



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE  
POSGRADO HOSPITAL GENERAL "DR. MANUEL GEA  
GONZÁLEZ" SERVICIO DE DERMATOLOGÍA

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE MUCORMICOSIS E  
IDENTIFICACIÓN DE LOS DISTINTOS AGENTES CAUSALES

## TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN:  
DERMATOLOGÍA

PRESENTA

DRA. GEORGINA RODRÍGUEZ GUTIÉRREZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. RIGOBERTO HERNÁNDEZ CASTRO

DR. RAMÓN FELIPE FERNANDEZ MARTÍNEZ

MÉXICO, D. F. 2013





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

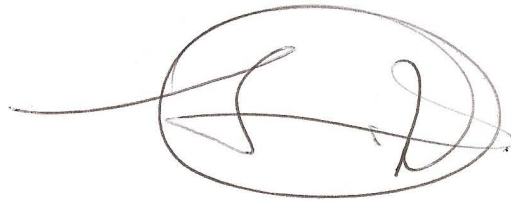
**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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.

Este trabajo fue realizado en la Secretaría de Salud, Hospital General Dr. Manuel Gea González; División de Dermatología: Sección de Micología. En colaboración con el Departamento de Investigación, por la Dra. Georgina Rodríguez Gutiérrez con la dirección y supervisión de el Dr. Ramón Felipe Fernández Martínez, el Dr. Rigoberto Hernández Castro y el Dr. Roberto Arenas Guzmán.

Este trabajo de Tesis con No. PROT 06-77-2012 presentado por el alumno Georgina Rodríguez Gutiérrez se presenta en forma con visto bueno por el Tutor principal de la Tesis Dr. Ramón Felipe Fernández Martínez, y la División de Enseñanza e Investigación a cargo del Dr. Octavio Sierra Martínez con fecha de Julio 2013, para su impresión final.

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized 'S' followed by 'M', enclosed within an oval shape.

Dirección de Enseñanza e Investigación

Dr. Octavio Sierra Martínez

Tutor principal

A handwritten signature in black ink, featuring a stylized 'R' and 'H'.

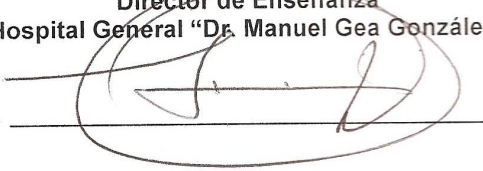
Dr. Rigoberto Hernández Castro

Dr. Ramón Felipe Fernández Martínez

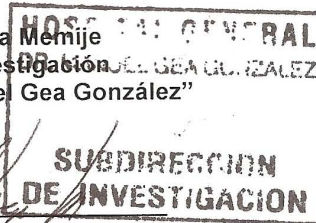
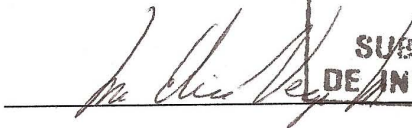
A handwritten signature in black ink, with a large 'R' and 'F' followed by 'M', all enclosed within a large, irregular shape.

Autorizaciones

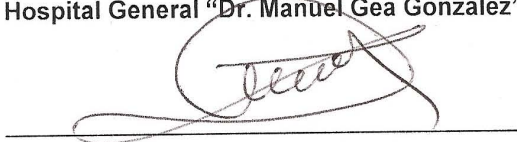
Dr. Octavio Sierra Martínez  
Director de Enseñanza  
Hospital General "Dr. Manuel Gea González"



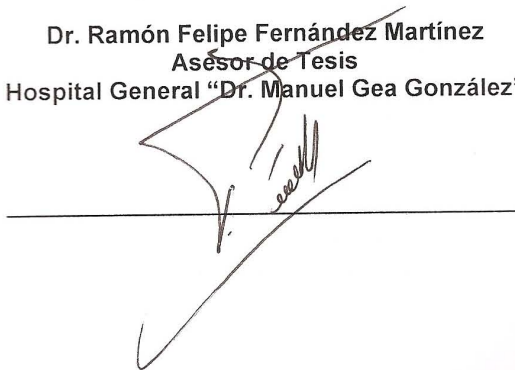
Dra. María Elisa Vega Memije  
Subdirección de Investigación  
Hospital General "Dr. Manuel Gea González"



Dr. Luciano Domínguez Soto  
Jefe de la División de Dermatología  
Hospital General "Dr. Manuel Gea González"



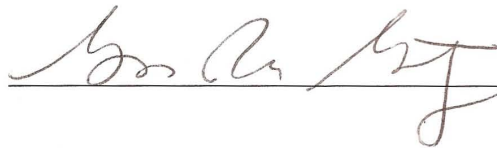
Dr. Ramón Felipe Fernández Martínez  
Asesor de Tesis  
Hospital General "Dr. Manuel Gea González"



DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE MUCORMICOSIS E  
IDENTIFICACIÓN DE LOS DISTINTOS AGENTES CAUSALES

Colaboradores:

Dra. Georgina Rodríguez Gutiérrez



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Georgina Rodríguez Gutiérrez', is written above a horizontal line.

Dr. Roberto Arenas Guzmán



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Roberto Arenas Guzmán', is written above a horizontal line.

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres que han sido un ejemplo de esfuerzo y constancia, quienes me han apoyado siempre y me han dado todo para ser cada día una mejor persona.

A mis hermanos de los que siempre he tenido comprensión, apoyo y grandes momentos.

A Humberto, mi inspiración y mi compañero incondicional. Gracias por tu paciencia y tu amor.

Al Dr. Roberto Arenas por ser un gran maestro y marcar mi camino en estos años de dermatología.

A Patricia, mi compañera eterna, por todos las vivencias, risas y consejos, por ayudarme en todos los momentos y por siempre estar ahí.

A Monica y Rigo sin ustedes, su dedicación y conocimiento esta tesis no sería posible.

A Gise, Cata e Iris, mis amigas y maestras, gracias por la ayuda, las enseñanzas, por compartirme su conocimiento pero sobretodo por su consejo y ánimo cuando lo necesité.

A mis compañeras Marce, Meri, Marikiki, Abril y Nadia con quien compartí risas, éxitos, fracasos y ansiedades en éstos tres años, gracias, hicieron estos años increíbles.

## **ÍNDICE**

|                                    |      |
|------------------------------------|------|
| RELACIÓN DE TABLAS Y FIGURAS ..... | viii |
| RESUMEN.....                       | ix   |
| ABSTRACT.....                      | x    |
| 1. ANTECEDENTES.....               | 1    |
| 2. MARCO DE REFERENCIA.....        | 4    |
| 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 6    |
| 4. JUSTIFICACIÓN.....              | 6    |
| 5. OBJETIVO.....                   | 6    |
| 6. DISEÑO.....                     | 7    |
| 7. MATERIALES Y MÉTODO.....        | 7    |
| 8. RESULTADOS.....                 | 10   |
| 9. DISCUSIÓN.....                  | 15   |
| 10. CONCLUSIONES.....              | 18   |
| 10. REFERENCIAS .....              | 19   |



## RELACIÓN DE TABLAS Y FIGURAS

**Tabla 1:** Lista de muestras de bloques de parafina.

**Tabla 2:** Resultados histopatológicos.

**Tabla 3:** Características demográficas y comorbilidades.

**Figura 1:** Microfotografía 40x de tinción de PAS con elementos fúngicos.

**Figura 2:** Microfotografía 20x de tinción de Gomori-Grocott con elementos fúngicos.

**Figura 3:** Productos de la reacción en cadena de la polimerasa de la amplificación de la subunidad 18S-ITS1-5.8-ITS2-25S de hongos.

**Figura 4:** Representación esquematizada de la región 18S-ITS1-5.8-ITS4-25S rRNA.  
*Syncephalastrum racemosum* cepa CBS 213.

**Figura 5:** Representación esquematizada de la región 18S-ITS1-5.8-ITS4-25S rRNA.  
*Rhizopus oryzae* cepa PCNB1279.

## **RESUMEN**

**Introducción:** La mucormicosis es una infección oportunista y es causante de infecciones mortales en pacientes inmunocomprometidos en sus formas pulmonar, rinocerebral y diseminada. La mucormicosis ha emergido como una infección fúngica importante en los últimos dos décadas y se encuentra asociada a altas tasas de mortalidad. El diagnóstico de las mucormicosis es un reto en la actualidad, requiere de la demostración de las hifas en el tejido o el crecimiento del hongo de la muestra tomada, sin embargo los cultivos son negativos en un alto porcentaje, hasta en un 52% y la morfología de la biopsia no permite diferenciar entre especies de hongos, La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica de genética molecular que permite analizar una secuencia de DNA o RNA en muestras de tejido, en este caso la de los mucorales para tener un diagnóstico preciso.

**Objetivo:** Determinar la positividad para mucorales por reacción en cadena de la polimerasa en bloques de parafina de biopsias de pacientes con diagnóstico clínico de mucormicosis e identificar el género y la especie causal.

**Materiales y métodos:** Se realizó un estudio observacional, descriptivo, abierto y transversal. Se tomaron 14 muestras con sospecha clínica de mucormicosis a las cuales se les realizó extracción de DNA, seguida de amplificación de la subunidad 18S para elementos fúngicos y posteriormente secuenciación para la identificación del género y especie del hongo en cuestión.

**Resultados:** Se incluyeron 14 muestras en total encontrando en 7 de éstas evidencia histopatológica de estructuras fúngicas. De los casos incluidos en el estudio se encontraron 8 exámenes directos positivos donde se observaron hifas cenocíticas y en uno se observaron bacterias grampositivas. Del total de las muestras el 57.14% (8 cultivos) tuvieron un cultivo positivo. En cuanto a los cultivos registrados, se encontraron 5 *Rhizopus sp.*, 1 *Rhizomucor sp.* y 2 *Mucoral sp.* En cuanto a la secuenciación sólo se

lograron identificar mucorales en tres de las muestras (21%), en dos se identificó como agente causal *Rhizopus oryzae* y en otra de las muestras se identificó *Syncephalastrum racemosum*.

**Discusión:** En nuestro medio sigue siendo el estudio micológico, cultivo y examen directo, la mejor opción diagnóstica para pacientes con sospecha clínica de mucormicosis. La biopsia es absolutamente necesaria para complementar el diagnóstico. El diagnóstico molecular para mucormicosis es ahora una opción más en nuestra institución y nos permitirá identificar con certeza y especificidad al agente causal.

### **ABSTRACT**

**Introduction:** Mucormycosis is a severe fungal infection that can lead to death in immunosuppressed patients. It has different clinic presentations like pulmonary, rhinocerebral and disseminated that have fatal consequences. This infection has emerged in the last two decades. Its diagnosis is still challenging, it requires the demonstration of the hyphae in the biopsy or the culture, however cultures are negative in half of the cases and in the biopsy it is impossible to determine the different species of the pathogen. The polymerase chain reaction can analyze a sequence of DNA or RNA in this case of the fungal species to have a more precise diagnosis.

**Objective:** To determine the fungal gender and species from biopsy specimens with clinical diagnosis of mucormycosis.

**Material and Methods:** This essay included 14 biopsy specimens from which DNA was extracted, then we amplified the ribosomal subunit 18S and at last we sequenced to identify gender and species of the fungal pathogen.

**Resultados:** Of the 14 samples, 7 had histopathological evidence of fungal infection, 8 had mycological tests positive for mucormycosis at direct observation with potassium hydroxide, cenocitic hyphae were found. In 8 cases cultures were positive, 5 *Rhizopus*

spp., 1 *Rhizomucor* spp. y 2 *Mucoral* spp. And in molecular identification 3 biopsies where positive, 2 *Rhyzopus oryzae* and one for *Syncephalastrum racemosum*.

**Discusión:** In our medical practice the mycological exam is the first choice for diagnosis of mucormycosis. However the molecular diagnosis is now available for our difficult cases and it will allow us to identify very specifically the pathogen involved in the disease.

## 1. ANTECEDENTES

La mucormicosis es una infección oportunista causada por un hongo saprófito, es la tercera infección fúngica invasora más frecuente después de la candidiasis y aspergilosis.<sup>1</sup> Esta enfermedad es causante de infecciones mortales en pacientes inmunocomprometidos en sus formas pulmonar, rinocerebral y diseminada.<sup>2</sup>

Pertenecen a la clase Glomeromycetes (Zygomycetes), que comprenden el orden Mucorales y Entomophthorales que dan lugar a mucormicosis y entomoftromicosis. Los organismos más comúnmente aislados entre los primeros son *Rhizopus*, *Lichtheimia* (*Absidia*), *Rhizomucor* y *Mucor*, el diagnóstico etiológico de la mucormicosis es difícil y se basa en el cultivo y en las características microscópicas del hongo, producen enfermedades clínicamente indistinguibles. Las enfermedades de base son importantes para la presentación clínica y para el pronóstico de los pacientes con mucormicosis.<sup>3</sup> Se reportó en una serie de 929 casos que la mortalidad en los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y mucormicosis es del 44% y puede ser de hasta 66% en los pacientes con cáncer. El inicio temprano del tratamiento es un factor pronóstico primordial y depende del diagnóstico oportuno de éste padecimiento. Las opciones diagnósticas fuera del examen directo con KOH, negro de clorazol o fluorescencia, en este padecimiento son útiles, sin embargo el cultivo y las tinciones siguen presentando una baja sensibilidad y son tardadas, por lo que las técnicas de diagnóstico molecular prometen ser una mejor herramienta.<sup>4</sup> Los tejidos en parafina representan la única fuente de material biológico en reserva para estudios complementarios en muchos de los casos.<sup>16</sup>

La mucormicosis ha emergido como una infección fúngica importante en los últimos dos décadas y se encuentra asociada a altas tasas de mortalidad. La mayoría de las infecciones en humanos se adquieren por inhalación de las esporangiosporas o por inoculación traumática en la piel.<sup>10</sup> No se conoce la exacta prevalencia e incidencia de esta infección ya que su diagnóstico es un reto.<sup>5</sup>

Se ha notado en los últimos años un incremento en su incidencia, en especial en pacientes con antecedentes de trasplante de médula ósea y células hematopoyéticas.<sup>6</sup> Se piensa que en parte el incremento en su presentación se debe al uso de antifúngicos como las equinocandinas y el voriconazol.<sup>7</sup>

El diagnóstico de la mucormicosis es difícil, ya que no se cuenta con pruebas serológicas y se depende del cultivo y la biopsia siendo ésta última es estándar de oro.<sup>8</sup> El examen directo muestra hifas gruesas no septadas con ramificaciones en ángulo recto. A la histopatología se observa extensas áreas de necrosis e hifas con las mismas características.<sup>1</sup> La morfología de las hifas puede encontrarse alterada en especial si se administró terapia antifúngica antes de la toma de biopsia.<sup>4</sup>

El cultivo, que sólo es positivo en un 50% se utiliza para identificar la especie involucrada y el diagnóstico sigue dependiendo de la observación de las características de la colonia y de la morfología microscópica entre lo que se encuentran la observación de rizoides, columelas, esporangios y esporangiosporas.<sup>8 y 9</sup>

Los factores predisponentes para mucormicosis son neoplasias hematológicas, neutropenia severa y prolongada, diabetes mellitus mal controlada con o sin cetoacidosis, sobrecarga de hierro, trauma mayor, desnutrición, prematurez y uso de drogas intravenosas.<sup>4 y 11</sup>

#### Agente causal

La mucormicosis es causada por un grupo de hongos aeróbicos saprófitos que pertenecen a la clase Zygomycetes del orden Mucorales; los géneros comúnmente encontrados son *Mucor*, *Rhizopus*, *Lichtheimia (Absidia)* y *Rhizomucor*, siendo el más *Rhizopus spp.*<sup>1</sup> Se han encontrado en tierra, materia orgánica en descomposición, frutas, pan y semillas.

Las colonias típicamente aparecen en 24 a 48 horas. La mayoría de los mucorales muestran colonias grisáceas con micelios aéreos. Los zygomycetos muestran colonias gris o amarillas claras, planas, adheridas y con aspecto de cera.<sup>4</sup>

Dentro de sus mecanismos patógenos se encuentra la posibilidad de invadir vasos sanguíneos y diseminarse rápidamente. Se ha reportado que es el receptor GRP78 el probable blanco que utiliza en las células endoteliales para invadir. La expresión de éste receptor aumenta ante concentraciones de glucosa y de hierro elevadas.<sup>5</sup> Este último concepto explica el riesgo de los pacientes con cetoacidosis y con alteraciones hematológicas. Aún no conocemos el mecanismo por el cual los zygomycetes evaden al sistema inmune.

#### Cuadro Clínico

La característica clínica patognomónica de la mucormicosis es la necrosis del tejido secundaria a la angioinvasión y a la trombosis. Presenta 6 formas de presentación clínica según el sitio anatómico que afecte: 1) rinocerebral, 2) pulmonar, 3) cutánea, 4) gastrointestinal, 5) diseminada y 6) otras, las cuales son formas poco usuales como endocarditis, osteomielitis, peritonitis, entre otras.<sup>10 y 13</sup>

Los sitios de invasión más comúnmente reportados son senos paranasales (39%), pulmones (24%) y piel (19%).<sup>12,19 y 20</sup>

La mucormicosis cutánea resulta de la inoculación directa de las esporas en la piel. El cuadro clínico típico es una escara necrótica con la piel perilesional con eritema y edema, sin embargo se han descrito otras formas clínicas como lesiones en tiro al blanco con centros necróticos o simples máculas eritematosas. Puede ser tan extensa que involucre tejidos celular subcutánea y hueso.<sup>1 y 10</sup>

#### Diagnóstico

El diagnóstico de la mucormicosis sigue siendo un reto, ya que no se cuenta con pruebas serológicas y se depende del cultivo y la biopsia siendo ésta última es estándar de oro.<sup>8</sup>

El examen directo muestra hifas gruesas no septadas con en ángulo ramificaciones recto, es un método invaluable en manos expertas. A la histopatología se observa extensas

áreas de necrosis e hifas con las mismas características, gruesas (15 a 20  $\mu\text{m}$ ), aceptadas y con ramificaciones en ángulo recto.<sup>1</sup> La identificación histopatológica de los mucorales en el tejido puede ser difícil y se debe realizar diagnóstico diferencial con *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.* y *Pseudallescheria boydii*. La morfología de las hifas puede encontrarse alterada en especial si se administró terapia antifúngica antes de la toma de biopsia.<sup>4</sup>

El cultivo se utiliza para identificar la especie involucrada y el diagnóstico sigue dependiendo de la observación de las características de la colonia y de la morfología microscópica entre lo que se encuentran la observación de rizoides, columelas, esporangios y esporangiosporas. La mayoría de los zygomycetes son tolerantes al calor por lo que crecen a temperaturas de más de 37°C. La importancia de la identificación del género o especie radica en su valor epidemiológico, terapéutico y para pronóstico del paciente.<sup>1 y 4</sup> Se conoce que *R. oryzae* muestra resistencia *in vitro* al posaconazol mientras que *Mucor circinelloides* es susceptible al mismo. *Cunninghamella* presenta concentraciones mínimas inhibitorias muy altas para la anfotericina B y se ha asociado a mayor mortalidad.<sup>8 y 9</sup>

## Tratamiento

EL tratamiento de la infección se basa en tres pilares: el tratamiento de la enfermedad de base, la terapia antifúngica y la cirugía. La terapia antifúngica más aceptada es la anfotericina B a dosis de 1 a 1.5 mg/kg/día durante 3 a 6 semanas o hasta la remisión de los síntomas. Otra alternativa es el posaconazol el cual muestra actividad *in vitro* frente a *Rhizopus* y *Mucor*. El tratamiento quirúrgico es importante para remover el tejido necrótico y evitar la progresión de la infección.<sup>1</sup>

## 2. MARCO DE REFERENCIA

El diagnóstico de las mucormicosis requiere de la demostración de las hifas en el tejido o el crecimiento del hongo de la muestra tomada, sin embargo los cultivos son negativos en un alto porcentaje, hasta en un 52% y la morfología de la biopsia no permite diferenciar



entre especies de hongos, la identificación del género y especie es importante para los estudios epidemiológicos y para el tratamiento ya que algunos muestran resistencia a antifúngicos.<sup>14</sup> La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica de genética molecular que permite analizar una secuencia de DNA o RNA en muestras de tejido, en este caso la de los mucorales para tener un diagnóstico preciso.

Debido a las dificultades mencionadas anteriormente se han realizado estudios para la identificación molecular de éste patógeno; algunos han utilizado la secuencia del espaciador interno transcrito (*internal transcribed spacer*) a partir de cultivo, y también se ha utilizado la subunidad 18S ribosomal para el diagnóstico de las diferentes especies de *Rhizopus*, *Mucor*, *Rhizomucor* y *Cunninghamella*.<sup>4</sup>

Bialek et al. reportan un estudio con 44 muestras de bloques de parafina que fueron enviados con diagnóstico presuntivo de mucormicosis y aspergilosis en el que 14 muestras fueron positivas para mucorales, 11 para aspergilosis y 3 para ambas micosis utilizando la identificación de la subunidad 18S con la reacción en cadena de la polimerasa. De éstos tejidos estudiados sólo uno era de piel los demás correspondían a tejido de pulmón, sistema nervioso central, hígado y senos paranasales.

Rickerts et al en el 2006, reportan un estudio con 20 muestras de tejido en parafina de pacientes inmunocomprometidos a los que se les realizó secuenciación del DNA fúngico por reacción en cadena de la polimerasa para aspergilosis y mucormicosis, encontrando 10 muestras positivas para aspergilosis y 3 para mucormicosis; de éstas muestras positivas dos habían sido negativas para elementos fúngicos en la biopsia y 3 mostraron un cultivo negativo.

Machouart et al, realizaron la identificación genética de mucorales en dos muestras, una de piel y una de pulmón, realizando una reacción de polimerasa en cadena e identificaron

la especie utilizando enzimas de restricción para encontrar los polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción.

La detección de DNA fúngico de tejidos por PCR ha demostrado ser más sensible que el cultivo en el diagnóstico de infecciones fúngicas profundas como es el caso de aspergilosis, candidiasis y mucormicosis.<sup>14 y 15</sup> Incluso se pueden hacer detección de los agentes infecciosos aunque presenten cultivos negativos.

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

¿Es posible realizar el diagnóstico de mucormicosis utilizando técnicas de biología molecular, como la reacción en cadena de la polimerasa, en bloques de parafina de biopsias de pacientes con sospecha clínica de ésta entidad?

### **4. JUSTIFICACIÓN**

La mucormicosis es una infección fúngica asociada a una alta mortalidad, además se ha observado un incremento en su incidencia en los últimos 20 años.

El diagnóstico de la mucormicosis requiere de la demostración de las hifas en el tejido o el crecimiento del hongo de la muestra tomada, sin embargo los cultivos son negativos en un alto porcentaje (48%) y la morfología de la biopsia permite solo identificar si se trata de un mucoral.<sup>14</sup> El examen directo que es otra forma de identificación es observador dependiente y las tomas de decisiones a partir del diagnóstico son drásticas; por lo que tener la identificación por PCR sería una opción diagnóstica rápida y certera que permitiría ofrecer un mejor tratamiento a éstos pacientes.

### **5. OBJETIVO**

A. Determinar la positividad para mucorales por reacción en cadena de la polimerasa en bloques de parafina de biopsias de pacientes con diagnóstico clínico de mucormicosis.

B. Identificar los tres géneros y especies causales de mucorales en los pacientes con diagnóstico de mucormicosis por secuenciación.

## **6. DISEÑO**

Descriptivo, transversal, abierto, observacional, prospectivo.

## **7. MATERIALES Y MÉTODOS**

### 7.1. Universo de estudio

Se utilizaron 14 bloques de tejido incluidos en parafina obtenidas en los últimos 18 años que fueron enviados al servicio de dermatopatología de pacientes con diagnóstico clínico de mucormicosis.

### 7.2. Tamaño de la muestra.

Muestra a conveniencia: 14 muestras.

### 7.3. Criterios de selección:

#### 7.3.1. Criterios de Inclusión.

Todos los bloques de parafina que se encuentren en el servicio de dermatopatología del Hospital “Dr. Manuel Gea González” que hayan sido enviados con diagnóstico presuntivo de mucormicosis.

#### 7.3.2. Criterios de exclusión.

Bloques con muestra insuficiente.

#### 7.3.3 Criterios de eliminación.

Cantidad de ADN insuficiente para la reacción de polimerasa en cadena.

### 7.4. Definición de variables

Cualquier género de mucoral

### 7.5. Descripción de procedimientos.

Se recolectaron 14 muestras de tejido en bloques de parafinas con diagnóstico clínico de mucormicosis del Hospital General “Dr. Manuel Gea González” de los últimos 18 años.

(Tabla 1.)

Tabla 1. Lista de muestras de bloques de parafina

| No. De muestra | No. De Biopsia | Año  |
|----------------|----------------|------|
| 1.             | BE 463         | 1994 |
| 2.             | BE 381         | 1995 |
| 3.             | BE 661         | 2002 |
| 4.             | BE 1009        | 2003 |
| 5.             | BE 1033        | 2003 |
| 6.             | BE 41          | 2005 |
| 7.             | BE 187         | 2005 |
| 8.             | BE 788         | 2005 |
| 9.             | BE 180         | 2010 |
| 10.            | BE 1040        | 2010 |
| 11.            | BE 1061        | 2010 |
| 12.            | BE 724         | 2013 |
| 13.            | BE 206         | 2013 |
| 14.            | BE 725         | 2013 |

#### Extracción de ADN

Las muestras de parafina fueron colocadas en tubos de 1.5 ml estériles, cada muestra contenía 5 cortes de 5 micras de grosor (25 mg). Posteriormente se agregaron 1.2 ml de xilol y se mezclaron de forma vigorosa. Se centrifugaron a 13 mil rpm por 5 minutos a temperatura ambiente (25°C) y el sobrenadante fue eliminado. La pastilla de tejido fue lavada con etanol al 96% (1.2 ml) para eliminar el xilol, se mezcló suavemente y se centrifugó a 13 mil rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente, este paso fue realizado dos veces. El sobrenadante fue eliminado y el tejido fue colocado a 37°C hasta quedar completamente seco.

El ADN se extrajo utilizando el sistema comercial DNeasy Blood and Tissue de Qiagen (Qiagen, Ventura, CA. USA). Brevemente, al tejido sin parafina y seco se le agregaron 180 ml de solución de lisis ATL y 40 ml de proteinasa K y se incubó a 56°C por 12 horas. Posteriormente se adicionaron 200 ml de la solución AL y 200 ml de etanol al 96% mezclando suavemente, para después colocarla en una columna de afinidad y centrifugar a 8 mil rpm durante 1 minuto. La columna que contiene el ADN fue lavada con la solución AW1 (500 ml) y centrifugada a 8 mil rpm durante 1 minuto, un nuevo lavado fue realizado con la solución AW2 (500 ml) y centrifugada a 13 mil rpm durante 1 minuto. El ADN fue obtenido al colocar 50 ml de agua estéril en la columna y centrifugar a 13 mil

rpm durante 1 minuto. La concentración de ADN fue realizada utilizando un espectrofotómetro a una OD<sub>260/280</sub>, asimismo se analizó pureza e integridad del ADN en un gel de agarosa al 1% teñido de bromuro de etidio. Finalmente el ADN fue almacenado a 4°C hasta su uso.

#### Amplificación de la región 18S-IRS1-5.8S-ITS2-25S

Para la amplificación de la región IRS1-5.8S-ITS2 se utilizaron los iniciadores *ITS1* (5'-TCCGTAGGTGAACCTTGCGG-3') e *ITS4* (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3').<sup>18</sup> La reacción de amplificación contenía 0.5 µmol/L de cada iniciador, 10 µmol/L de dNTP's, 1.5 mmol/L de MgCl<sub>2</sub> y 1× de buffer de PCR y 2 unidades de enzima TAQ polimerasa. Las condiciones de PCR incluían una desnaturalización inicial de 95°C por 5 minutos, posteriormente una desnaturalización de 94°C por 30 segundos, alineamiento de 58°C por 35 segundos, y una extensión a 72°C por 45 segundos por 33 ciclos, finalmente una extensión final a 72°C por 7 min. El producto de amplificación fue visualizado en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. La imagen fue adquirida en un foto documentador.

#### Purificación de productos de PCR

El o los productos de amplificación generados en la reacción en cadena de la polimerasa fueron purificados utilizando el sistema de purificación QIAquick gel extracción de Qiagen. Brevemente, los productos de amplificación fueron colocados en un gel de agarosa al 1% y corrido a 90 volts por 45 minutos. Posteriormente, se cortaron los productos del gel y se colocaron en un tubo de 1.5 ml estéril y se adicionaron 500 µl de solución QC, se incubaron a 56°C por 10 minutos y se pasaron a una columna de afinidad y se centrifugaron a 13 mil rpm por 1 minuto. Posteriormente se adicionaron 500 µl de solución PE y se centrifugo a 13 mil rpm por 1 minuto. El DNA se recuperó agregando 50 microlitros de agua estéril y se centrifugo a 13 mil rpm por 1 min. La concentración de ADN fue realizada con un espectrofotómetro y 100 ng de ADN fueron utilizados para realizar la secuenciación.

#### Secuenciación de los genes

La secuencia de nucleótidos se determinó en ambas direcciones mediante el método Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fourearence-Based Sequencing, utilizando el equipo Perkin Elmer/Applied Biosystems Modelo 3730. Se obtuvo una secuencia consenso y la secuencia completa de nucleótidos se sometió a la base de datos del GenBank del National Center for Biotechnology Information para buscar homologías mediante el sistema nucleotide Blast. Los porcentajes de identidad entre las secuencias permitieron la identificación de genero y especie.

## 8. RESULTADOS

Se incluyeron 14 muestras en total encontrando en 7 de éstas evidencia histopatológica de estructuras fúngicas, tanto en tinciones con hematoxilina y eosina como con tinciones especiales para hongos como Gomori-Grocott y PAS, las estructuras fúngicas observadas se caracterizan por ser hifas cenocíticas gruesas con ramificaciones (Figura 1).

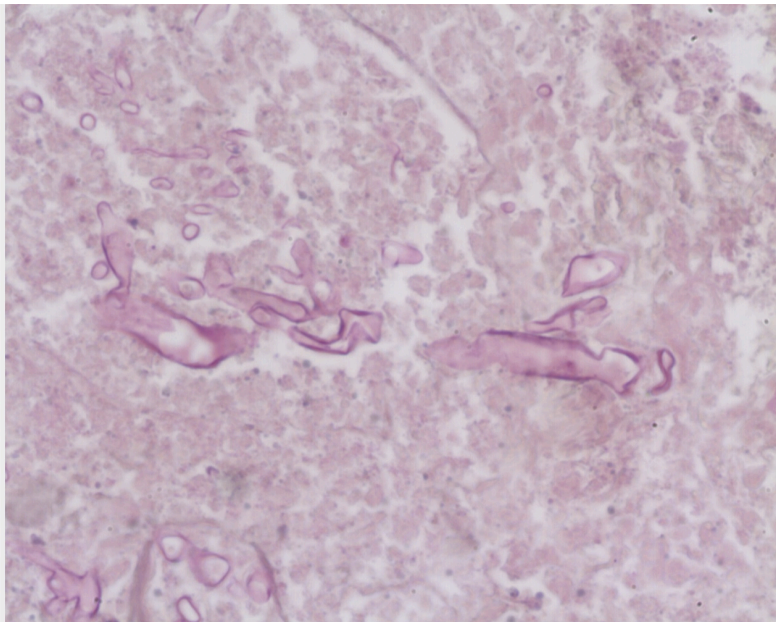


Figura 1. (PAS 40x) Se observan hifas cenocíticas y con ramificaciones.

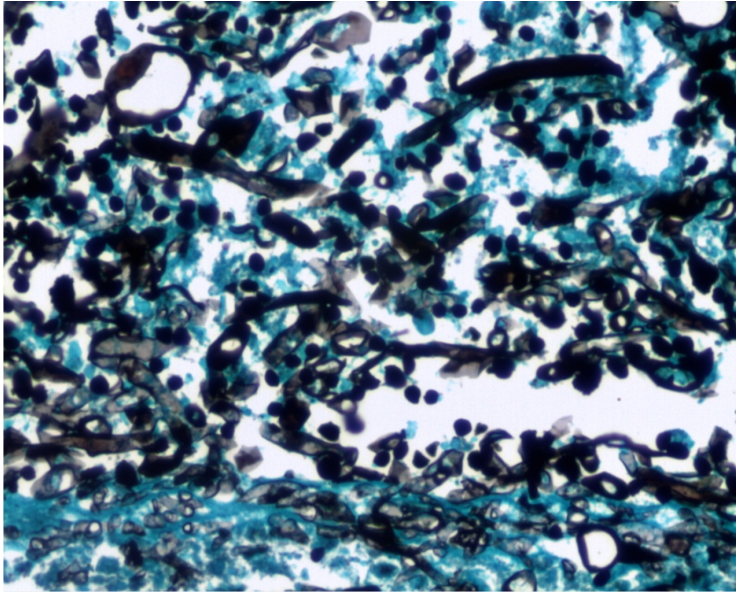


Figura 2. (Gomori-Grocott 20x) Se observan hifas cenocíticas y con ramificaciones teñidas de negro.

En cuanto al patrón histológico, el más frecuentemente encontrado, en 4 de las muestras es el de úlcera cutánea con infiltrado mixto y necrosis, sin embargo también se observa en una de las muestras una dermatitis granulomatosa y supurativa y una paniculitis septal y lobulillar con infiltrado mixto, cabe mencionar que en éstas biopsias no se evidenciaron estructuras fúngicas.

Asimismo se encontraron también biopsias de otros tejidos, no sólo piel, como músculo, hueso, pulmón, conjuntiva ocular y epitelio respiratorio, todos éstos últimos con necrosis e infiltrado inflamatorio mixto. El resumen de éstos resultados se encuentra en la tabla 2.

Tabla 2. Resultados histopatológicos

|    | Biopsia    | Estructuras fúngicas | Histopatología                                       |
|----|------------|----------------------|--|
| 1. | BE 463-94  | Si                   | Úlcera cutánea con infiltrado mixto                  |
| 2. | BE 381-95  | Si                   | Úlcera cutánea con infiltrado mixto con necrosis     |
| 3. | BE 661-02  | No                   | Úlcera cutánea con infiltrado mixto y fibrosis       |
| 4. | BE 1009-03 | No                   | Paniculitis septal y lobulillar con infiltrado mixto |
| 5. | BE 1033-03 | No                   | Dermatitis granulomatosa y supurativa                |
| 6. | BE 187-05  | No                   | Úlcera cutánea con infiltrado mixto y necrosis       |

|     |            |    |   |
|-----|------------|----|---|
| 7   | BE 41-05   | No | Epitelio ciliado con necrosis e inflamación aguda leve                  |
| 8.  | BE 788-05  | Si | Tejido necrótico con plasma y detritus celulares                        |
| 9.  | BE 180-10  | Si | Tejido pulmonar con necrosis e infiltrado inflamatorio mixto            |
| 10. | BE 1040-10 | SI | Músculo estriado con necrosis e hifas cenocíticas                       |
| 11. | BE 1061-10 | No | Músculo estriado con necrosis e infiltrado inflamatorio mixto           |
| 12. | BE 724-13  | No | Epitelio respiratorio con necrosis                                      |
| 13. | BE 725-13  | SI | Tejido óseo con necrosis e infiltrado inflamatorio mixto                |
| 14. | BE 206-13  | Si | Tejido ocular con necrosis e Infiltrado inflamatorio perivascular mixto |

De los casos incluidos en el estudio se encontraron 8 exámenes directos positivos donde se observaron hifas cenocíticas y en uno se observaron bacterias grampositivas. Del total de las muestras el 57.14% (8 cultivos) tuvieron un cultivo positivo. En cuanto a los cultivos registrados, se encontraron 5 *Rhizopus* spp., 1 *Rhizomucor* spp. y 2 *Mucoral* spp. En una de las muestras (180-10) se obtuvo también cultivo de *Aspergillus* spp.

En cuanto al diagnóstico molecular a partir de las muestras de parafina y después de realizar la obtención del ADN y la amplificación de la región 18S utilizando iniciadores universales para hongos, se lograron identificar 8 muestras positivas. (Figura 3). Dentro de las muestras analizadas algunas presentaron más de una banda ya que es probable que en éstas muestras coexistieran múltiples hongos ya sea propios del tejido o de los bloques de parafina.



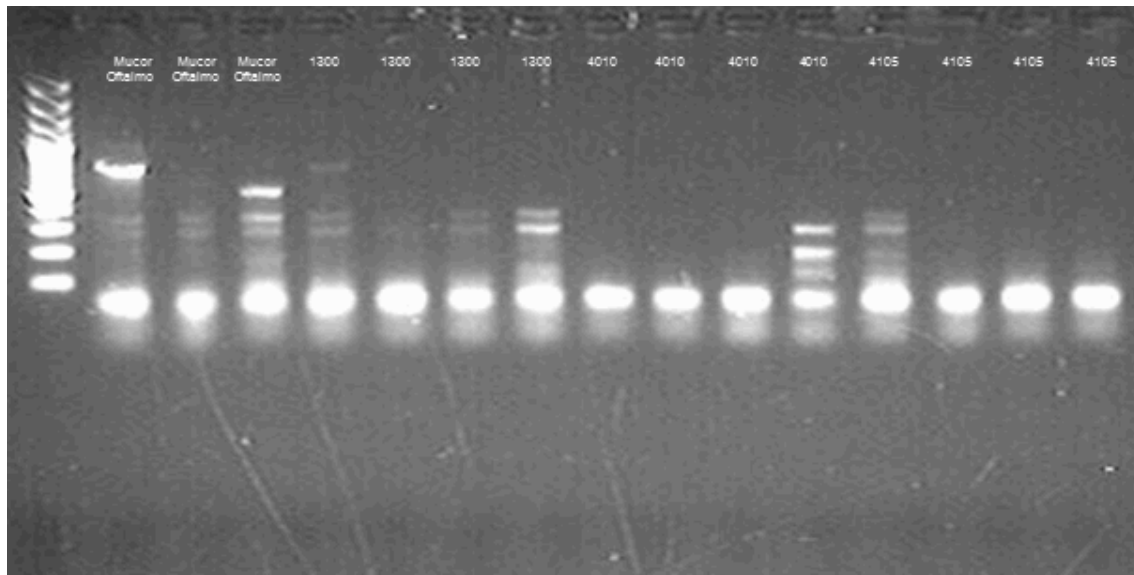
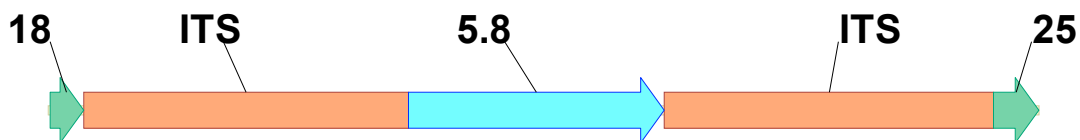


Figura 3. Productos de la reacción en cadena de la polimerasa de la amplificación de la subunidad 18S-ITS1-5.8-ITS2-25S de muestras de ADN obtenidas de bloques de parafina.

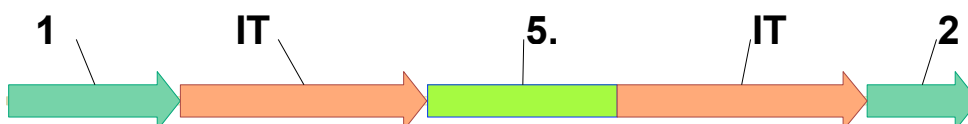
En cuanto a la secuenciación sólo se lograron identificar mucorales en tres de las muestras (21%), en dos se identificó como agente causal *Rhizopus oryzae* y en otra de las muestras se identificó *Syncephalastrum racemosum*; siendo el primero algo esperado ya que es el mucoral más comúnmente aislado en mucormicosis mucocutánea y encontrando con sorpresa el último mencionado ya que es un mucoral que raramente causa infecciones en los humanos, ésta última muestra correspondía a tejido pulmonar y las dos otras positivas una era de hueso de la órbita y la otra de epitelio respiratorio. En las siguientes imágenes se encuentran las representaciones esquemáticas de las secuencias encontradas. Figuras 4 y 5.



## S. racemosum

595

Figura 4. Representación esquematizada de la región 18S-ITS1-5.8-ITS4-25S rRNA. *Syncephalastrum racemosum* cepa CBS 213. Los iniciadores utilizados para amplificar la región se encuentran localizados en la zona inicial (18S) y en la zona terminal (25S).



## R. oryzae

807

Figura 5. Representación esquematizada de la región 18S-ITS1-5.8-ITS4-25S rRNA. *Rhizopus oryzae* CEPA PCNB1279. Los iniciadores utilizados para amplificar la región se encuentran localizados en la zona inicial (18S) y en la zona terminal (25S).

Finalmente se realizó una revisión de expedientes para registrar las comorbilidades de los pacientes con ésta infección y algunas de sus características demográficas. De esto cabe mencionar que la comorbilidad mas comúnmente reportada fue diabetes mellitus tipo 2 en 5 de los pacientes y en 2 diabetes mellitus tipo 1, otras enfermedades encontradas fueron linfoma no Hodgkin, sepsis abdominal, pancreatitis, VIH, alcoholismo y un paciente inmunocompetente sano que adquirió la infección micótica tras un accidente con maquinaria pesada. Todos los pacientes con diabetes mellitus se encontraban con descontrol metabólico. La edad promedio es de los

casos estudiados es de 48 años con una máxima de 78 y una edad mínima de 24 años. Predomina el género masculino con 11 de los 14 casos siendo el 78.5%. Tabla 3.

Tabla 3. Características demográficas y comorbilidades

| <b>Biopsia</b>    | <b>Edad</b> | <b>Sexo</b> | <b>Comorbilidades</b>     | <b>Fallecimiento</b> |
|-------------------|-------------|-------------|---------------------------|----------------------|
| <b>BE 463-94</b>  | 24          | M           | DM1 y cetoacidosis        | No                   |
| <b>BE 381-95</b>  | 32          | F           | Sepsis abdominal          | No hay datos         |
| <b>BE 661-02</b>  | 36          | M           | VIH                       | No hay datos         |
| <b>BE 1009-03</b> | 70          | M           | DM2, descontrol glucémico | No hay datos         |
| <b>BE 1033-03</b> | 70          | M           | DM2, descontrol glucémico | No hay datos         |
| <b>BE 187-05</b>  | 71          | M           | DM2, descontrol glucémico | No hay datos         |
| <b>BE 41-05</b>   | 78          | M           | DM2, cetoacidosis         | Si                   |
| <b>BE 180-10</b>  | 36          | F           | Linfoma No Hodgkin cel T  | SI                   |
| <b>BE 1040-10</b> | 25          | M           | Sano                      | No                   |
| <b>BE 1061-10</b> | 25          | M           | Sano                      | No                   |
| <b>BE 724-13</b>  | 74          | F           | DM2, descontrol glucémico | No                   |
| <b>BE 725-13</b>  | 71          | M           | No hay datos              | No hay datos         |
| <b>BE 206-13</b>  | 34          | M           | Pancreatitis              | No                   |
| <b>BE 788-05</b>  | 52          | F           | No hay datos              | No hay datos         |

## 9. DISCUSIÓN

La importancia de éste trabajo radica en que la mucormicosis es una infección grave con alta mortalidad y cuyo diagnóstico en la práctica clínica continúa siendo un reto.

Para la baja prevalencia de la enfermedad el estudio realizado es equiparable a los encontrados en la literatura en cuanto al número de muestras analizadas. El estudio similar más grande presenta 40 muestras y en el que le sigue en tamaño 21, sin

embargo éstos dos trabajos incluyen muestras con diagnóstico presuntivo tanto de mucormicosis como de aspergilosis. Cabe resaltar que en nuestro trabajo los 14 muestras tenían diagnóstico inicial de mucormicosis.

En éste ensayo sólo se lograron identificar tres muestras positivas para mucorales, lo que corresponde al 21.4%, si bien hay más positividad en cultivos y examen directo éstos también sólo fueron positivos en el 57.1%, lo que sigue dejando un porcentaje importante sin diagnóstico etiológico ya que la histopatología aunque positiva en el 50% de las muestras, sólo permite identificar elementos fúngicos pero no establecer género ni especie de los mismos.

Los resultados de la obtención y amplificación del ADN de la secuencia de la región ribosomal para elementos fúngicos parecían más alentadoras, ya que resultaron positivas en 8 muestras, lo que corresponde al 57% , sin embargo al purificar el DNA y enviarlo a secuenciar no se obtuvieron los mismos resultados, esto podría deberse en parte a que los iniciadores utilizados no son específicos para mucorales y en realidad son altamente sensibles para elementos fúngicos en general. En 7 de las muestras se obtuvieron secuencias similares a *Cladosporium* siendo éste un hongo negro que es posible que se encontrara en la parafina de los bloques pero no en los tejidos.

Una situación importante es la calidad y cantidad del ADN obtenido es importante para la secuenciación, éste estudio se realizó con muy poco tejido y se encontraba embebido en parafina lo que disminuye la calidad del material genético del mismo.

Las muestras que resultaron positivas para los mucorales tienen algunas características que vale la pena destacar, dos de ellas eran muestras de éste año, es decir recientes y la muestra del año 2010 en la que se encontró el *Syncephalastrum racemosum* a pesar de no ser tan reciente tenía una cantidad importante de hifas en el estudio histopatológico, lo que nos lleva a concluir que si las muestras para identificación por biología molecular son recientes o si se tiene adecuada cantidad de ésta se aumentan las posibilidades de la identificación del hongo.

El hallazgo de dos muestras positivas para *Rhizopus oryzae* era esperable ya que es el género más comúnmente encontrado en las mucormicosis, sin embargo encontrar una infección pulmonar por *Syncephalastrum racemosum* resultó sorprendente ya que existen muy pocos casos en la literatura reportados. Haciendo un análisis de la literatura se encontró que en nuestra institución se ha reportado el aislamiento de *Syncephalastrum spp.* en un estudio de aislamiento aereomicológico de la sala de terapia intensiva<sup>21</sup> donde estuvo internada la paciente en cuestión.

## 10. CONCLUSIONES

1. En nuestro medio sigue siendo el estudio micológico, cultivo y examen directo, la mejor opción diagnóstica para pacientes con sospecha clínica de mucormicosis.
2. La biopsia es absolutamente necesaria para complementar el diagnóstico.
3. El diagnóstico molecular para mucormicosis es ahora una opción más en nuestro medio y nos permitirá identificar con certeza y especificidad el agente causal de la enfermedad para la mejor toma de decisiones.
4. Los hallazgos de *Rhizopus oryzae* son compatibles con los de la literatura mundial ya que es el género más frecuentemente implicado en la mucormicosis.
5. Este es el primer reporte de identificación molecular de *Syncephalastrum racemosum* en una muestra clínica en nuestro país.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Tapia EO, Chaín AC y Caral FC. Mucormicosis cutánea primaria: a propósito de dos casos. Revisión de la literatura. Rev Chil Infect 2011; 28: 269-273.
2. Wlasko T, Bloom B, Kontoyiannis D. Meeting the challenges of an emerging pathogen: The Henry Schueler 41&9 foundation International Forum on Mucormycosis. Clin Infect Dis. 2012;54 Suppl 1:S1-4.
3. Eucker J, Sezer O, Graf B, Possinger K. Mucormycoses. Mycoses. 2001;44(7-8):253-60.
4. Roden MM, Zaoutis TE, Buchanan WL, et al. Epidemiology and outcome of Mucormycosis: a review of 929 reported cases. Clin. Infect. Dis. 2005; 41 (5): 634–53.
5. Kontoyiannis DP, Lewis RE, Lortholary O, et al. Future Directions in Mucormycosis Research. Clin Infect Dis. 2012;54 Suppl 1:S1-4.
6. Neofytos D, Horn D, Anaissie E, et al. Epidemiology and outcome of invasive fungal infection in adult hematopoietic stem cell transplant recipients: analysis of Multicenter Prospective Antifungal Therapy (PATH) Alliance registry. Clin Infect Dis 2009; 48:265-73.
7. Kontoyiannis DP, Lionakis MS, Lewis RE, et al. Zygomycosis in a tertiary-care cancer center in the era of Aspergillus-active antifungal therapy: a case-control observational study of 27 recent cases. J Infect Dis 2005; 191:1350-60.
8. Kwon-Chung KJ. Taxonomy of fungi causing mucormycosis and entomophthoromycosis (zygomycosis) and nomenclature of the disease: molecular mycological perspectives. Clin Infect Dis 2011;54:S8-15.
9. Gomez MZ, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Mucormycosis caused by unusual mucormycetes, non-*Rhizopus*, *-Mucor*, and *-Lichtheimia* species. Clin Microbiol Rev 2011; 24:411-45.
10. Petrikos G, Sidaka A, Lortholary O, et al. Epidemiology and clinical manifestations of Mucormycosis. Clin Infect Dis. 2012;54 Suppl 1:S1-4.

11. Spellberg B, Edwards J jr, Ibrahim A. Novel perspectives on mucormycosis: pathophysiology, presentation, and management. *CLin Microbiol Rev* 2005; 18:556-69.
12. Torres-Narbona M, Guinea J, Martinez-Alarcon J, et al. Impact of mucormycosis on microbiology overload: a survey study in Spain. *J CLin Microbiol* 2007; 45:2051-3.
13. Lanternier F, Dannaoui E, Morizot G. A global analysis of Mucromycosis in France: The RetroZygo Study (2005-2007). *Clin Infect Dis* 2012; 54 (suppl 1).
14. Rickerts V, Just-Nübling G, Konrad F, et al. Diagnosis of invasive aspergillosis and mucromycosis in immunocompromised patients by seminested PCR assay of tissue samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2006; 25:8-13.
15. Bialek R, Konrad F, Kern J, et al. PCR based identification and discrimination of agents of mucormycosis and aspergillosis in paraffin wax embedded tissue. *J clin Pathol* 2005; 58: 1180-1184.
16. Muñoz-Cadavid C, Rudd S, Zaki S, et al. Improving Molecular Detection of Fungal DNA in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded tissues: Comparison of Five Tissue DNA Extraction Methods Using Panfungal PCR. *J. Clin microbial.* 2010; 48:2147-2153
17. Machouart M, Larché J, Burton K, et al. PCR-Restriction Fragment Length Opportunistic Mucorales by Genetic Identification of the Main Polymorphism. *J. Clin. Microbiol.* 2006, 44(3):805.
18. Korabecná M, Liska V, Fajfrlík K. Primers ITS1, ITS2 and ITS4 detect the intraspecies variability in the internal transcribed spacers and 5.8S rRNA gene region in clinical isolates of fungi. *Folia Microbiol (Praha)*. 2003;48(2):233-8.
19. Ameen M, Arenas R, Martinez-Luna E, Reyes M, Zacarias R. The emergence of mucormycosis as an important opportunistic fungal infection: five cases presenting to a tertiary referral center for mycology. *Int J Dermatol.* 2007 Apr;46(4):380-4.



20. Pérez-Uribe A, Molina de Soschin D, Arenas R, Reyes M. [Primary cutaneous mucormycosis. Report of a case in a HIV patient. *Rev Iberoam Micol.* 2005 Jun;22(2):118-21.
21. Ríos-Yuil JM, Arenas R, Fernández R, Calderón-Ezquerro M, Rodríguez-Badillo R. Aeromycological study at the intensive care unit of the "Dr. Manuel Gea Gonzalez" General Hospital. *Braz J Infect Dis.* 2012 Sep-Oct;16(5):432-5.