de *Leishmania* sp. pelas técnicas de HIS, IHQ e HE em amostras de pele de pacientes com LTA causada por *L. V braziliensis*

Casos (N=50)	HIS	IHQ	HE
Positivo	27	33	25
Negativo	23	17	25

Nota: N= número de casos; HIS=hibridização *in situ*; IHQ=imuno-histoquímica; HE=hematoxilina-eosina.

As figuras 1 e 2 ilustram a marcação positiva de formas amastigotas de *Leishmania* sp. no citoplasma de macrófagos em amostras de pele examinadas pela técnica de HIS (marcadas em azul escuro) e IHQ (marcadas em castanho), respectivamente.

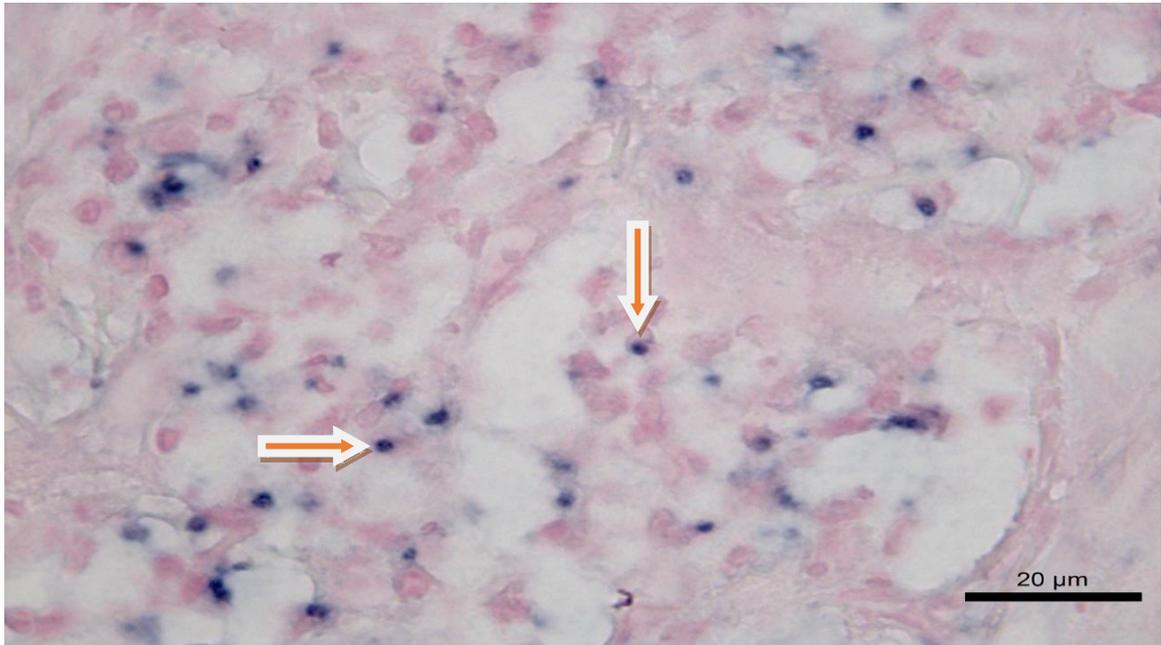


Figura 1 – Pele, LTA, HIS. Formas amastigotas de *Leishmania* sp. marcadas em azul escuro (setas).

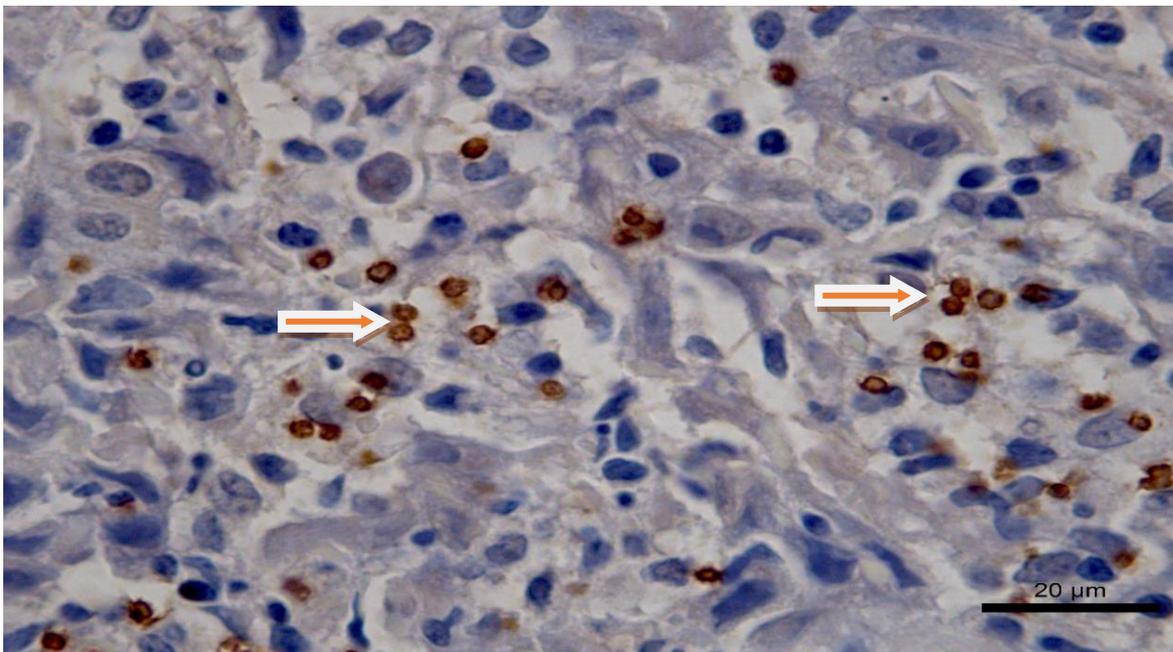


Figura 2 - Pele, LTA, IHQ. Formas amastigotas de *Leishmania* sp. marcadas em castanho (setas).

Na figura 3, são mostradas formas amastigotas de *Leishmania* sp. identificadas pela técnica de HE .

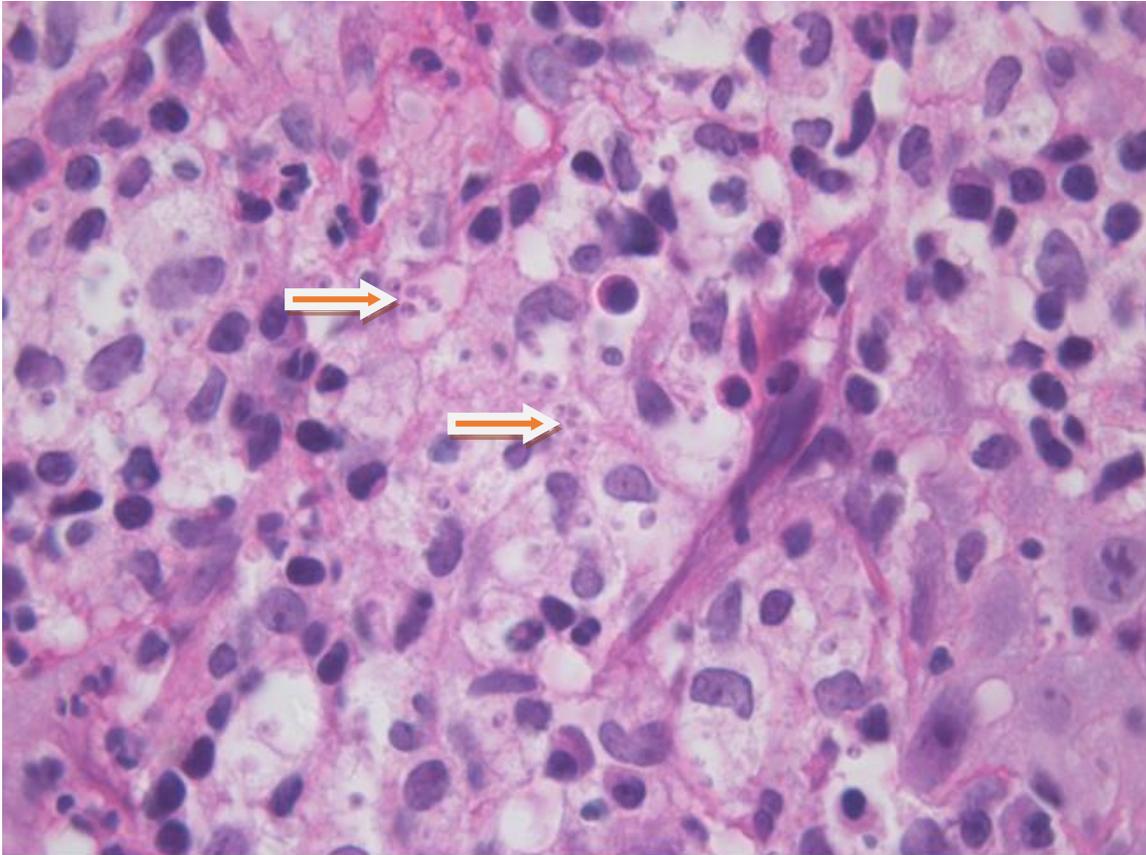


Figura 3 – Pele, LTA, HE. Formas amastigotas de *Leishmania* sp. no interior de vacúolos parasitóforos de macrófagos (setas) na derme em meio a reação inflamatória composta principalmente por macrófagos, havendo também linfócitos e plasmócitos em menor número e raros neutrófilos.

As tabelas 2, 3 e 4 comparam as três técnicas estudadas, duas a duas, em relação a distribuição dos casos positivos e negativos.

Tabela 2 – Comparação do número de casos positivos e negativos para formas amastigotas de *Leishmania* sp. obtidos pelas técnicas de HIS e IHQ em amostras de pele de pacientes com LTA causada por *L. braziliensis*.

TÉCNICA		IHQ		
		Positivo	Negativo	Total
HIS	Positivo	24	3	27
	Negativo	9	14	23
TOTAL		33	17	50

Nota: HIS=hibridização *in situ*; IHQ=imuno-histoquímica.

Tabela 3 – Comparação do número casos positivos e negativos formas amastigotas de *Leishmania* sp. obtidos pelas técnicas de HIS e HE em amostras de pele de pacientes com LTA causada por *L. V braziliensis*.

TÉCNICA		HE		
		Positivo	Negativo	Total
HIS	Positivo	19	8	27
	Negativo	6	17	23
TOTAL		25	25	50

Nota: HIS=hibridização *in situ*; HE=hematoxilina-eosina.

Tabela 4 – Comparação do número casos positivos e negativos formas amastigotas de *Leishmania* sp. obtidos pelas técnicas de IHQ e HE em amostras de pele de pacientes com LTA causada por *L. braziliensis*.

TÉCNICA		HE		
		Positivo	Negativo	Total
IHQ	Positivo	23	10	33
	Negativo	2	15	17
TOTAL		25	25	50

Nota: IHQ=imuno-histoquímica; HE=hematoxilina-eosina.

A concordância inter observadores é demonstrada na tabela 5, segundo o grau de concordância (valor Kappa).

Tabela 5 - 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. V braziliensis*.

TÉCNICA	OBSERVADOR 1 X 2		OBSERVADOR 1 X 3		OBSERVADOR 2 X 3	
	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

Nota: HIS=hibridização *in situ*; IHQ=imuno-histoquímica; HE=hematoxilina-eosina; IC=intervalo de confiança. Valor de kappa= 0,40-0,59 (concordância moderada); valor de kappa= 0,60-0,79 (concordância substancial); valor de kappa= 0,80-1,00 (concordância quase perfeita).

5.2 Avaliação da ocorrência de reações ou hibridizações cruzadas

Os resultados da avaliação da ocorrência de reação cruzada pela técnica de IHQ e de hibridização cruzada pela técnica de HIS com fungos semelhantes à *Leishmania* sp. podem ser observados na tabela 6 e e figuras 4-9.

Tabela 6 – Resultados das técnicas de HIS usando sonda genérica para *Leishmania* spp. e IHQ usando anticorpo anti-*Leishmania* spp. em amostras de pele de pacientes infectados pelos fungos *Sporothrix* spp., *Candida* spp., *Histoplasma* spp.

Fungo	Controles	ISH	IHQ
<i>Sporothrix</i> spp.	Positivo	–	+
	Negativo	–	–
<i>Candida</i> spp.	Positivo	–	+
	Negativo	–	–
<i>Histoplasma</i> spp.	Positivo	–	+
	Negativo	–	–

(-) = negativo para reação ou hibridização cruzada; (+) = positivo para reação ou hibridização cruzada.

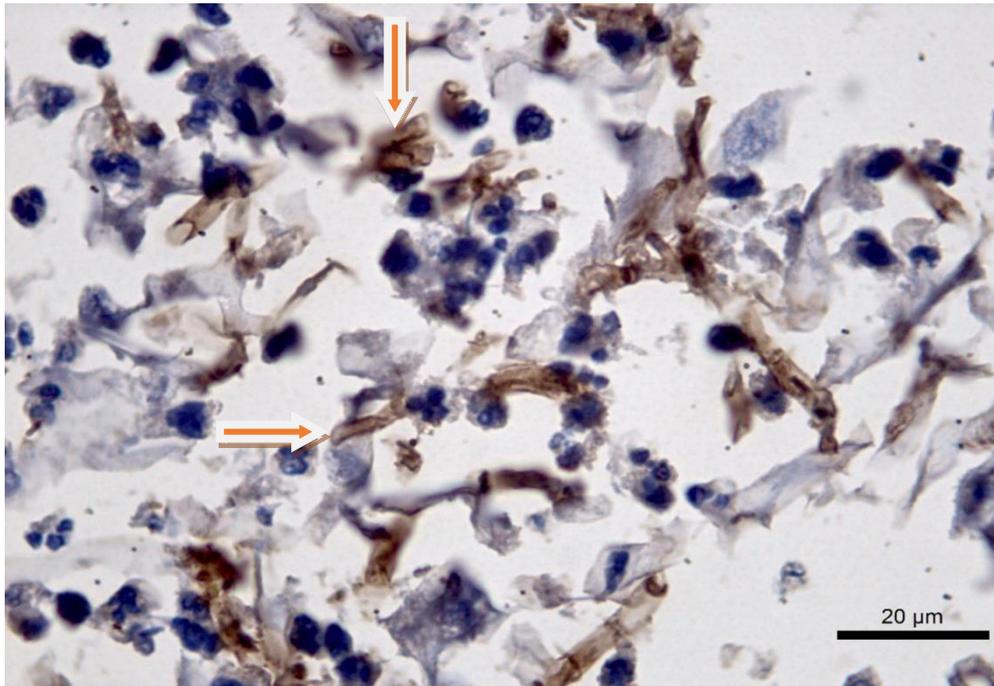


Figura 4: Pele infectada por hifas de *Candida* spp. marcadas em castanho por anticorpos anti-*Leishmania* spp. (setas). IHQ.

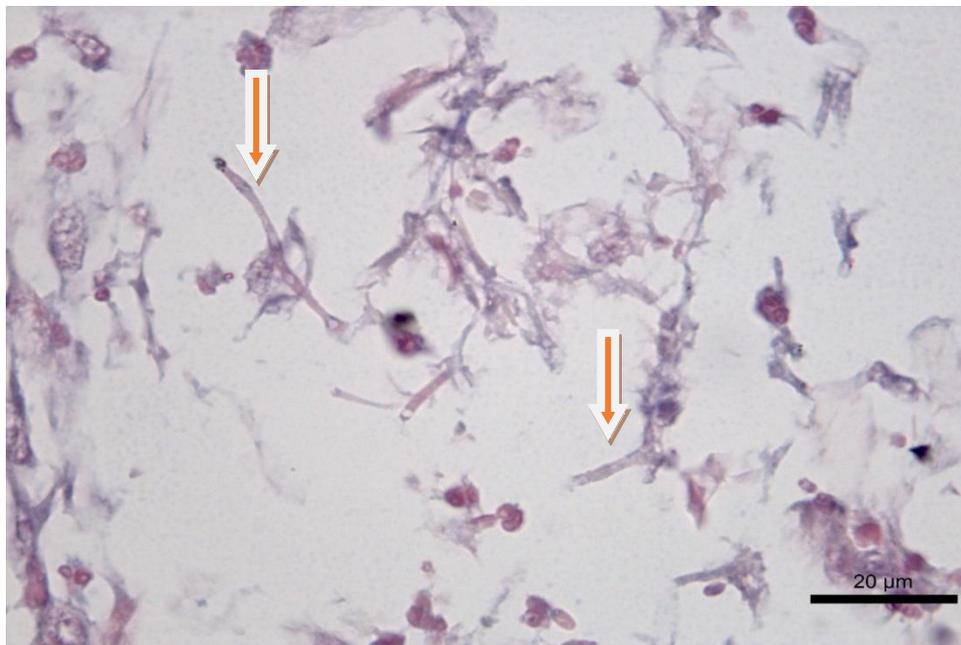


Figura 5: Pele infectada por *Candida* spp. Não houve marcação em hifas utilizando a sonda genérica para *Leishmania* spp. (setas). HIS.

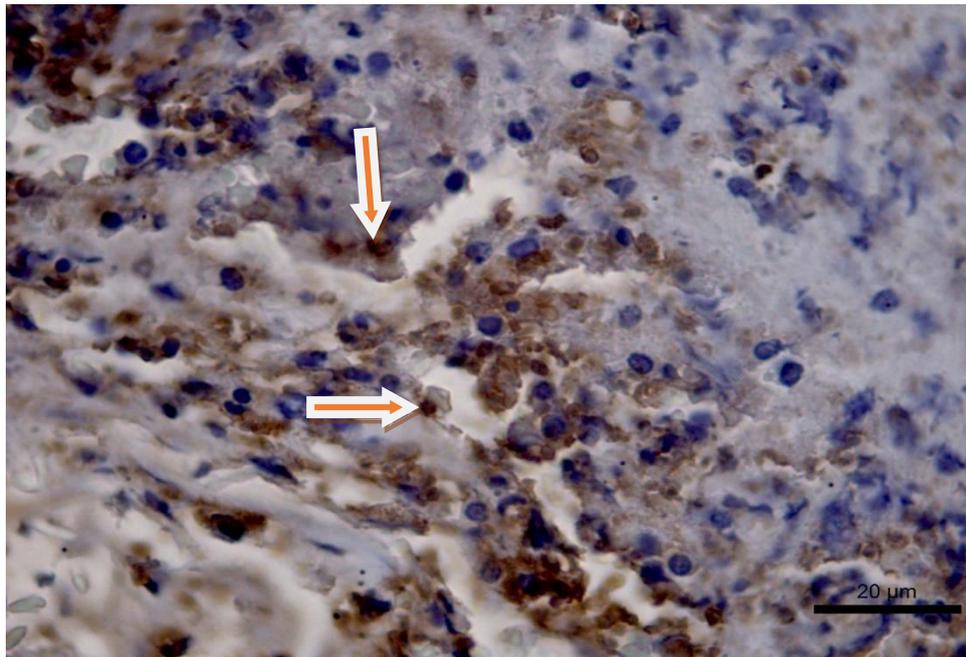


Figura 6 - Pele infectada por *Sporothrix* sp. Observa-se leveduras marcadas utilizando soro anti-*Leishmania* spp. (setas). IHQ.

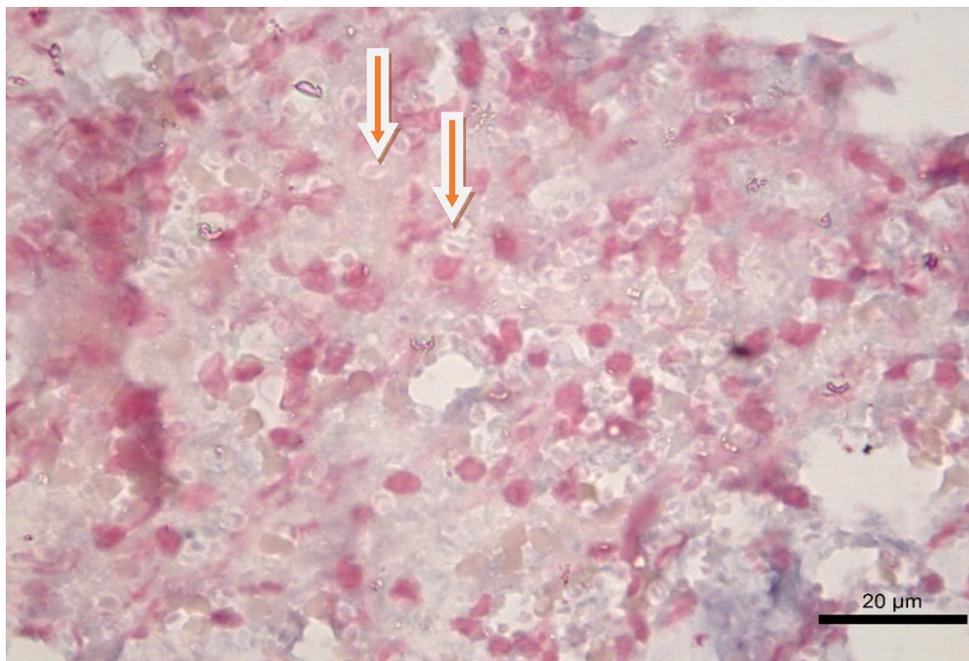


Figura 7: Pele infectada por *Sporothrix* sp. Não houve marcação em leveduras utilizando sonda genérica de *Leishmania* spp. (setas). HIS.

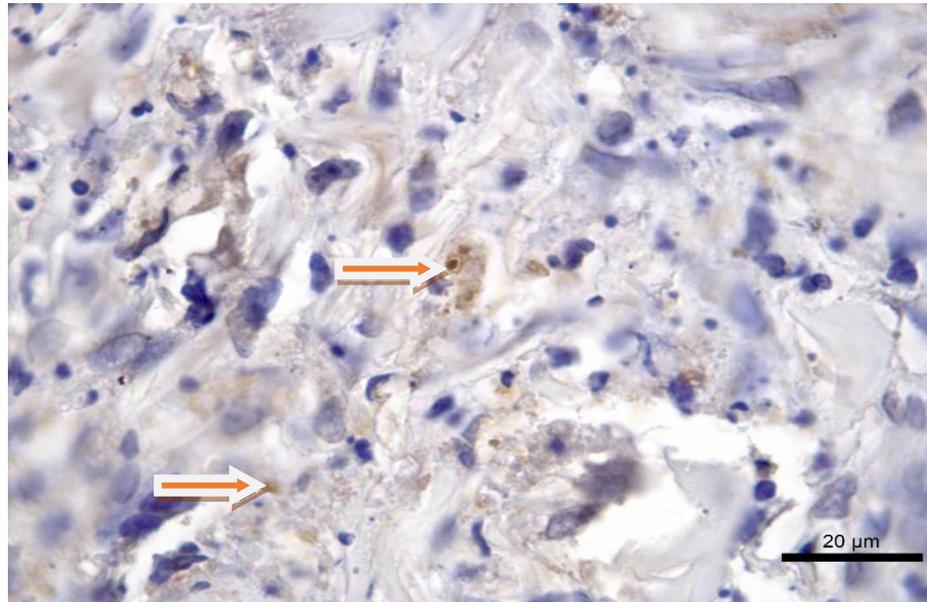


Figura 8 - Pele infectada por *histoplasma* spp. observou-se marcação utilizando Soro Anti-*Leishmania* spp. (setas). IHQ.

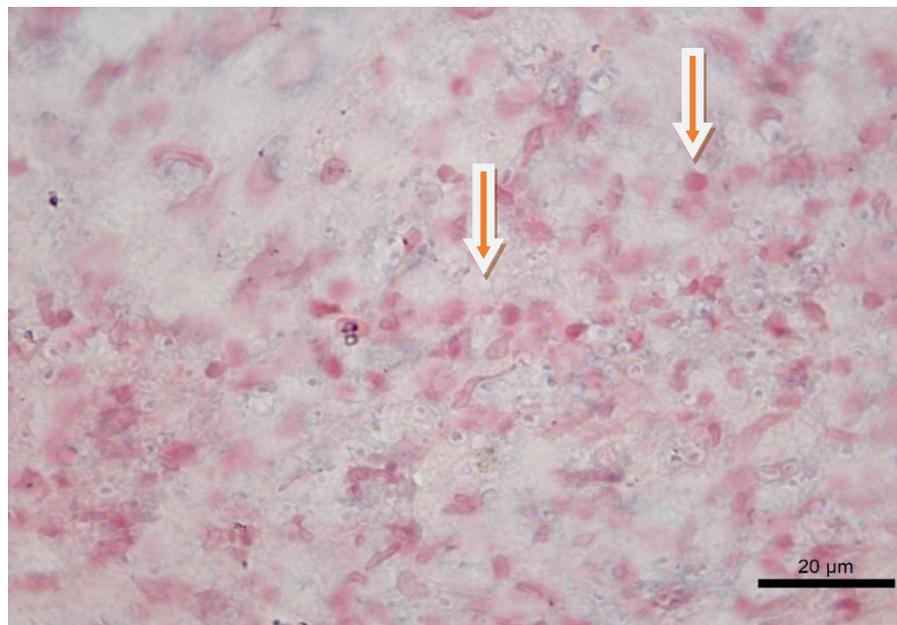


Figura 9 - Pele infectada por *Histoplasma* spp. Não houve marcação cruzada utilizando sonda genérica para *Leishmania* spp. (setas). HIS.

6 DISCUSSÃO

Foi realizado um estudo de comparação da sensibilidade de três diferentes técnicas no diagnóstico da LTA em pacientes com confirmação diagnóstica por isolamento de *Leishmania* em cultura, que foi caracterizada como *L.V braziliensis*. No presente estudo, a técnica de IHQ apresentou maior sensibilidade quando comparada às técnicas de HIS e histopatologia. A sensibilidade encontrada esteve dentro da faixa de valores de sensibilidade descrita por outros autores para o diagnóstico de LTA, 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). Os protocolos da técnica de IHQ e critérios de seleção das amostras nos estudos mencionados foram diferentes do presente estudo, o que pode ter influenciado na variação de sensibilidade observada.

Entretanto, Quintella *et al.* (2009) e Alves *et al.* (2013) relataram valores mais altos de sensibilidade da técnica de IHQ para o diagnóstico de LTA. Quintella *et al.* (2009) descreveram sensibilidade de 80% na técnica de IHQ, utilizando um grupo de amostras semelhantes a este estudo, com cultura positiva para *Leishmania* do subgênero *Vianna*, utilizada como técnica padrão-ouro. Porém, foi utilizado um protocolo diferente do presente estudo, com tratamento térmico para recuperação antigênica com temperatura de 100°C, e o kit de detecção estraptavidina-biotina-peroxidase (Universal DAKO LSAB, System). No presente estudo, foi aplicado um kit de detecção de polímeros livre de biotina em sua composição e um tratamento térmico para recuperação antigênica com temperatura de 65°C. Vale salientar que Quintella *et al.* (2009) utilizaram um número amostral menor (N=30), o que pode ter influenciado na sensibilidade. A diferença de sensibilidade entre os estudos também pode ser atribuída a possível diferença de intensidade de carga parasitária nas lesões de LTA. Alves *et al.* (2013) encontraram uma sensibilidade de 92% para técnica de IHQ no diagnóstico de LTA. O fato desses autores terem utilizado soro hiperimune de cão anti-*Leishmania* como anticorpo primário e testado a IHQ em

amostras de pele positivas na microscopia e PCR e oriundas de pacientes positivos na reação intra-dérmica de Montenegro, provavelmente influenciaram no alto valor de sensibilidade encontrado. Esses autores também observaram que o uso de anticorpos monoclonais anti-*Leishmania* levaram a uma redução da sensibilidade da IHQ para 71% e o kit de detecção de polímeros teve desempenho semelhante ao do kit de detecção estreptavidina-biotina-peroxidase.

A aplicação da IHQ para detecção de formas amastigotas de *Leishmania* spp. em lesões cutâneas de LTA em cães elevou a sensibilidade do diagnóstico a 70%, em relação a 37,5% pela HE (SANTOS *et al.*, 2015). Menezes *et al.* (2013) avaliaram a sensibilidade da IHQ em amostras de pele íntegra de cães infectados por *L. infantum* e obtiveram sensibilidade de 69,5%, utilizando protocolo semelhante ao aqui descrito. Embora a sensibilidade encontrada no presente estudo tenha sido ligeiramente inferior (66%), ressalta-se que a carga parasitária descrita em amostras de pele é geralmente alta na leishmaniose visceral canina, em relação à LTA. Ainda assim, a validação e uniformização destes protocolos em laboratórios de referência são necessárias para obtenção de métodos de diagnóstico mais fidedignos e reprodutíveis, de modo que diferenças de sensibilidade não sejam atribuídas a variações técnicas interlaboratoriais.

A avaliação da sensibilidade da técnica de HIS para o diagnóstico da LTA causada por *L. V braziliensis* em amostras de pele humana está sendo relatada pela primeira vez neste estudo. Essa sensibilidade esteve dentro do esperado para um método de diagnóstico parasitológico de LTA e ligeiramente superior à técnica de histopatologia, podendo assim ser utilizada na rotina. Entretanto, assim como a IHQ e a histopatologia, esta é uma técnica menos sensível do que a técnica de PCR utilizando amostras congeladas, que apresentam sensibilidades de 87 a 98% (AMEEN, 2010; ANDRADE *et al.*, 2011; GOMES *et al.*, 2008; SATOW, 2013; VEGALOPES, 2003;).

Diferentemente da PCR, a HIS não amplifica o DNA do parasito, mas detecta seus ácidos nucleicos presentes na amostra, possuindo uma sensibilidade inferior (DINHOPL *et al.*, 2011; SEGALÉS *et al.*, 1999). Apesar de não avaliar a sensibilidade da HIS, outros estudos já haviam descrito com sucesso a utilização dessa técnica para o diagnóstico de formas amastigotas de *Leishmania* spp. em amostras de pele de pacientes humanos. Porém, esses autores utilizaram uma

sonda diferente e técnica de hibridização *in situ* fluorescente (HISF) (DINHOPL *et al.*, 2011; FRICKMANN *et al.*, 2012).

Menezes *et al.* (2013) encontraram sensibilidade de 70% no diagnóstico de *L. infantum* em pele íntegra de cães utilizando a mesma sonda deste estudo e a técnica de hibridização *in situ* colorimétrica (HISC) em protocolo automatizado. Essa sensibilidade foi inferior à encontrada com a utilização de sonda específica para *L. infantum* (74,5%) e superior à sensibilidade da IHQ (69,5%) e da histopatologia (57,6%). No protocolo automatizado descrito por Menezes *et al.* (2013), as espécies de *Leishmania* e hospedeiro investigados provavelmente tiveram influência em melhores resultados de sensibilidade encontrados pela HISC em relação ao presente estudo.

A menor sensibilidade encontrada pela técnica de HIS em comparação com a IHQ provavelmente ocorreu pelo maior dano tissular provocado pelas etapas de tratamento térmico e digestão proteica, diferentes do utilizado na IHQ. No protocolo da IHQ usado neste estudo, é utilizado tratamento térmico para recuperação antigênica a temperatura inferior (65°C) e não é feita digestão proteica, o que promove um dano menor ao tecido, possibilitando melhor visualização das formas amastigotas marcadas. Outros fatores que podem ter influenciado foram o tempo de fixação na formalina tamponada a 10%. Os tempos de fixação adequados variam de 12 a 48 horas. O tempo superior a 48 horas pode ter um impacto negativo na qualidade dos ácidos nucleicos a serem analisados, assim como o longo tempo de armazenamento dos blocos, uma vez que se trata de um grupo de amostras retrospectivas arquivadas (SCORSATO, A. P.; TELLES, J. E. Q., 2011; ECONOMOU *et al.*, 2014; MAES *et al.*, 2014; NUOVO *et al.*, 2013). No presente estudo, por serem amostras retrospectivas, não foi possível saber qual foi o tempo de fixação delas em formalina tamponada a 10% antes do processamento pelas técnicas histológicas.

Embora a HE tenha sido a de menor sensibilidade, foi uma técnica útil na detecção de formas amastigotas de *Leishmania* sp. Outros estudos encontraram sensibilidade semelhante aos encontrados na presente pesquisa (QUINTELLA *et al.*, 2009; SCHUBACH *et al.*, 2001). As vantagens destes métodos são o menor custo e maior rapidez, além de exigir estrutura laboratorial menos complexa do que para IHQ e HIS e permitir correlação entre a detecção do parasito e as alterações histológicas observadas. Entretanto, mesmo considerada específica, pode haver

confusão na leitura com organismos histomorfologicamente semelhantes como *Histoplasma* e *Sporothrix*. De acordo com a literatura e resultados do presente estudo, para aumento de sensibilidade no diagnóstico histológico e confirmação dos casos é importante a realização da técnica de imuno-histoquímica ou de hibridização *in situ* (MENEZES *et al.*, 2013; QUINTELLA *et al.*, 2009).

Embora tenha apresentado resultados de sensibilidade superiores aos encontrados pela técnica de HIS neste estudo para o diagnóstico de LTA em amostras de lesões cutâneas fixadas em formalina tamponada à 10%, a IHQ apresentou reação cruzada com as três espécies de fungos histomorfologicamente semelhantes a *Leishmania* spp. pesquisadas. Essa reatividade cruzada com fungos na técnica de imuno-histoquímica para diagnóstico de LTA usando soro policlonal de coelho foi relatada por Quintella *et al.* (2009) para os fungos *Paracoccidioides brasiliensis* e *Histoplasma capsulatum*. Menezes *et al.* (2013), usando protocolo semelhante da técnica de IHQ para diagnóstico de *L. infantum* em pele íntegra de cães, encontraram reação cruzada para *Histoplasma capsulatum* e *Trypanosoma cruzi*. O fato do anticorpo primário utilizado ser um soro policlonal de coelho *in house* pode ter contribuído para esse problema na técnica utilizada. Contudo, Santos *et al.* (2015) não observaram reação cruzada com *Sporothrix* sp. em lesões cutâneas de esporotricose canina, utilizando o mesmo soro do presente estudo. Ressalta-se que a carga fúngica descrita em lesões de esporotricose em cães e em humanos geralmente é muito baixa, o que pode dificultar a visualização de reações cruzadas.

Diferentemente da IHQ, não houve hibridização cruzada na HIS com fungos histomorfologicamente semelhantes às formas amastigotas de *Leishmania* spp. (MENEZES *et al.*, 2013). Esses resultados são parecidos aos da literatura, que consideram a HIS mais específica que a IHQ, pois ela detecta sequência específica de ácidos nucleicos do parasito e não antígeno (MAES *et al.*, 2014; SEGALÉS *et al.*, 1999).

Outra vantagem da ISH em relação a sensibilidade para o diagnóstico de formas amastigotas é a utilização do cromógeno NBT/BCIP que marca o parasito na cor azul escuro, enquanto que a técnica IHQ usa o cromógeno DAB, marcando o parasito em castanho, podendo gerar confusão na interpretação quando houver pigmentos castanhos intracelulares como melanina e hemossiderina.

Os resultados confirmam a HIS como um método preciso para o diagnóstico da infecção por LTA em biópsias de lesão cutâneas fixadas em formol a 10%,

possibilitando uma nova ferramenta no auxílio do diagnóstico, sobretudo na confirmação dos casos suspeitos de LTA por IHQ ou HE.

Foi verificado nos valores de kappa, que entre os três observadores o HE apresentou a melhor concordância (quase perfeita e substancial); seguida da técnica da ISH (concordância quase perfeita e substancial), porém com valores inferiores ao comparado com o HE. A IHQ demonstrou concordância inferior, sobretudo comparando o observador 1 com os observadores 2 e 3 (concordância moderada). Uma das hipóteses para o achado de concordância moderada da IHQ seria a marcação castanha das formas amastigotas de *Leishmania* spp. conferida pelo cromógeno DAB utilizado nessa técnica, que pode ser confundida com a coloração castanha de pigmentos intracelulares como a hemossiderina e melanina (NUOVO, 2013; SHEN; WU, 2015). A utilização de outros cromógenos que confirmam reações colorimétrica diferentes da empregada, como NBT e BCIP (coloração azul intenso) ou cromógeno Fast Red (coloração em vermelho) seriam recomendações para evitar esse problema na leitura das lâminas. Outra hipótese seria a diferente experiência dos observadores, conforme foi relatado para detecção de formas amastigotas de *Leishmania* spp. nas técnicas de citopatologia e imunocitoquímica (VASCONCELOS *et al.*, 2016). Portanto, o treinamento dos observadores seria uma medida para minimizar as discrepâncias entre os resultados das leituras, sobretudo na técnica de IHQ.

7 CONCLUSÕES

1. A técnica de IHQ revelou maior sensibilidade para o diagnóstico histológico de *L.V 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 leishmaniose tegumentar americana.
2. A técnica de IHQ para diagnóstico de *L.V 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.
3. A técnica de HIS para o diagnóstico de *L.V 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.V braziliensis*, porém pode ser considerado um método útil para o diagnóstico desse parasito, sobretudo na ausência de IHQ e HIS.
5. A leitura da técnica de IHQ para o diagnóstico de LTA se mostrou mais sujeita a variação inter observadores de diferentes experiência, devendo ser revisto o treinamento dos observadores e o cromógeno utilizado na técnica.

6. A técnica de HIS foi padronizada, avaliada e implementada na rotina do Serviço de Anatomia Patológica do INI-Fiocruz como mais uma ferramenta útil no diagnóstico da LTA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, C. F.; ALVES, C. F.; FIGUEIREDO, M. M. *et al.* American tegumentary leishmaniasis: effectiveness of an immunohistochemical protocol for the detection of *Leishmania* in skin. **PLoS One.**, San Francisco, v. 8, n. 5, 2013.

AMATO, V.S.; DUARTE, M.I.; NICODEMO, A.C.; *et al.*, An evaluation of clinical, serologic, anatomopathologic and immunogistochemical findings for fifteen patients with mucosal leishmaniasis before and after treatment. **Rev Inst Med Trop São Paulo.** v. 40, n. 1, p. 23-30. 1998.

AMATO, V. S.; TUON, F. F.; DE ANDRADE, H. F. JR. *et al.* Immunohistochemistry and polymerase chain reaction on paraffin-embedded material improve the diagnosis of cutaneous leishmaniasis in the Amazon region. **Int. J. Dermatol.** Philadelphia, v. 48, n. 10, p. 1091-1095, 2009.

AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. **Clin. Exp. Dermatol.**, Oxford, v. 35, n. 7, p. 699-705, 2010.

ANDRADE, R. V.; MASSONE, C.; LUCENA, M. N. *et al.* The use of polymerase chain reaction to confirm diagnosis in skin biopsies consistent with American tegumentary leishmaniasis at histopathology: a study of 90 cases. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v. 86, n. 5, p. 892-896, 2011.

BERMAN, J. D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v. 24, n. 4, p. 684-703, 1997.

BOECHAT, V. C. JUNIOR, A. A. V. M.; MADEIRA, M. de F. *et al.* Occurrence of *Leishmania infantum* and associated histological alterations in the genital tract and mammary glands of naturally infected dogs. **Parasitol Res.**, Berlin, DOI 10.1007/s00436-016-4987-4. 2016.

BOGGILD, A. K.; RAMOS, A. P.; ESPINOSA, D. *et al.* Clinical and demographic stratification of test performance: a pooled analysis of five laboratory diagnostic methods for American cutaneous leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 83, n. 2, p. 345-350, 2010.

CARSON F. L.; HLADICK, C. **Histotechnology**: a self-instructional text, 3. ed. Chicago: ASCP Press, 2009.

CUPOLILLO, E.; GRIMALDI, Jr. G.; MOMEN, H. A general classification of new world *Leishmania* using numeral zymotaxonomy. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Chicago, v. 50, n. 3, p. 296-311, 1994.

DA-CRUZ, A. M.; PIRMEZ, C. Leishmaniose tegumentar americana. In: COURA, J. R. **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. v. 1, cap. 56, p. 746-760.

DE ALMEIDA, A. B. P. F.; SOUSA, V. R.; SORTE, E. C. B. *et al.* Use of parasitological culture to detect *Leishmania (Leishmania) chagasi* in naturally infected dogs. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, New York, v. 11, n. 12, p. 1555–1560, 2011.

DE MELLO, C. X.; DE MORAIS, L. H.; SCHUBACH, A. O. *et al.* Tegumentary leishmaniasis: a diagnostic approach considering aspects of the cytological examination. **Acta Cytol.**, Chicago, v. 58, n. 4, p. 383-387, 2014.

DE QUEIROZ, N. M. P. G.; DA SILVEIRA, R. C. V.; DE NORONHA, A. C. JR. *et al.* Detection of *Leishmania (L.) chagasi* in canine skin. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v. 178, n. 1-2, p. 1-8, 2011.

DINHOPL, N.; MOSTEGL, M. M.; RICHTER, B. *et al.* In situ hybridization for the detection of *Leishmania* species in paraffin wax-embedded canine tissues using a digoxigenin-labelled oligonucleotide probe. **Vet. Rec.**, London, v. 169, n. 20, p. 525, 2011.

ECONOMOU, M.; SCHÖNI, L.; HAMMER, C. *et al.* Proper paraffin slide storage is crucial for translational research projects involving immunohistochemistry stains. **Clin. Trans. Med.**, Heidelberg, v. 3, n. 1, p. 4, 2014.

FRICKMANN, H.; ALNAMAR, Y.; ESSIG, A. *et al.* Rapid identification of *Leishmania* spp. in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples by fluorescence *in situ* hybridization. **Trop. Med. Int. Health.**, Oxford, v. 17, n. 9, p. 1117-1126, 2012.

GALL, J. G.; PARDUE, M. L. Formation and Detection of RNA-DNA Hybrid Molecules in Cytological Preparations. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v. 63, n. 2, p. 378-383. 1969.

GOMES, A. H.; ARMELIN, I. M.; MENON, S. Z. *et al.* *Leishmania* (V.) *brazilensis*: detection by PCR in biopsies from patients with cutaneous leishmaniasis. **Exp. Parasitol.**, New York, v. 119, n. 3, p. 319-324, 2008.

GOMES, C. M.; PAULA, N. A.; MORAES, O. O. *et al.*, Complementary exams in the diagnosis of american tegumentary leishmaniasis. **An. Bras. Dermatol.** v. 89, n. 5, p. 701-711, 2014.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Rev. Anti Infect. Ther.**, London, v. 8, n. 4, p. 419-433, 2010.

KENNER, J. R.; ARONSON, N. E.; BRATTHAUER, G.L. *et al.* Immunohistochemistry to identify *Leishmania* parasites in fixed tissues. **J. Cutan. Pathol.** Copenhagen, v. 26, n. 3, p. 130–136, 1999.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics.** Washington, v. 33, n. 1, p. 159–174, 1977.

LIMA, E. B.; PORTO, C.; DA MOTTA, J. O. C. *et al.* Tratamento da leishmaniose tegumentar americana. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v. 82, n. 2, p. 111-124, 2007.

MADEIRA, M. F.; FIGUEIREDO, F. B.; PINTO, A. G. *et al.* Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: is intact skin a good target? **Res. Vet. Sci.**, Oxford, v. 87, n. 2, p. 260-262, 2009.

MAES, R. K.; LANGOHR, I. M.; WISE, A. G. *et al.* Beyond H&E: Integration of Nucleic Acid-Based Analyses Into Diagnostic Pathology. **Vet. Pat.**, New York, v. 51, n. 1, p. 238-256, 2014.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Vet. Parasitol.**, Amsterdam, v. 158, n. 4, p. 274-287, 2008.

MARQUES, F. A.; SOARES, R. P.; ALMEIDA, G. G. *et al.* Effectiveness of an immunohistochemical protocol for *Leishmania* detection in different clinical forms of American tegumentar leishmaniasis. **Jor. Parasitology Inter.** Ireland. v. 66, p. 884-888. 2016.

MELLO, C. X.; SCHUBACH, A. O.; OLIVEIRA, R. V. C. *et al.*, Comparison of the sensitivity of imprint and scraping techniques in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in a referral centre in Rio de Janeiro, Brazil. **Parasitol Res.** v. 109, p. 927–933. 2011.

MENEZES, R. C.; FIGUEIREDO, F. B.; WISE, A. G. *et al.* Sensitivity and specificity of *in situ* hybridization for the diagnosis of cutaneous infection by *Leishmania infantum* in dogs. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 51, n. 1, p. 206-211, 2013.

A - MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção Leishmania-HIV.** Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

B - MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana**. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

C - MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Situação Epidemiológica - Dados**. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/723-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-/leishmaniose-tegumentar-americana-lta/11328-situacao-epidemiologica-dados>>. Acesso em: 12 Mai. 2017.

MONTENEGRO, J. M. D. Cutaneous reactions in leishmaniasis. **Arch. Dermatol. Syph.**, Berlim, v. 13, n. 2, p. 187-194, 1926.

MOSTEGL, M.M.; RICHTER, B.; DINHOPL, N. *et al.* Influence of prolonged formalin fixation of tissue samples on the sensitivity of chromogenic *in situ* hybridization. **J. Vet. Diagn. Invest.**, Columbia, v. 23, n. 6, p. 1212–1216, 2011.

NUOVO, G.J. **In situ molecular pathology and co-expression analysis**. San Diego: Academic Press, 2013.

NUOVO, A. J.; GAROFALO, M.; MIKHAIL, A. *et al.* The effect of aging of formalin-fixed paraffin-embedded tissues on the *in situ* hybridization and immunohistochemistry signals in cervical lesions. **Diagn. Mol. Pathol.**, New York, v. 22, n. 3, p. 164-173, 2013.

QUINTELLA, L. P.; CUZZI, T.; MADEIRA, M. F. *et al.* Immunoperoxidase technique using an anti-*Leishmania (L.) chagasi* hyperimmune serum in the diagnosis of culture-confirmed American tegumentary leishmaniasis. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.**, São Paulo, v. 51, n. 2, p. 83-86, 2009.

RAMIREZ, J. R.; AGUDELO, S.; MUSKUS, C. *et al.* Diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Colombia: the sampling site within lesions influences the sensitivity of parasitologic diagnosis. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 38, n. 10, p. 3768–3773, 2000.

RAMOS-VARA, J. A. Technical Aspects of Immunohistochemistry. **Vet. Pathol.**, New York, v. 42, n. 4, p. 405-426, 2005.

SALINAS, G.; VALDERRAMA, L.; PALMA, G. *et al.* Detección de amastigotas en leishmaniasis cutánea y mucocutánea por el método de inmunoperoxidasa, usando anticuerpo policlonal: sensibilidad y especificidad comparadas con métodos convencionales de diagnóstico. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, Rio de Janeiro, v. 84, n. 1, p. 53-60, 1989.

SANTOS, I. B.; TORTELLYB, R.; QUINTELLA, L. P., *et al.*, Higher sensitivity of immunohistochemistry for bona fide diagnosis of dog *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* - driven American tegumentary leishmaniasis: description of an optimized immunohistochemistry method. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, DOI 10.1093/trstmh/trv034. 2015.

SÃO THIAGO, P. T.; SANTOS, J. I.; STEINDEL, M. Histoplasmose em região de palato duro simulando lesão causada por *Leishmania*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 2, p. 225–229, 1998.

SATOW, M. M.; YAMASHIRO-KANASHIRO, E. H.; ROCHA, M. C. *et al.* Applicability of kDNA PCR for routine diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in a tertiary reference hospital. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.**, São Paulo, v. 55, n. 3, p. 393-399, 2013.

SCHEN, H.; WU, W. Study of melanin bleaching after immunohistochemistry of melanin-containing tissues. **Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.**, Philadelphia, v.23, n.4, p.303-307, 2015.

SCHUBACH, A.; CUZZI-MAYA, T.; OLIVEIRA, A. V. *et al.* Leishmanial antigens in the diagnosis of active lesions and ancient scars of American tegumentary leishmaniasis patients. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** Rio de Janeiro, v. 96, n. 7, p. 987-996, 2001

SCORSATO, A. P.; TELLES, J. E. Q.; Factors that affect the quality of DNA extracted from biological samples stored in paraffin blocks. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 47, n. 5, p. 2011.

SEGALÉS, J. *et al.* Diagnosing infectious diseases using *in situ* hybridization. **Swine Health Prod.**, Ontario, v. 7, n. 3, p. 125-128, 1999.

SOTTO, M. N.; YAMASHIRO-KANASHIRO, E. H.; DA MATTA, V. L. *et al.* Cutaneous leishmaniasis of the New World: diagnostic immunopathology and antigen pathways in skin and mucosa. **Acta Trop.** Amsterdam, v. 46, n. 2, p.121-130, 1989.

TAYLOR, C. R.; Immunoperoxidase techniques: practical and theoretical aspects. **Arch. Pathol. Lab. Med.** v. 102, n. 3, p. 113-121. 1978.

TANNER, M.; GANCBERG, D.; DI LEO, A. *et al.* Chromogenic *in situ* hybridization: a practical alternative for fluorescence *in situ* hybridization to detect HER-2/neu oncogene amplification in archival breast cancer samples. **Am. J. Pathol.** Philadelphia, v. 157, n. 5, p. 1467-1472, 2000.

VASCONCELOS, T.C.B.; MACHADO, L.C.; ABRANTES, T.R., *et al.* Avaliação da confiabilidade entre dois observadores em exame citopatológico e imunocitoquímico de aspirado de medula óssea no diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v.69, n.3, p. 821-824, 2016.

VEGA-LÓPEZ, F. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Curr. Opin. Infect. Dis.** London, v. 16, n. 2, p. 97-101, 2003.

WEIGLE, K. A.; DE DÁVALOS, M.; HEREDIA, P. *et al.* Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Columbia: a comparison of seven methods. **Amer. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 36, n. 3, p. 489-496, 1987.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Control of the Leishmaniasis: Report of a meeting of the WHO Expert Comitee on the Control of Leishmaniasis.** Geneva: World Health Organization, 2010.