

UTILIZAÇÃO DA HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE *IN SITU* PARA DETECÇÃO DE *Pneumocystis jirovecii*

Débora Raysa Teixeira de SOUSA¹

Roberto Moreira da Silva JUNIOR²

João Vicente Braga de SOUZA³.

¹Bolsista PAIC/FAPEAM; ²INPA/CSAS; ³INPA/CSAS

INTRODUÇÃO

A pneumocistose é uma infecção de alto risco de em pacientes imunocomprometidos, principalmente os com HIV/AIDS. É causada pelo fungo *Pneumocystis jirovecii*, um ascomiceto, que tem afinidade pelas vias pulmonares, adere à parede dos pneumócitos e lá desenvolve sua infecção. Este organismo caracteriza-se por não ser cultivável e seu diagnóstico é essencialmente baseado em técnicas histológicas, achados clínicos e imagens radiológicas (Thomas e Limper 2004). Em um estudo realizado por Souza *et al.* (2008), demonstrou-se a importância das doenças fúngicas como causa morte de pacientes com AIDS na FMT-HVD, onde 8% dos óbitos, de um total de 129 apresentaram pneumocistose como causa morte. Avaliações da ferramenta molecular hibridização fluorescente *in situ* (FISH) para detecção e identificação de fungos patogênicos em amostras de pacientes com suspeita de infecções fúngicas precisam ser realizados. Estudos vêm demonstrando um grande potencial deste método como uma importante alternativa de um diagnóstico rápido, sensível e específico (Frickmann *et al.* 2012).

O diagnóstico precoce e o tratamento específico dessas infecções são fundamentais para melhoria do prognóstico dos pacientes, evitando a possibilidade de dispersão hematológica para órgãos mais profundos ou mesmo a mortalidade provocada por estas infecções. Em um estudo recente, FISH foi testada em pacientes hospitalizados com candidoses demonstrando significativa melhora no diagnóstico e tratamento específico para esta infecção. Foi analisado o tempo de identificação, tempo de tratamento com o antifúngico específico, tempo de permanência do paciente no hospital, mortalidade e custo por cada paciente, incluindo diagnóstico e tratamento. Com a implementação de FISH, foi observado que o tempo de identificação levou 4 horas, enquanto que o método convencional necessitou de 4 dias, com tudo isso, houve economia por paciente de 415 dólares e diminuição da mortalidade (Lakner *et al.* 2012).

Este trabalho buscou investigar a acurácia de FISH para detecção e identificação do fungo *Pneumocystis jirovecii* em amostras de blocos parafinados contendo fragmentos pulmonares de pacientes que tiveram pneumocistose como causa morte. Além disso, procurou-se comparar os resultados alcançados por FISH com os obtidos através do método de detecção por meio de técnicas histopatológicas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Estudo de caráter retrospectivo, transversal e descritivo, de avaliação da Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH) para detecção de *Pneumocystis jirovecii* em blocos parafinados contendo fragmentos de pulmão de pacientes com o diagnóstico de HIV/AIDS. Estes pacientes foram necropsiados na FMT-HVD, no período de 1996 a 2013, que tiveram pneumocistose como causa morte e outras complicações pulmonares. Após pesquisas nos documentos de necropsias pertencentes ao setor de Anatomia patológica da FMT-HVD, encontrou-se 13 casos confirmados de pneumocistose como causa morte, e selecionou-se mais 17 casos que

tiveram outras complicações pulmonares como causa de óbito. Após isso foi feita uma busca dos blocos de necropsia dos referidos pacientes e selecionaram-se somente os blocos com fragmentos pulmonares.

Confecção das lâminas: Os blocos foram submetidos a cortes em um micrótomo (MicroTec 4050/USA), objetivando ter cortes, sucessivos, delgados, uniformes e de aproximadamente 5 a 7 micras, após isso fixou-se os cortes em lâminas sinalizadas com polilisina e com as respectivas identificações referentes ao ano e número de necropsia, vale ressaltar que foram confeccionadas 5 lâminas para cada bloco. **Processamento das amostras:** Após todas as laminas prontas, as mesmas foram submetidas à coloração de Gomori Grocott, que é uma técnica de coloração histológica específica para fungos, e nesse caso foi feita com objetivo de confirmar as amostras positivas e negativas que foram selecionadas. **Desparafinização das lâminas:** Antes da reação desta técnica molecular, as lâminas foram desparafinizadas, primeiramente em 2 imersões em xilol com duração de 10 minutos cada . E posteriormente, em imersões nas sequencias de álcool com diferentes concentrações (100%,80% e 70%) durante 10 minutos em cada um, após isso as lâminas foram submetidas a secagem em temperatura ambiente. **Preparo do mix de hibridização:** Em um microtubo, 5 ng de cada oligonucleotídeo (5'GGCTTCATGCCAACAGTCC3') (Frickmann e Poppert 2012) foi adicionado em 10 µl de tampão de hibridização, contendo 20% de formamida. **Reação de FISH:** As lâminas foram incubadas por 90 min a 55 °C. O excesso de sonda foi removido por imersão das lâminas por 30 min em solução de lavagem (5 mM Tris, 15 mM NaCl e 0.1% Triton X-100) a 55° C (Kempf *et al.* 2005), inseriu-se nas lâminas o corante DAPI (4'6'-diamidino-2-fenilindol) que é específico para material genético, corando sempre o núcleo celular, e após isso se retirou o excesso do corante novamente em solução de lavagem, e por fim as lâminas foram secas ao ar em temperatura ambiente e montadas com lamínula.

Leitura: Finalmente, as lâminas montadas foram analisadas com um microscópio DM Leitz RBE (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) equipado com um conjunto de filtros padrão (Amann *et al.* 1990).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 1. Relação da causa morte com os resultados obtidos pelos diferentes métodos de detecção: FISH e a técnica histopatológica para detecção de *Pneumocystis jirovecii*.

CAUSA MORTE	MÉTODOS DE DETECÇÃO			
	FISH		TÉCNICA HISTOPATOLÓGICA	
Pneumocistose (n=13)	Positivo:	13	Positivo:	13
	Negativo:	0	Negativo:	0
	Total:	13	Total:	13
Outras complicações pulmonares (n=17)	Positivo:	10	Positivo:	0
	Negativo:	7	Negativo:	17
	Total:	17	Total:	17

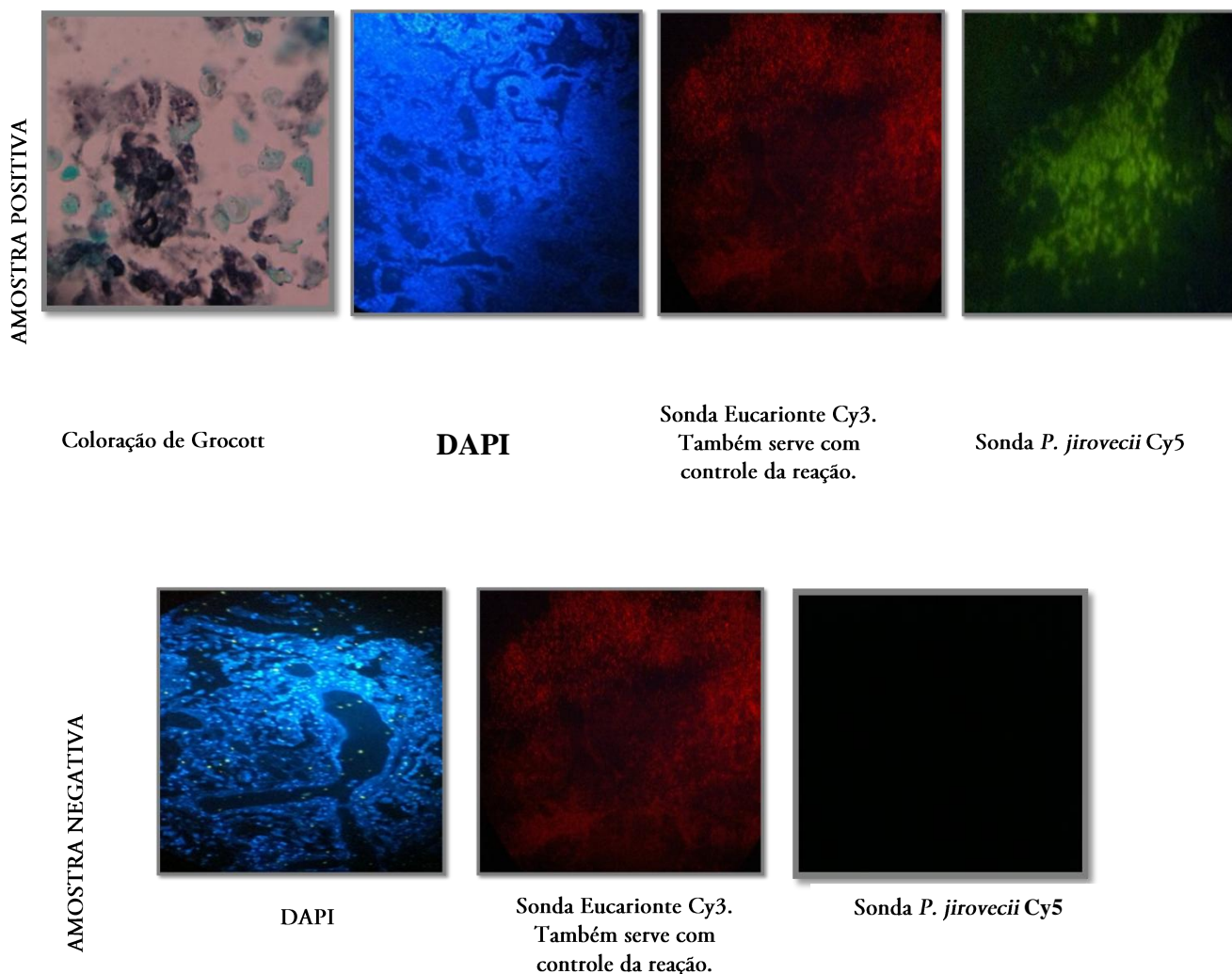


Figura 1. A fileira da amostra positiva representa a utilização da coloração de Grocott, o corante DAPI, a sonda para Eucarionte e a sonda para *P. jirovecii*. Logo abaixo, a fileira da amostra negativa representa o corante DAPI, a sonda Eucarionte, a sonda para *P. jirovecii* e um controle da reação que é uma amostra positiva de *P. jirovecii*.

CONCLUSÃO

A fluorescência de hibridização in situ (FISH) mostrou-se com um bom potencial para identificação do agente *P. jirovecii* de blocos parafinados contendo fragmentos pulmonares, esta técnica apresentou uma satisfatória resposta em relação à detecção quando comparada aos métodos de detecção e identificação do agente usado em rotinas laboratoriais. Dessa forma, este trabalho corrobora outros trabalhos já realizados, em que FISH apresenta uma boa aplicação no diagnóstico de fungos. Deste modo, sugere-se que novos trabalhos sejam feitos com as sondas analisadas, utilizando como amostras, escarros e lavados bronco alveolares (LBA), para validar esta ferramenta para o auxílio no diagnóstico de Pneumocistose. A perspectiva é que FISH se apresente como uma importante opção no diagnóstico desta doença em rotinas laboratoriais por ser sensível, específica, rápida e de baixo custo.

REFERÊNCIAS

- Amann, R.I.; Krumholz, L.; Stahl, D.A. 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J Bacteriol*, 172(2):762-70.
- Frickmann, H.; Lakner, A.; Essig, A.; Poppert, S. 2012. Rapid identification of yeast by fluorescence in situ hybridisation from broth and blood cultures. *Mycoses*, 55(6):521-31. doi:10.1111/j.1439-0507.2012.02214.x.
- Kempf, V.A.; Maendle, T.; Schumacher, U.; Schafer, A.; Autenrieth, I.B. 2005. Rapid detection and identification of pathogens in blood cultures by fluorescence in situ hybridization and flow cytometry. *Int. J. Med. Microbiol*; 295:47-55.
- Lakner, A.; Essig, A.; Frickmann, H.; Poppert, S. 2012. Evaluation of fluorescence in situ hybridisation (FISH) for the identification of *Candida albicans* in comparison with three phenotypic methods. *Mycoses*, 55: e114-23.
- Thomas, C. Jr; Limper, A. 2004. *Pneumocystis pneumonia*. *The New England Journal of Medicine*, 50: 2487-2498.