



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN

“SALVADOR ZUBIRÁN”

DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN INVASORA POR *ASPERGILLUS* Y *MUCORALES*

UTILIDAD DE INMUNOHISTOQUÍMICA EN TEJIDO

TESIS QUE PRESENTA:

DRA. ARIADNA IVETTE BARRIOS ORDOÑEZ

PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN:

ANATOMÍA PATOLÓGICA

ASESOR DE TESIS:

DR. EDGARDO REYES GUTIÉRREZ

ASESOR ADJUNTO:

DR. BRAULIO MARTÍNEZ BENÍTEZ

MÉXICO D.F.

AGOSTO 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por acompañarme todos los días,

A mi esposo Carlos por su infinita paciencia, gracias por compartir mi vida y mis logros,

A mi padre y a mi madre por ser mi fortaleza y por todo el apoyo que me han brindado,

A mis hermanas por su confianza,

A mis tutores y maestros por la enseñanza,

A mis compañeros que formaron parte de esta aventura

y siempre se quedarán en mis recuerdos.

ÍNDICE

| | |
|-----------------------------------|-----------|
| Resumen..... | 4 |
| Abstract..... | 5 |
| Marco teórico..... | 6 |
| Justificación..... | 13 |
| Hipótesis..... | 13 |
| Objetivo principal..... | 13 |
| Objetivos secundarios..... | 13 |
| Material y Métodos..... | 14 |
| Resultados..... | 17 |
| Discusión..... | 30 |
| Conclusiones..... | 33 |
| Bibliografía..... | 34 |

RESUMEN

Objetivo: Determinar la utilidad diagnóstica de anticuerpos monoclonales específicos con inmunohistoquímica en tejido parafinado en infecciones invasoras causadas por *Aspergillus* y *Mucorales*. Se compara con el estudio histopatológico rutinario con histoquímica convencional y el resultado de microbiología.

Método: Se analizaron 32 casos de micosis invasoras, 19 aspergilosis, 11 mucormicosis y dos casos de micosis filamentosa sin clasificar. Se determinó la concordancia diagnóstica inter-observador, de la histoquímica convencional contra el resultado de inmunohistoquímica y el resultado de cultivo.

Resultados: La concordancia inter-observador tuvo índice de Kappa de 0.85, la concordancia del diagnóstico con histoquímica convencional contra la inmunohistoquímica tuvo índice de Kappa de 0.87. La concordancia del resultado de cultivo con la inmunohistoquímica tuvo índice de Kappa de 0.37 tanto para especies de *Aspergillus* como *Mucorales*.

Conclusión: El estudio histopatológico tuvo alta sensibilidad para el diagnóstico en micosis invasoras, pero con especificidad baja, por lo que se requiere del cultivo como estándar de referencia. En nuestra serie, el aplicar inmunohistoquímica no ofreció ventajas para el diagnóstico de infección invasora por *Aspergillus* y *Mucorales*.

ABSTRACT

Objective: Determining diagnostic utility of specific monoclonal antibodies in immunohistochemistry on paraffin tissue invasive infections caused by *Aspergillus* and *Mucorales*, comparing it with routine histopathology with conventional histochemistry and microbiology results.

Method: We analyzed 32 cases of invasive mycoses, 19 aspergillosis, 11 mucormycosis and two cases of filamentous fungal without rating. We determined the inter-observer diagnostic agreement of conventional histochemistry against the results of immunohistochemistry and the culture result.

Results: The interobserver concordance index Kappa was 0.85, the correlation of diagnosis with conventional histochemistry immunohistochemistry against Kappa index was 0.87. The concordance of the results of culture with immunohistochemistry was Kappa index of 0.37 for both *Aspergillus sp* and *Mucorales*.

Conclusion: The histopathological examination had high sensitivity for diagnosis of invasive fungal infection, but low specificity, so the culture is required as a reference standard. In our series, applying immunohistochemistry did not provide benefits for the diagnosis of invasive infection by *Aspergillus* and *Mucorales*.

MARCO TEÓRICO

Epidemiología general de las infecciones invasoras por hongos

En los últimos 20 años las infecciones micóticas han persistido por el incremento en el número de pacientes con inmunosupresión grave.¹ Especialmente en receptores de trasplante de células hematopoyéticas y de órganos sólidos con frecuencia estimada a 12 meses pos-trasplante de 3.4% y 3.1% respectivamente, pero con mortalidad que alcanza 80%.¹⁻³

Otro grupo susceptible son aquellos pacientes con neoplasias hematológicas, principalmente leucemia aguda con frecuencia del 2 al 8% según la profilaxis administrada. En estos enfermos la mortalidad varía del 39-56%. Sin embargo, a pesar de la detección así como el tratamiento temprano la mejoría en la supervivencia alcanza 25%.¹⁻⁵ Las principales especies identificadas en estos enfermos son *Candida* y *Aspergillus* así como *Zygomycetos*, *Criptococcus* y *Fusarium*.¹⁻⁴

Epidemiología en México de las infecciones invasoras por hongos

En México las infecciones micóticas no se consideran enfermedades infecto-contagiosas de reporte obligatorio para la Secretaría de Salud. Situación que genera la falta de cifras fidedignas pertinentes a su frecuencia e incidencia.

Existen algunos artículos limitados a series de casos, provenientes de hospitales en la ciudad de México. Así en la serie informada de 11,737 autopsias realizadas en el Hospital General de México durante 1989-2004, se encontró infección micótica en el sistema nervioso central solamente en 75 autopsias (0.6%).⁶

En nuestro hospital se han informado dos series de micosis sistémicas. La primera comprendió 14 autopsias por mucormicosis durante los años 1961-1981 y posteriormente

se publicó la experiencia en 17 autopsias con aspergilosis generalizada que ocurrieron en un periodo de 15 años.^{7,8}

De igual forma, en el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social, se detectaron 136 casos de micosis sistémicas en el periodo 1996-2006.⁹ Mientras que en el Hospital Regional General Ignacio Zaragoza del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales para los Trabajadores del Estado, se identificaron 45 casos de micosis sistémicas en el periodo 1999-2000.¹⁰

Diagnóstico de las infecciones invasoras por hongos

De manera general, se considera que el diagnóstico de infección por hongos localizada o sistémica es un reto clínico. Este se basa en la suma de diferentes factores de riesgo, pruebas serológicas, estudios de imagen, histopatología y resultado de microbiología.¹ cuadro 1

Actualmente, la Organización Europea de Investigación y Tratamiento del Cáncer/ Grupo Cooperativo de Infecciones Invasoras por Hongos y el Instituto Nacional de Alergia y Grupo de Estudio de las Enfermedades Infecciosas Micóticas (EORTC/MSG) acuerdan que la obtención de tejido para cultivo y el estudio histopatológico corresponden al estándar de oro para el diagnóstico de micosis invasora.¹¹

El diagnóstico de micosis se realiza cuando se observan hifas o levaduras en presencia de daño tisular en el estudio histológico o citológico y cuando el cultivo o hemocultivo de un sitio anatómico estéril resulta positivo proveniente de un paciente con datos clínicos y radiográficos compatibles con infección.^{1, 11-12}

Cuadro 1. Factores de riesgo en infecciones invasoras por hongos

| | | |
|--------------------|-----------------------------|---|
| Factores de riesgo | Características del huésped | Neutropenia \geq a 3 semanas Presencia de catéter venoso central Alimentación parenteral Estancia prolongada en unidad de terapia intensiva |
| | Enfermedad subyacente | Neoplasia Leucemia aguda Síndrome mielodisplásico Diabetes mellitus Infección por citomegalovirus Síndrome de inmunodeficiencia adquirida |
| | Tratamiento inmunosupresor | Corticoesteroides Ciclosporina Antibióticos de amplio espectro Bloqueadores del factor de necrosis tumoral alfa Inmunosupresores de células T Inhibidores de la calcineurina |
| | Trasplante | Células hematopoyéticas Órganos sólidos |

Cultivo microbiológico en el diagnóstico de infecciones por hongos

En las infecciones por hongos la sensibilidad del hemocultivo varía del 50-80% mientras que el cultivo sólido alcanza 90%, pero ambos tienen especificidad del 100%.¹³ Sin embargo, el cultivo sólido resulta positivo solo en 30-50% de los casos y el hemocultivo en <40%.¹⁴⁻¹⁶ Este método tiene la posibilidad de contaminación y requiere de tiempo para el desarrollo del patógeno, que varía según la especie. Estos factores influyen directamente en el tratamiento y se asocian con mal pronóstico.¹⁷

Análisis histopatológico en el diagnóstico de las infecciones por hongos

El estudio histopatológico permite en menor tiempo establecer el diagnóstico, ya que facilita la rápida identificación del agente infeccioso así como la demostración de invasión tisular y el tipo de respuesta inflamatoria. Así, el análisis del tejido ayuda a determinar si un organismo patógeno representa contaminación, colonización o corresponde a verdadera infección.

Al igual que otros métodos diagnósticos, el estudio histopatológico tiene limitaciones tales como la experiencia del patólogo en el área de infecciones, el no contar con tinciones especiales y la falta de correlación con el cultivo de la biopsia. Este último punto es relevante ya que el cultivo se considera como estándar de oro. Sin embargo, la concordancia entre estos dos procedimientos fluctúa entre 20% y 80%.^{14, 17-19}

Morfología histopatológica de las infecciones por hongos

De acuerdo a la morfología del hongo en el tejido se pueden dividir en aquellos que la forma infectante corresponde a levaduras y hongos filamentosos con o sin septos.

La identificación tisular de levaduras incluye las siguientes opciones diagnósticas: *Candida sp*, *Cromomycosis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Phialophora verrucosa*, *Fonsecaea pedrosoi*, *Cladosporium carrionii*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Rhinosporidium seeberi*, *Coccidioides immitis*, *Sporothrix schenckii*, *Penicillium marneffeii* y *Pneumocystis jirovecchii*.^{18, 20}

Mientras que la presencia de hifas con daño tisular incluyen como posibilidades diagnósticas: *Aspergillus sp*, *Mucorales*, *Scedosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Paecilomyces*, *Madurella*, *Cladophialaphora*, *Curvularia* y *Pseudallescheria boydii*.^{17-18, 20}

Para fines de nuestro estudio únicamente se comentan los aspectos morfológicos de las especies evaluadas que corresponden a *Aspergillus* y *Mucorales*.

El diagnóstico de especies de *Aspergillus* (imagen 1) se basa en la identificación histológica de hifas hialinas delgadas, septadas y con ramificación a 45°. En algunas ocasiones se pueden observar conidios, que de acuerdo a su estructura se define la especie. Las especies patógenas para el humano son principalmente *A. fumigatus* (44%), *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. glaucus*, *A. versicolor* y *A. nidulans*.^{1,18,20-21}

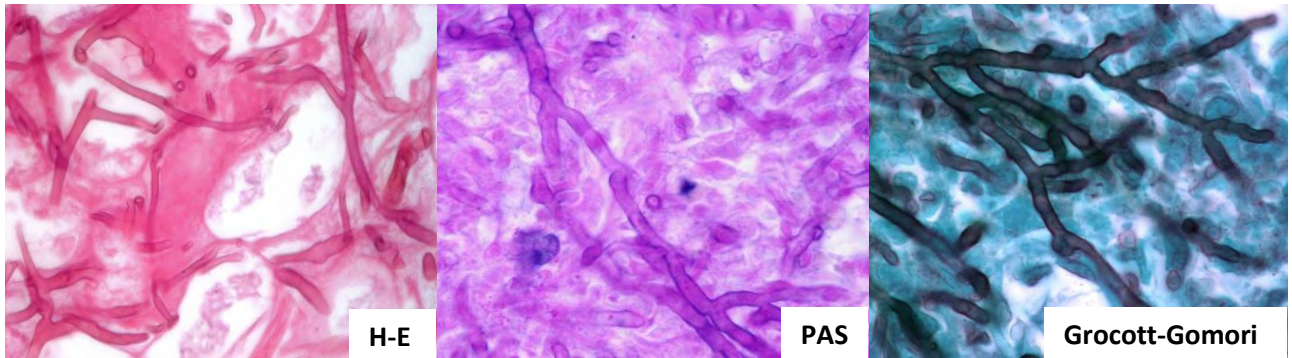


Imagen 1. Micosis invasora. *Aspergillus* sp. Características morfológicas con tinción de H-E e histoquímica convencional.

El diagnóstico histológico de las especies de *Mucorales* (imagen 2) clase de los *Zygomycetos*, se basa en hifas con tamaño que fluctúa entre 5-20 μm , sin pigmento y con contornos irregulares a manera de encaje, pauci-septadas con ángulo de ramificación irregular cercano a 90°. ^{14,18,20} Las familias que causan enfermedad humana son *Rhizopus*, *Mucor*, *Absidia*, *Rhizomucor*, *Apophysomyces*, *Saksenaea*, *Cunninghamella*, *Cokoromyces* y *Syncephalastrum*, de éstas *Rhizopus* sp es la especie más frecuente. ^{19, 22}

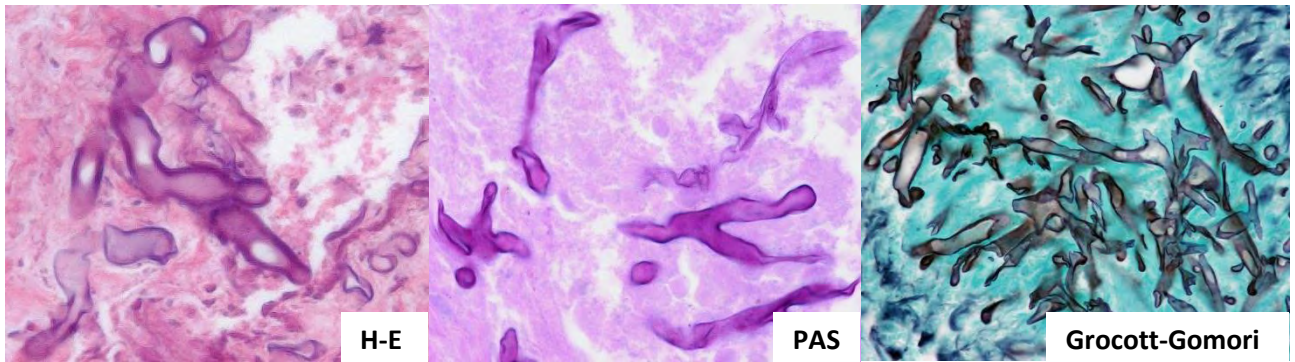


Imagen 2. Micosis invasora. *Mucorales*. Características morfológicas con tinción de H-E e histoquímica convencional.

Errores en el diagnóstico histopatológico en las infecciones por hongos

Los principales errores del diagnóstico de infección micótica en tejido consisten en la falta de reconocer hifas septadas de las no septadas, alteraciones morfológicas del hongo en zonas de necrosis, confundir hifas seccionadas transversalmente como levaduras, la escasez y fragmentación del hongo así como el pretender clasificarlo por género.

Se comentó que varios hongos filamentosos como *Pseudallescheria boydii*, especies de *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucorales* y *Scedosporium* en los tejidos teñidos con hematoxilina-eosina pueden presentar morfología similar. Así en algunas ocasiones las características morfológicas tales como la ramificación de la hifa están ausentes.^{14,17,20}

La histoquímica convencional con ácido peryódico de Schiff (PAS) y plata metenamina de Grocott-Gomori mejora la identificación y clasificación de las infecciones invasoras micóticas, pero no ayudan a distinguir con certeza aspectos morfológicos compartidos entre algunos hongos.¹

Utilidad de la inmunohistoquímica en infecciones por especies de *Aspergillus* y *Mucorales*

En las últimas décadas, el enfoque del diagnóstico histopatológico se ha transformado por el uso rutinario de inmunohistoquímica con anticuerpos monoclonales. Los cuales recientemente se han aplicado en el diagnóstico de enfermedades infecciosas en muestras de tejido. Se ha informado la utilidad con inmunohistoquímica en tejido conservado en parafina contra *Blastomyces*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Coccidioides*, *Pneumocystis*, *Sporothrix*, *Paracoccidioides*, *Penicillium*, *Candida*, *Aspergillus* y *Mucorales*.^{15,18} Sin embargo, algunos de estos anticuerpos son de uso experimental ya que no se encuentran comercialmente disponibles.

Actualmente para el diagnóstico de aspergilosis existe en el mercado el anticuerpo monoclonal anti-*Aspergillus* (clona WF-AF-1) que reacciona contra una fracción de 106 kDa en la pared de *A. fumigatus*. Este anticuerpo aparentemente tiene alta sensibilidad y especificidad para tipificar *A. fumigatus*, *A. flavus* y *A. niger* en tejido fijado en formol conservado en parafina y sin reactividad cruzada con otros hongos filamentosos.^{16,23} También existe la clona EB-AI, que se obtiene de esporas de *A. flavus*, pero con reacción cruzada con *Penicillium marneffeii*.^{12,15,16}

Comercialmente para la identificación de *Zygomycetos* se dispone del anticuerpo monoclonal anti-*Rhizomucor*. Este reacciona con antígenos homólogos de *R. arrhizus* con peso molecular que varían entre 14 y 110 kDa (clona Mab-WSSA-RA-1). Este permite identificar infecciones por hongos de la familia *Mucoraceae*, sin reacción cruzada con otras micosis filamentosas.²⁴

JUSTIFICACIÓN

El diagnóstico histopatológico de infección invasora por hongos en biopsias y piezas quirúrgicas representa un reto. Las tinciones de histoquímica convencional facilitan, pero no permiten distinguir con certeza la especie.

Se analiza la utilidad de anticuerpos monoclonales específicos con inmunohistoquímica contra *Aspergillus* y *Mucorales*. Se compara esta prueba con respecto a la histoquímica convencional (PAS y Grocott-Gomori) y con el resultado del cultivo.

HIPÓTESIS

La aplicación de anticuerpos monoclonales específicos con inmunohistoquímica en tejidos contra especies de *Aspergillus* y *Mucorales* es útil para identificar la especie.

OBJETIVO PRINCIPAL

Determinar la utilidad de anticuerpos monoclonales específicos con inmunohistoquímica convencional en tejido conservado en parafina en infecciones invasoras causadas por *Aspergillus* y *Mucorales*, en comparación con el estudio histológico con técnicas de histoquímica convencional y el cultivo de microbiología.

OBJETIVOS SECUNDARIOS

Determinar la concordancia diagnóstica inter-observador del estudio histopatológico en el diagnóstico de infección micótica invasora.

Evaluar la concordancia de los anticuerpos monoclonales específicos contra especies de *Aspergillus* y *Mucorales* con inmunohistoquímica contra el resultado microbiológico. Analizar la asociación de infección por especies de *Aspergillus* o *Mucorales* con los factores de riesgo tales como enfermedad hematológica, estado neutropénico y angioinvasión.

TIPO DE ESTUDIO

Diseño:

- Estudio retrospectivo, transversal.

Criterios de inclusión:

- Pacientes con diagnóstico histopatológico de micosis invasora por hongos filamentosos a quienes se les realizó biopsia o resección quirúrgica y con resultado microbiológico del cultivo.

Criterios de exclusión:

- Pacientes sin muestra para estudio microbiológico/cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Del Departamento de Patología del INCMNSZ se seleccionaron las biopsias y piezas quirúrgicas con diagnóstico histológico de aspergilosis, mucormicosis/zigomicosis e infección por hongo filamentosos sin especificar durante los años 2006-2010. Del expediente clínico se obtuvo edad, género, órgano afectado, enfermedad principal, presencia o ausencia de neutropenia, tratamiento antifúngico, resultado del cultivo así como la evolución clínica.

Las biopsias y piezas quirúrgicas se procesaron de manera rutinaria para cortes con hematoxilina-eosina fijadas con formol al 10%. Se realizaron cortes adicionales a 5 µm para tinciones de histoquímica convencional con ácido peryódico de Schiff (PAS) y plata metenamina de Grocott-Gomori.

Se realizaron reacción de inmunohistoquímica (IHQ) en cortes de parafina con polímero-HRP y anticuerpos monoclonales primarios de ratón para identificar antígenos específicos contra *Aspergillus sp.* y *Mucorales*. Los anticuerpos utilizados fueron anti-*Aspergillus* monoclonal clona Mab-WF-AF-1 y anti-*Rhizomucor* monoclonal clona Mab-WSSA-RA-1 Dako Corporation, ambos a dilución de 1:50.

La reacción de IHQ se consideró positiva cuando en la pared de la hifa se identificó distribución lineal del cromógeno y/o positividad granular dentro del microorganismo. (imagen 3). En aquellos casos que se realizó la prueba, pero en el bloque de parafina ya no existía tejido evaluable se consideró como no valorable.

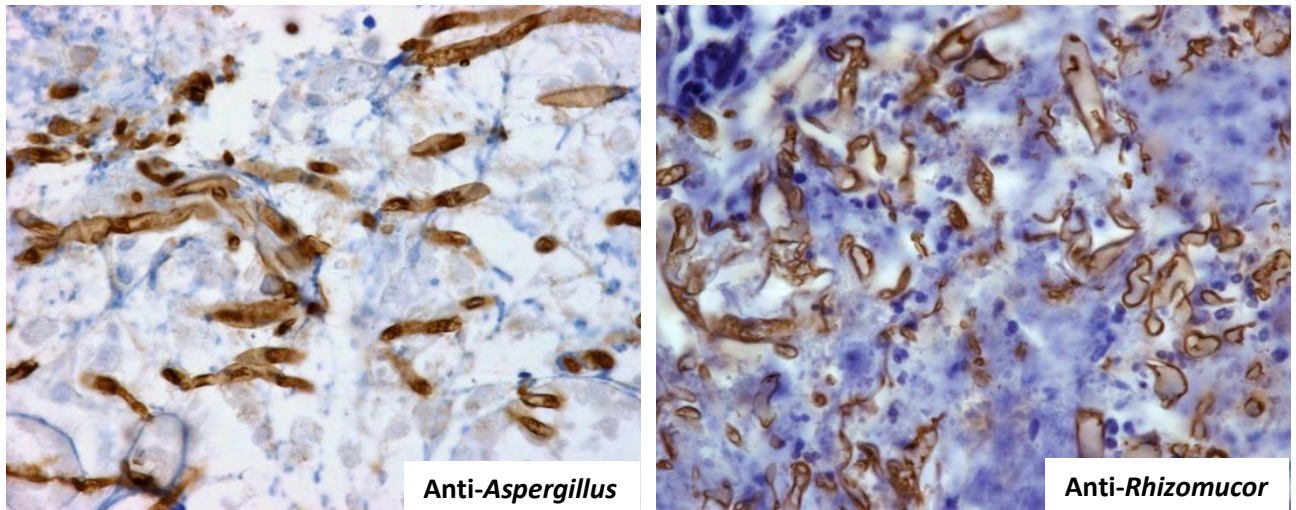


Imagen 3. Micosis invasora. Reacciones de inmunohistoquímica para aspergilosis y mucormicosis.

Las biopsias fueron re-evaluadas por dos patólogos en forma ciega y con tinciones de histoquímica convencional (PAS y Grocott- Gomori). Los parámetros utilizados fueron identificación del órgano, presencia o ausencia del hongo, tipo y grado de respuesta inflamatoria (leve +, moderada ++ e intensa +++) y angioinvasión presente o ausente. Las tinciones de PAS y Grocott-Gomori permitieron determinar el grosor de las hifas, la presencia o ausencia de septos, la estructura del hongo y el ángulo de ramificación de las hifas a 45°, 90° y combinadas.

Las categorías diagnósticas fueron aspergilosis, mucormicosis y micosis filamentosa sin especificar con o sin angioinvasión.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó estadística descriptiva para el análisis de frecuencia respecto al género, edad, órgano y enfermedad de base. El índice Kappa de Cohen se aplicó para la concordancia inter-observador comparando el diagnóstico inicial vs el diagnóstico de la re-revisión. La concordancia del diagnóstico histológico con histoquímica convencional contra el resultado de la evaluación de la IHQ. Así como la concordancia entre el diagnóstico histológico con todos los procedimientos accesorios contra el resultado del cultivo de microbiología.

Para el análisis de la asociación de las variables dicotómicas se utilizó la prueba de χ^2 de Pearson. Se realizaron curvas de Kaplan-Meier para determinar el impacto de los factores de riesgo. La significancia se estableció con valor de $p < 0.05$. El análisis se realizó con software SPSS versión 15.

RESULTADOS

Datos Generales

Se obtuvieron 34 biopsias y piezas quirúrgicas con diagnóstico histológico de aspergilosis, zigomicosis/mucormicosis y hongo filamentosos sin clasificar realizado por varios patólogos durante el periodo 2006-2010.

El total de casos que comprende la serie sumó 32, ya que dos (5.8%) se excluyeron por falta de cultivo. El pulmón fue el órgano más frecuentemente analizado 15/32 (46.8%), cuadro 2.

Cuadro 2. Micosis invasora, distribución por sitio anatómico

| Localización anatómica | Número |
|------------------------------------|--------|
| Pulmón | 15 |
| Cavidad nasal | 13 |
| Otros (piel, yeyuno, cuerda vocal) | 4 |

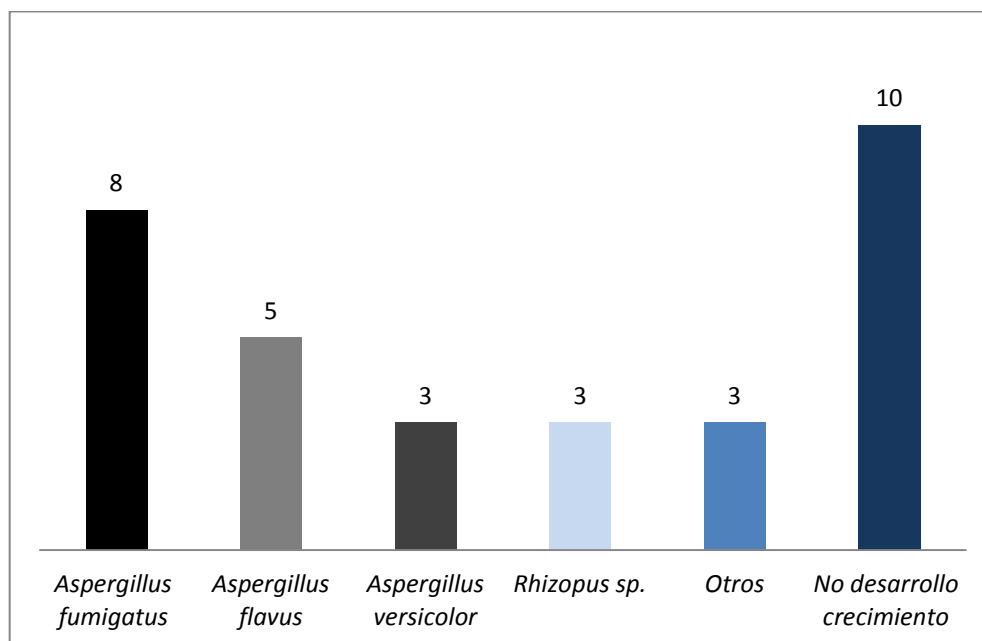
La proporción hombre:mujer fue 1:1, 16 fueron hombres y 16 mujeres. La media de edad fue 37 años (extremos 15 a 64 años). La enfermedad subyacente en 59% (n=19) de los pacientes correspondió a leucemia aguda. La enfermedad principal de los 32 casos se lista en el cuadro 3. En 68.7% (n=22) de los pacientes se encontró neutropenia.

Cuadro 3. Micosis invasora. Distribución de las enfermedades subyacentes

| Enfermedad principal | Número |
|--|--------|
| Leucemia linfoblástica aguda | 14 |
| Leucemia mieloblástica aguda | 5 |
| Anemia aplásica | 5 |
| Diabetes mellitus | 3 |
| Lupus Eritematoso Sistémico | 2 |
| Otros (Linfoma difuso, trasplante órgano sólido, cirugía trans-esfenoidal) | 3 |

Los resultados de microbiología demostraron 22/32 (68.7%) cultivos positivos que correspondieron a *Aspergillus* (n=16), *Rhizopus* (n=3), *Monilia sitophila* (n=1), *Penicillium* (n=1) y *Fusarium solani* (n=1), gráfica 1.

Grafica 1. Micosis invasora. Resultado por especie en cultivo microbiológico



Análisis estadístico

El análisis de concordancia inter-observador se realizó solamente con 30 casos, ya que en dos el diagnóstico del informe inicial correspondió a micosis sin clasificar. El resultado de la concordancia diagnóstica tuvo índice Kappa 0.85 (cuadro 5).

Cuadro 5. Micosis invasoras. Diagnóstico histológico concordancia inter-observador

| | Diagnóstico inicial | Diagnóstico de re-evaluación |
|--------------|---------------------|------------------------------|
| Aspergilosis | 19 | 20 |
| Mucormicosis | 11 | 10 |

La concordancia entre el diagnóstico histológico de la re-revisión con histoquímica convencional en contra del resultado de la inmunohistoquímica se realizó con los 32 casos, la cual demostró índice Kappa 0.87 (cuadro 6). En los casos discrepantes se encontró que en uno, diagnosticado como hongo filamentososo no clasificado, el anticuerpo contra *Aspergillus* fue positivo y el cultivo reveló *Aspergillus fumigatus*. El restante con diagnóstico de mucormicosis, resultó negativo con los anticuerpos contra *Aspergillus* y *Rhizomucor*. Se reconsideró como micosis filamentosa sin clasificar, pero el aislado de microbiología correspondió a *Aspergillus fumigatus* (imagen 4).

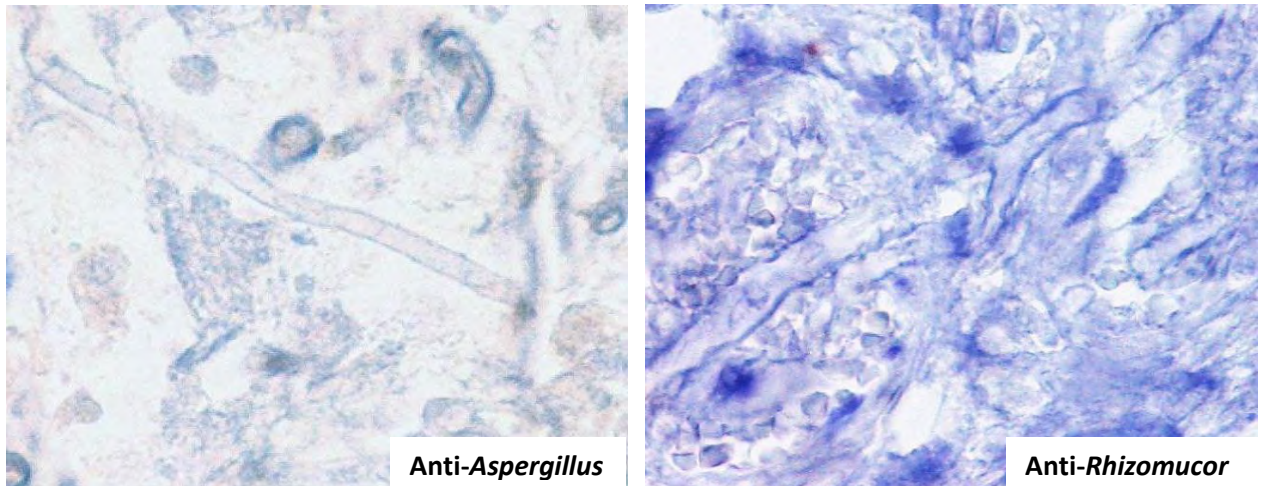


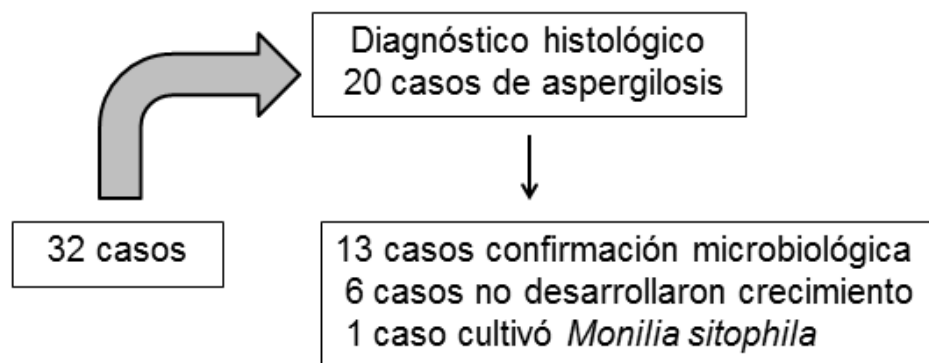
Imagen 4. Micosis invasora. Reacción de inmunohistoquímica falsa-negativa con anticuerpos para *Aspergillus* y *Rhizomucor*. El cultivo de la cuerda vocal aisló *Aspergillus fumigatus*.

Cuadro 6. Micosis invasora. Concordancia diagnóstica entre el diagnóstico histológico con histoquímica convencional contra el resultado de inmunohistoquímica

| Diagnóstico | H-E/PAS/GROCOTT | Inmunohistoquímica |
|------------------------|-----------------|--------------------|
| Aspergilosis | 19 | 20 |
| Mucormicosis | 11 | 10 |
| Micosis no clasificada | 2 | 2 |

La concordancia entre el diagnóstico histopatológico por especie contra el resultado del cultivo demostró índice Kappa 0.37 para *Aspergillus* (cuadro 7).

Cuadro 7. Análisis del diagnóstico histológico de aspergilosis comparado con el informe de microbiología



En 20 biopsias o piezas quirúrgicas con diagnóstico de aspergilosis invasora existió concordancia en 13 (65%). En 6 casos no se aisló el hongo y en el restante se cultivó *Monilia sitophila* (imagen 5 y 6).

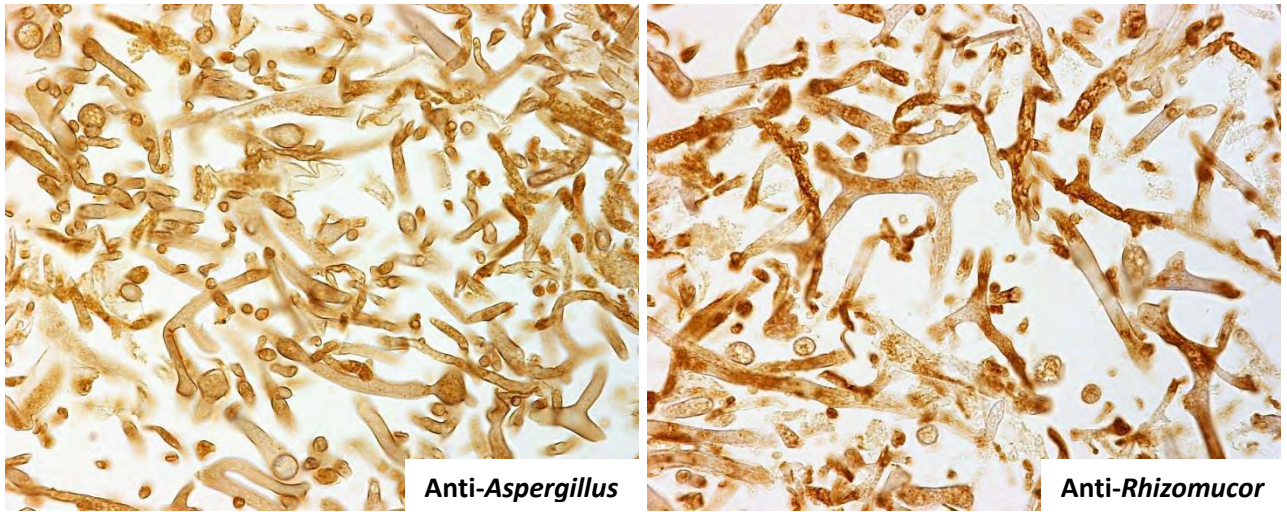


Imagen 5. Micosis invasora. Reacción cruzada con anticuerpos contra *Aspergillus* y *Rhizomucor* en un caso con *Monilia sitophila*.

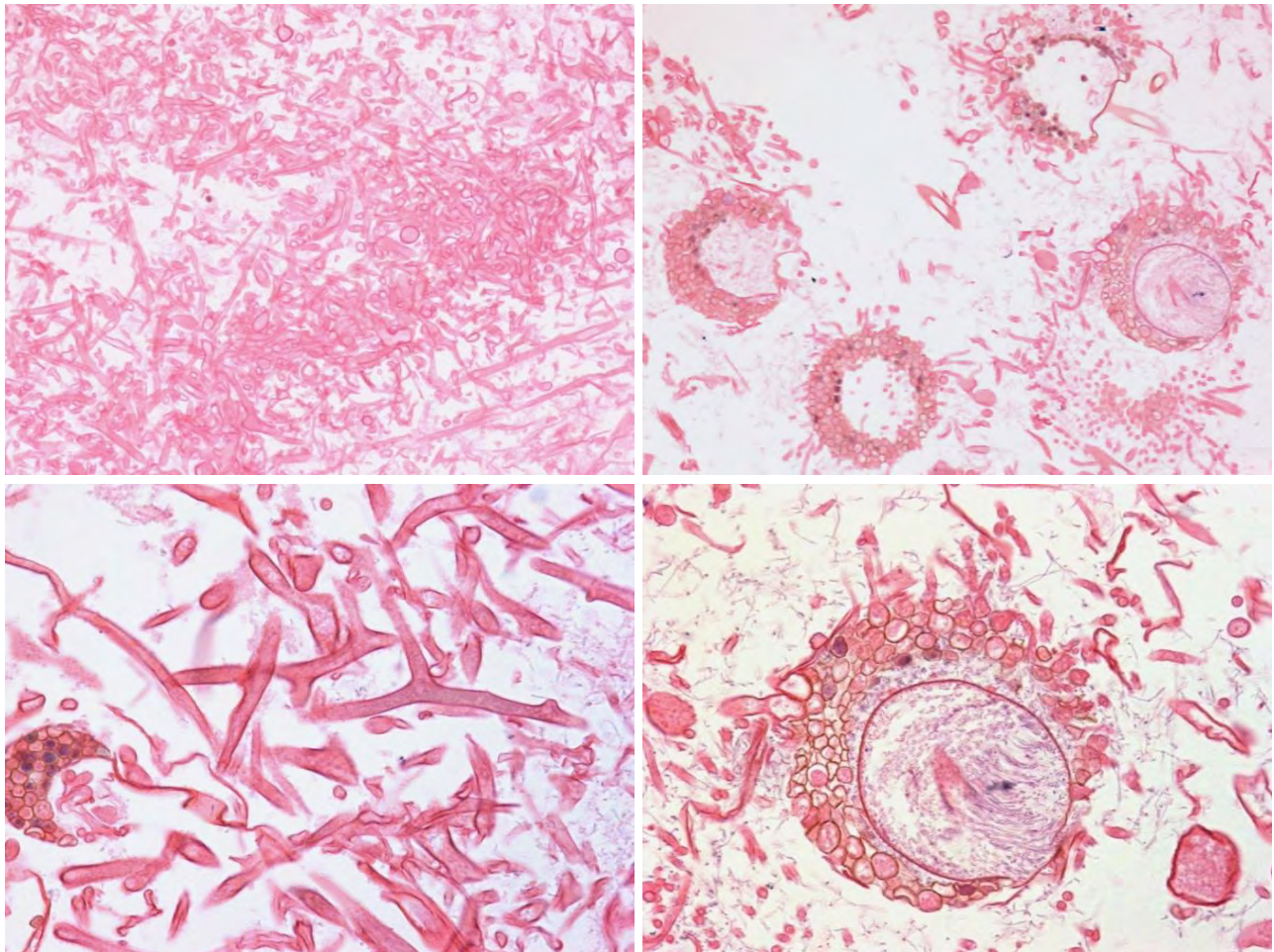
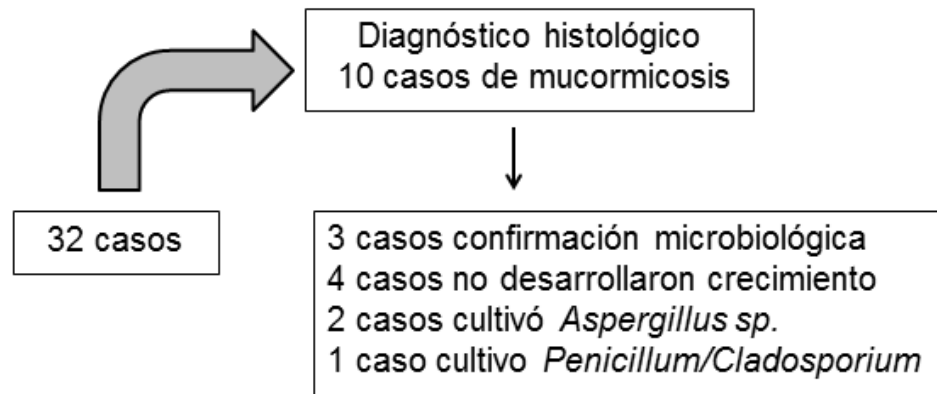


Imagen 6. Micosis invasora. Características morfológicas tisulares de *Monilia sitophila*. Se identifican conidios que semejan infección por aspergilosis.

Se diagnosticaron 10 casos con mucormicosis cuya concordancia con el aislamiento microbiológico mostro índice Kappa 0.37 (cuadro 8).

Cuadro 8. Análisis del diagnóstico histológico de mucormicosis, comparado con el reporte de microbiología.



De tal forma que únicamente se obtuvo comprobación microbiológica en 3/10 (30%). El 40% no desarrollaron crecimiento y en 3 (30%) existió discordancia entre la inmunohistoquímica y el cultivo, ya que este demostró *A. flavus*, *A. fumigatus* y *Penicillium/Cladosporium*, (imagen 7).

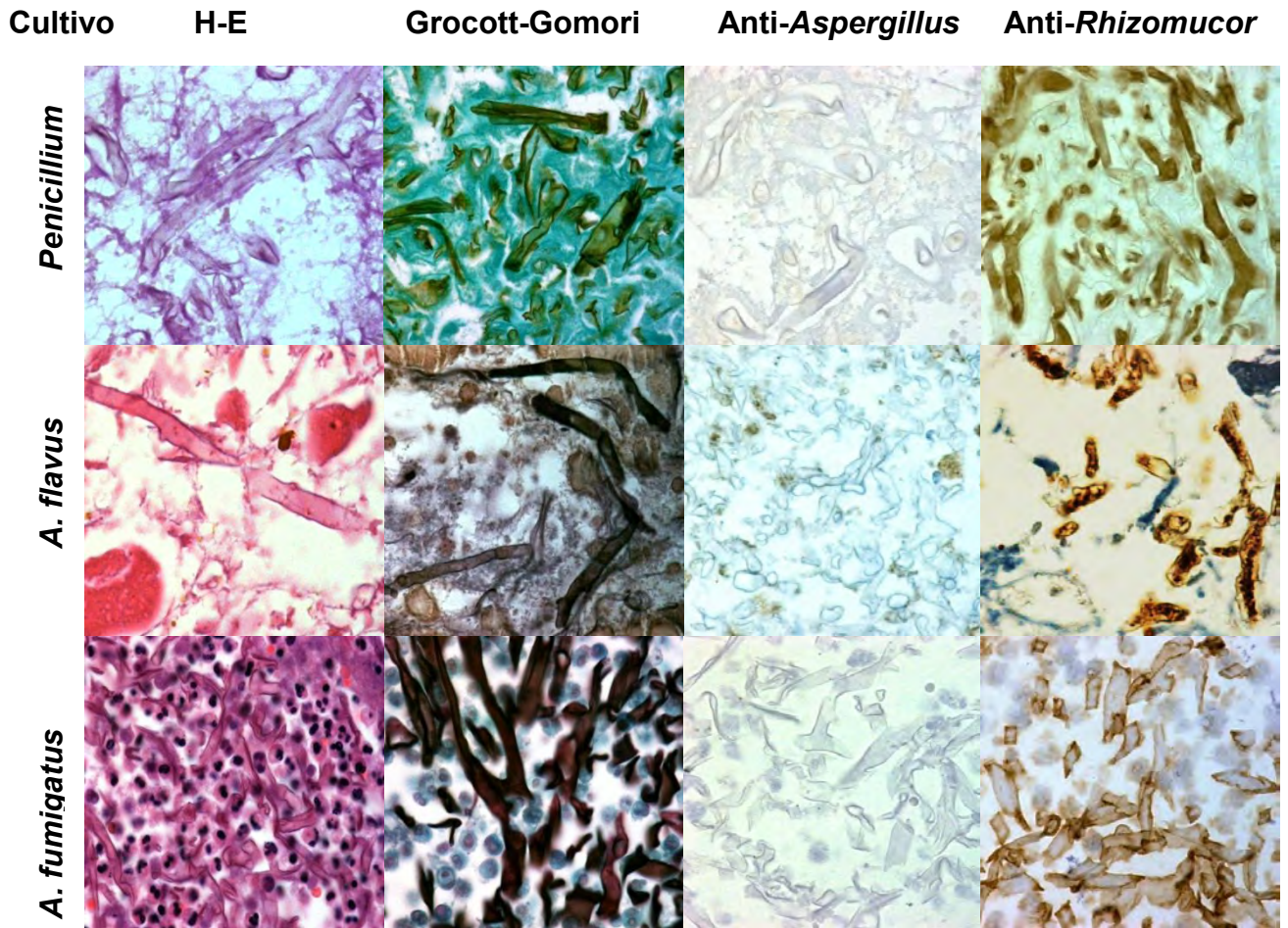


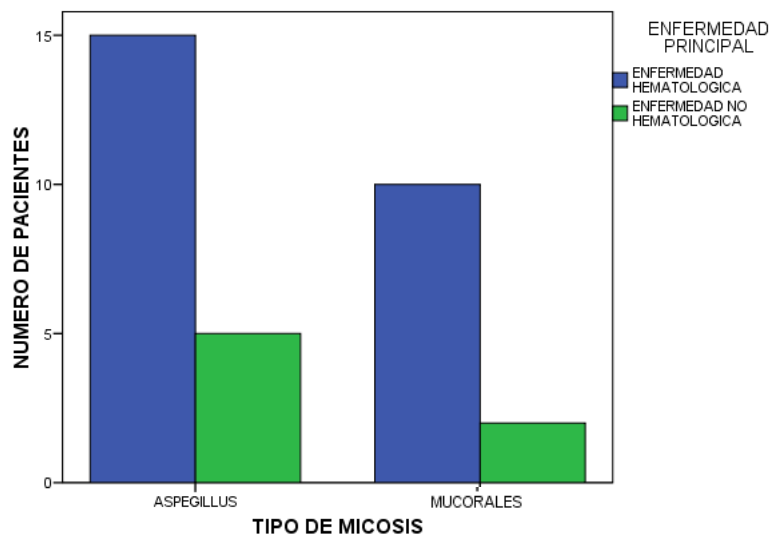
Imagen 7. Micosis invasora. Diagnóstico histopatológico de mucormicosis por reacción falsa-positiva clona Mab-WSSA-RA-1 para *Rhizomucor*. Los cultivos demostraron *Penicillium* y especies de *Aspergillus*.

En el análisis con X^2 para valorar la asociación entre enfermedad hematológica, estado neutropénico e infección angioinvasora por especies de *Aspergillus* o *Mucorales* no se observó diferencia significativa (cuadro 9, gráfica 2).

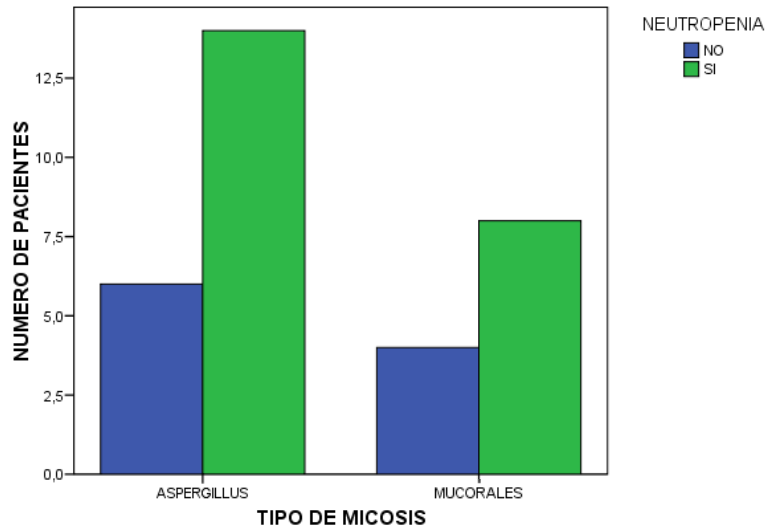
Cuadro 9. Micosis invasora y factores de riesgo. Asociación entre infección por *Aspergillus* y *Mucorales* con enfermedad hematológica, neutropenia y angioinvasión

| Característica evaluada | Aspergilosis | Mucormicosis | n(%) | P |
|----------------------------|--------------|--------------|----------|-------|
| Enfermedad hematológica | 15 (32) | 10 (32) | 25(78.1) | 0.683 |
| Enfermedad no hematológica | 5 (32) | 2 (32) | 7(21.8) | |
| Con neutropenia | 14(32) | 8(32) | 22(68.7) | 1.00 |
| Sin neutropenia | 6(32) | 4(32) | 10(31.2) | |
| Angioinvasión presente | 12(32) | 9(32) | 21(65.6) | 0.465 |
| Angioinvasión ausente | 8(32) | 3(32) | 11(34.4) | |

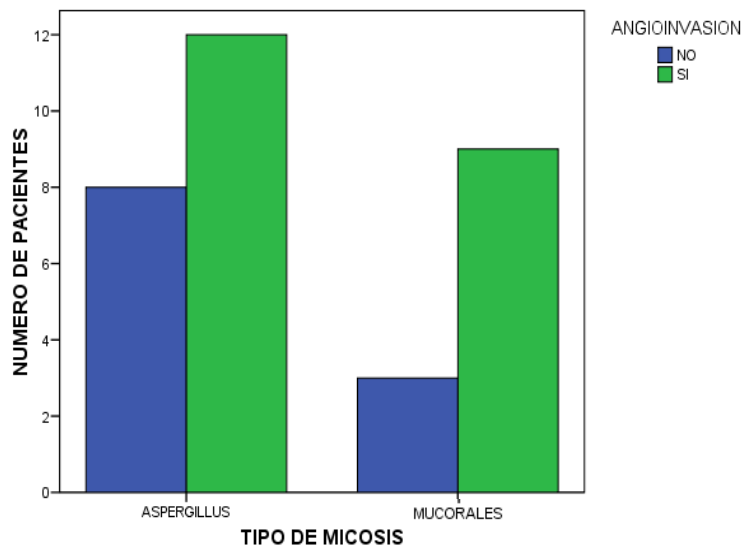
Gráfica 2. Micosis invasora y factores de riesgo.



Prueba χ^2 de Pearson $p = 0.683$



Prueba χ^2 de Pearson $p= 1.00$



Prueba χ^2 de Pearson $p= 0.465$

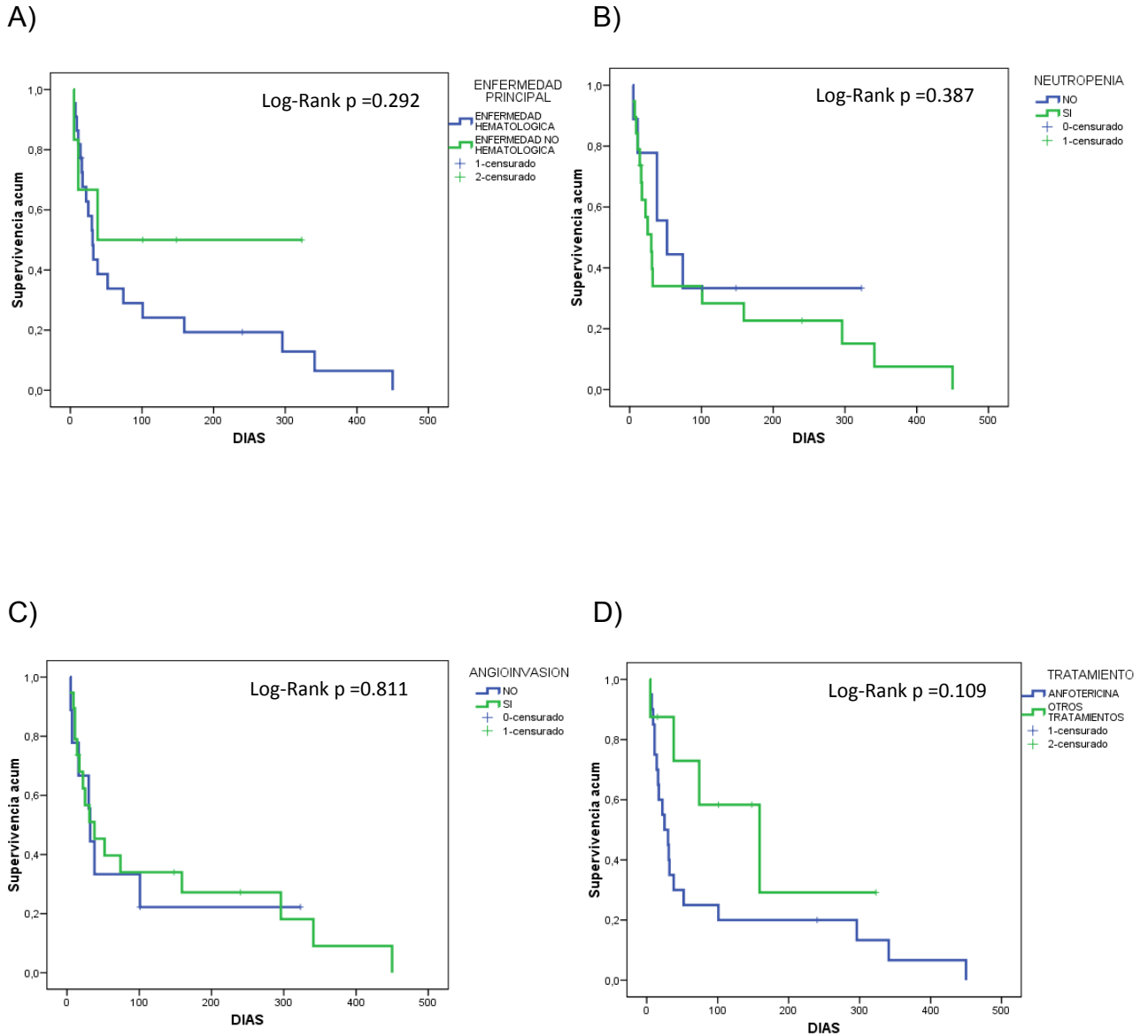
Al evaluar con esta prueba las características morfológicas de hifas septadas y ángulo de ramificación para distinguir entre aspergilosis y mucormicosis, no tuvo diferencias significativas para una especie en particular (cuadro 10).

Cuadro 10. Micosis invasora. Comparación de la morfología del hongo contra el cultivo

| Característica evaluada | Aspergilosis | Mucormicosis | <i>P</i> |
|-------------------------|--------------|--------------|----------|
| Hifas septadas | 5 (22) | 1 (22) | 0.634 |
| Hifas no septadas | 11 (32) | 5 (3) | |
| Dicotomización a 45° | 9(22) | 1(22) | 0.162 |
| Dicotomización >45° | 7(22) | 5(22) | |

El análisis de Kaplan-Meier para determinar la supervivencia por infección invasora por especies de *Aspergillus* y *Mucorales* en asociación con enfermedad hematológica, estado neutropénico, presencia de angioinvasión y tratamiento tampoco mostró resultados significativos (gráfica 3). Los datos analizados del diagnóstico etiológico de los 32 pacientes se resumen en la cuadro 11.

Grafica 3. Micosis invasora. Curvas de sobrevivencia Kaplan-Meier. Correlación entre sobrevivencia acumulada y enfermedad principal subyacente (A), presencia de neutropenia (B), angioinvasión (C) y tratamiento administrado (D).



Cuadro 11. Micosis invasora. Diagnóstico etiológico por cultivo, histopatología e inmunohistoquímica en 32 pacientes

| Núm. paciente | Terapia antifúngica | Órgano | Cultivo | Histopatología | Inmunohistoquímica |
|---------------|---------------------|--------------|-------------------------|----------------|--------------------|
| 1 | + | pulmón | <i>A. fumigatus</i> | Aspergilosis | Aspergilosis |
| 2 | + | pulmón | ND | Aspergilosis | Aspergilosis |
| 3 | + | pulmón | ND | Mucormicosis | Mucormicosis |
| 4 | + | pulmón | ND | Mucormicosis | Mucormicosis |
| 5 | + | cuerda vocal | <i>A. fumigatus</i> | Mucormicosis | SR |
| 6 | + | pulmón | ND | Aspergilosis | Aspergilosis |
| 7 | + | pulmón | ND | Aspergilosis | Aspergilosis |
| 8 | + | pulmón | <i>Penicillium</i> | Mucormicosis | Mucormicosis |
| 9 | + | nasal | <i>Rhizopus</i> sp. | Mucormicosis | Mucormicosis |
| 10 | + | nasal | <i>A. flavus</i> | Aspergilosis | Aspergilosis |
| 11 | + | nasal | <i>Rhizopus</i> sp. | Mucormicosis | Mucormicosis |
| 12 | + | pulmón | <i>A. fumigatus</i> | Mucormicosis | Mucormicosis |
| 13 | + | pulmón | <i>A. flavus</i> | Mucormicosis | Mucormicosis |
| 14 | + | pulmón | <i>A. flavus</i> | Aspergilosis | Aspergilosis |
| 15 | + | nasal | ND | Aspergilosis | Aspergilosis |
| 16 | + | nasal | <i>Moniliasitophila</i> | Aspergilosis | Inespecifica |
| 17 | + | nasal | <i>A. versicolor</i> | Aspergilosis | Aspergilosis |
| 18 | + | nasal | <i>A. flavus</i> | Aspergilosis | Aspergilosis |
| 19 | + | pulmón | ND | Aspergilosis | Aspergilosis |
| 20 | + | nasal | <i>A. versicolor</i> | Aspergilosis | Aspergilosis |
| 21 | + | piel | <i>Rhizopus</i> sp. | Mucormicosis | Mucormicosis |
| 22 | + | nasal | ND | Aspergilosis | Aspergilosis |
| 23 | + | nasal | <i>A. versicolor</i> | Aspergilosis | Aspergilosis |
| 24 | + | nasal | <i>A. fumigatus</i> | Aspergilosis | Aspergilosis |
| 25 | + | pulmón | <i>A. fumigatus</i> | Aspergilosis | Aspergilosis |
| 26 | + | nasal | <i>A. flavus</i> | Aspergilosis | Aspergilosis |
| 27 | + | pulmón | ND | Mucormicosis | Mucormicosis |
| 28 | + | pierna | <i>Fusarium solani</i> | Micosis | SR |
| 29 | + | pulmón | ND | Mucormicosis | Mucormicosis |
| 30 | + | nasal | <i>A. fumigatus</i> | Micosis | Aspergilosis |
| 31 | + | yeyuno | <i>A. fumigatus</i> | Aspergilosis | Aspergilosis |
| 32 | - | pulmón | <i>A. fumigatus</i> | Aspergilosis | Aspergilosis |

ND = no desarrollo. NV = no valorable. SR = sin reacción con los dos anticuerpos

DISCUSIÓN

El diagnóstico de enfermedad infecciosa en biopsia o espécimen quirúrgico, implica al patólogo utilizar diferentes métodos que le ayuden a definir el agente causal, el tratar de definir la especie del microorganismo y correlacionarlo con el tipo de daño tisular.

Respecto a las infecciones por hongos localizadas o sistémicas con y sin angioinvasión, la mayoría se diagnostican histológicamente con tinción de hematoxilina-eosina sola o en combinación con tinciones de Grocott-Gomori y PAS. Sin embargo, la histoquímica convencional no permite identificar infecciones por hongos morfológicamente similares y que potencialmente conlleven diferencias en el tratamiento.

En las dos últimas décadas, la inmunohistoquímica con anticuerpos específicos contra antígenos de hongos y bacterias ha mostrado relevancia como prueba diagnóstica por su mayor sensibilidad y especificidad.¹⁵ Sin embargo, Guarner y Brandt informaron que al utilizar anticuerpos mono o policlonales con inmunohistoquímica en contra de antígenos fúngicos, es requisito estandarizar la prueba por el laboratorio de patología.¹⁸

Esto se debe a que existen varios factores que influyen en los resultados de la inmunohistoquímica. Así, se debe tomar en cuenta la fase preanalítica que implica el tiempo entre la resección quirúrgica y la fijación del tejido, el tipo del fijador utilizado y las dimensiones de la muestra. Aparte de los factores analíticos, que incluyen el procedimiento *per se*, la evaluación pos-analítica es el punto primordial de la prueba.

En los trabajos publicados donde se utilizó inmunohistoquímica en infecciones tisulares por hongos, no se establecen de manera precisa los parámetros de la reacción para interpretarla como positiva o negativa. Jensen en su serie de infecciones micóticas en bovinos, solamente refiere ausencia o presencia del cromógeno en el hongo.²³⁻²⁴ Mientras que Choi en su grupo de aspergilosis en niños, especificó que la reacción puede ser positiva en la pared, septo y citoplasma del hongo.¹⁶

Ante la sospecha clínica de infección invasora por hongos, el diagnóstico se torna en una urgencia. Ante este panorama clínico, el estudio histopatológico se considera superior al estudio microbiológico, principalmente por el menor tiempo que se requiere para emitir el diagnóstico.

En patología infecciosa se conoce que la especificidad del diagnóstico histopatológico es baja. Al respecto, y para mejorar esta situación, el patólogo recurre a métodos complementarios tales como histoquímica convencional, inmunohistoquímica y correlación con el resultado del cultivo. Este último por la frecuencia de resultados falsos-negativos no cumple con los requisitos de estándar de oro, de tal forma que se considera como estándar de referencia.

En el presente estudio, el paso previo a la evaluación de la inmunohistoquímica en infecciones micóticas, consistió en determinar la concordancia inter-observador. Al comparar el diagnóstico realizado con H-E e histoquímica convencional (PAS y Grocott-Gomori) el índice Kappa fue 0.85. Esta alta concordancia diagnóstica nos permitió verificar que en el material seleccionado existía realmente infección por hongos. Mientras que el análisis de concordancia diagnóstica con anticuerpo monoclonal para *Aspergillus sp.* y *Mucorales* resultó con índice Kappa 0.87. Este resultado demuestra que la inmunohistoquímica no tiene beneficios evidentes comparativamente con el procedimiento rutinario.

En nuestra serie, en dos resecciones de pulmón y en una biopsia de cornete nasal con la clona Mab-WF-AF-1 (Dako Co, Carpintería) anti *Aspergillus* se obtuvieron resultados falsos-negativos. En estos casos el diagnóstico con inmunohistoquímica fue micosis no clasificada (n=1) y mucormicosis (n=2) por reacción positiva con la clona Mab-WSSA-RA-1 anti-Rhizomucor (Dako Co, Carpintería). Sin embargo el aislado del cultivo correspondió a *A fumigatus* (n=2) y *A flavus* (n=1). Este resultado al parecer no se ha informado en la literatura ya que se cita que las especies *A. terreus* y *A. nidulans* como las

únicas que son negativas para la clona Mab-WF-AF-1 (Dako Co, Carpinteria) anti *Aspergillus*.²³

Los resultados con la clona Mab-WSSA-RA-1 anti-Rhizomucor no presentó falsos-negativos, ya que la correlación con el cultivo fue del 100%. Sin embargo, con esta clona existieron resultados falsos-positivos, ya que en dos casos de aspergilosis fue positiva (vide supra) y en otro el cultivo del pulmón reveló *Penicillium/Cladosporium*.

En la presente serie en una biopsia de mucosa nasal y con diagnóstico histológico de aspergilosis las dos clonas fueron positivas, pero el cultivo reportó *Monilia sitophila/Chrysonilia sitophila*. Este hongo del género *Neurospora* se consideraba como contaminante, pero se ha identificado como patógeno oportunista en humanos así como causante de asma ocupacional.²⁵

Este resultado discordante por reacción cruzada, cuestiona la especificidad de los anticuerpos monoclonales. Así para este hallazgo no se tiene explicación más aun cuando no existen informes al respecto. A esto se agrega que los casos informados de infección por *Monilia sitophila/Chrysonilia sitophila* son infrecuentes.

En cuanto a las características de los pacientes se observó que todos cursaban con distintas enfermedades que causaron inmunosupresión. Por lo tanto en este tipo de enfermos ante la sospecha clínica de micosis invasora, requieren de un diagnóstico urgente. En este panorama clínico el estudio histopatológico con tinciones convencionales resuelve el problema en la mayoría de los casos en 24 hrs. Así al utilizar inmunohistoquímica para incrementar la especificidad se torna en desventaja al prolongar el período requerido para el diagnóstico y aumentar el costo con escasos beneficios.

A esto se le suma, que antes de utilizar los anticuerpos monoclonales para micosis el laboratorio esta obligado a estandarizar esta reacción.

CONCLUSIONES

En esta serie de 32 casos, la concordancia inter-observador en el diagnóstico de micosis invasoras, en el departamento de Patología del INCMNSZ, fue óptima con índice *Kappa* 0.85.

La aplicación de inmunohistoquímica con anticuerpos monoclonales clona Mab-WF-AF-1 (Dako Co, Carpintería) anti *Aspergillus* y Mab- WSSA-RA-1 anti-Rhizomucor (Dako Co, Carpintería) permitió confirmar el diagnóstico rutinario, pero sin superar la utilidad de la histoquímica convencional. Esto, nos permite afirmar que los anticuerpos monoclonales no se consideran necesarios para el diagnóstico.

La evaluación de los resultados de inmunohistoquímica en comparación con los cultivos fue divergente, ya que en 31% no hubo desarrollo del microorganismo. Esto ratifica que el cultivo no es un estándar de oro. Situación que nos lleva a proponer que ante la posibilidad clínica de infección micótica se recomienda que además de la obtención de muestras para estudio histopatológico se practique cultivo microbiológico.

Las ventajas del estudio histopatológico en las infecciones invasoras por hongos son rapidez en el diagnóstico, identificación del patógeno y de angioinvasión. Sin embargo, en algunos casos el patólogo no logra clasificar la especie y solo se limita a emitir el diagnóstico genérico de infección por hongo filamentoso.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kriengkauykiat J, Ito J, Dadwal S. Epidemiology and treatment approaches in management of invasive fungal infections. *Clinical Epidemiology* 2011;3:175-191.
2. Kontoyiannis DP, Marr KA, Park BJ, et al. Prospective surveillance for invasive fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients, 2001–2006: Overview of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET) Database. *Clin Infect Dis*. 2010;50:1091–1100.
3. Pappas PG, Alexander BD, Andes DR, et al. Invasive fungal infections among organ transplant recipients: Results of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET). *Clin Infect Dis*. 2010;50:1101–1111.
4. Michallet M. and Ito J. Approaches to the management of invasive fungal infections in hematologic malignancy and hematopoietic cell transplantation. *J Clin Oncol* 2009;27:3398-3409.
5. Zaragoza R, Pemán J, Salavert M, et al. Multidisciplinary approach to the treatment of invasive fungal infections in adult patients. Prophylaxis, empirical, preemptive or targeted therapy, which is the best in the different hosts? *Therapeutics and Clinical Risk Management* 2008;4:1261–1280.
6. Lara C, Aguirre D, Chávez L. Micosis en el sistema nervioso central. Estudio clínico-patológico de 75 casos de autopsias efectuadas de 1989 a 2004. *Patología* 2011;49:196-201.
7. Real Mora O, Zamora J, Abud, C. Mucormicosis. Informe de 14 casos. *Rev. invest. clín* 1983;35:237-240.
8. Reyes E, Domínguez G, Acuña R. Infección por *Aspergillus* en el Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán: estudio de 17 casos de autopsia. *Rev. invest. clín* 1985;37:97-102.

9. Méndez L, Ramos J, Manzano P. Micosis sistémicas: experiencia de once años en el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS, México. *Revista Mexicana de Micología*. 2007;25:15-19.
10. Hernández F, Córdova E, Manzano P. Frecuencia de micosis en pacientes inmunosuprimidos de un hospital regional de la Ciudad de México. *Salud Pública Mex*. 2003; 45:455-460.
11. De Pauw B, Walsh T, Donnelly J. Revised Definitions of Invasive Fungal Disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clinical Infectious Diseases* 2008; 46:1813–1821.
12. Verweij P, Meis J. Microbiological diagnosis of invasive fungal infections in transplant recipients. *Transplant Infectious Diseases* 2000;2: 80–87.
13. Wengenack N, Binnicker M. Fungal Molecular Diagnostics. *Clin Chest Med*. 2009;30:391–408.
14. Tarrand J, Lichterfeld M, Warraich I. Diagnosis of invasive septate mold infections: a correlation of microbiological culture and histologic or cytologic examination. *Am J Clin Pathol*. 2003;119:854-858.
15. Eyzaguirre E, Haque A. Application of immunohistochemistry to infections. *Arch Pathol Lab Med*. 2008;132:424-431
16. Choi J, Mauger J, McGowan K. Immunohistochemical detection of *Aspergillus* species in pediatric tissue samples. *Am J Clin Pathol*. 2004;121:18–25.
17. Sangoi A, Rogers W, Longacre T. Challenges and Pitfalls of Morphologic Identification of Fungal Infections in Histologic and Cytologic Specimens. *Am J Clin Pathol* 2009;131:364-375.

18. Guarner J, Brandt M. Histopathologic Diagnosis of Fungal Infections in the 21st Century. Clin Microbiol Rev. 2011;24: 247–280.
19. Schofield C, Murray C, Horvath E. Correlation of culture with histopathology in fungal burn wound colonization and infection. Burns. 2007;33:341-346.
20. Anthony P. A guide to the histological identification of fungi in tissues. J Clin Pathol. 1973;26:828-831.
21. Fenelon L, Hamilton A, Figueroa J. Production of specific monoclonal antibodies to *Aspergillus* species and their use in immunohistochemical identification of aspergillosis. J Clin Microbiol. 1999;37:1221–1223.
22. Ribes J, Vanover-Sams C, Baker D. Zygomycetes in human disease. Clin Microbiol Rev 2000;13:236-301.
23. Jensen H, Aalbaek B, Lind P. Development of murine monoclonal antibodies for the immunohistochemical diagnosis of systemic bovine aspergillosis. J Vet Diag Invest 1996; 8:68-75.
24. Jensen H, Aalbaek B, Lind P. Immunohistochemical diagnosis of systemic bovine Zygomycosis by murine monoclonal antibodies. Vet Pathol. 1996;33:176-183.
25. Francuz B, Yera H, Geraut L. Occupational Asthma Induced by *Chrysonilia sitophila* in a Worker Exposed to Coffee Grounds. Clin Vaccine Immunol. 2010;17:1645-1646.