

ROL DE LA ANATOMÍA PATOLÓGICA EN EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS, EL PLUS DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR

DR. LUIS CONTRERAS M.
LABORATORIO ANATOMÍA PATOLÓGICA.
CLÍNICA LAS CONDES.

RESUMEN

El estudio de Enfermedades Infecciosas en muestras derivadas al Laboratorio de Anatomía Patológica incluye variadas técnicas. Aunque la mayor parte de los agentes infecciosos o sus efectos son demostrados en tinciones de rutina, es en ocasiones necesario efectuar técnicas especiales (Histoquímicas e Inmunohistoquímicas) para su correcto diagnóstico. Las técnicas de Biología Molecular aplicadas a estas muestras nos entregan el plus de una correcta tipificación y subtipificación de agentes infecciosos y permiten la detección de microorganismos de difícil cultivo o que no son cultivables aún. Además de la investigación de la relación entre agentes infecciosos y otros procesos patológicos.

SUMMARY

The study of Infectious diseases in samples derived to the Pathology laboratory includes various techniques. Although most of the infectious agents or its effects can be demonstrated in routine stains, sometimes it is necessary to perform special techniques (Histochemical and Immunohistochemical) for its correct diagnosis. The Molecular Biology techniques applied to these samples give us the "plus" of a correct classification of infectious agents, allowing us to detect microorganisms of difficult culture or not cultured yet. Besides the investigation of the relationship between infectious agents and other pathologic processes.

INTRODUCCIÓN

La Anatomía Patológica es la especialidad médica encargada del estudio de las enfermedades. Tanto en sus aspectos etiológicos, patogé-

nicos, como en las alteraciones estructurales provocadas por los diferentes agentes etiológicos, y su interacción con las respuestas tisulares generales y específicas que ellos provocan.

El presente artículo pretende efectuar una revisión general a través de casos clínicos del estado actual del diagnóstico de enfermedades infecciosas en material de anatomía patológica (1, 2, 3, 4).

Dos de los grupos de enfermedades más frecuentes están asociados con agentes infecciosos (reacciones inflamatorias y neoplasias). El anatomopatólogo juega un rol importante en el diagnóstico o exclusión de enfermedades infecciosas, rol que cobra mayor importancia con la aparición de nuevos cuadros o reaparición de antiguas enfermedades de este tipo.

El diagnóstico de enfermedades complejas entre las cuales están las enfermedades infecciosas requiere esfuerzos colaborativos entre clínicos, radiólogos y patólogos.

Las enfermedades infecciosas están presentes en todo tipo de material a estudiar por el patólogo (muestras citológicas e histológicas). La caracterización cuidadosa de una reacción inflamatoria proporciona claves acerca del agente infeccioso involucrado y guía la solicitud de tinciones especiales. Un infiltrado linfoplasmocitario habitualmente es inespecífico, sin embargo la presencia de folículos linfoides en mucosa gástrica sugiere infección por *Helicobacter pylori* y la presencia de ellos en espacios porta hepáticos sugiere un cuadro clínico compatible Hepatitis C. La inflamación crónica granulomatosa con necrosis caseosa está asociada con TBC. Aunque los estudios Cito e Histopatológicos con frecuencia permiten la identificación de agentes patógenos (bacterias, hongos, parásitos y virus) incluso en tinciones de rutina como Papani-

ARTÍCULO RECIBIDO: 27-08-07

ARTÍCULO APROBADO PARA PUBLICACIÓN: 24-09-07

colaou o Hematoxilina y Eosina, en variadas condiciones es necesario efectuar tinciones especiales para demostrar los agentes infecciosos presentes en la muestra, siendo las más utilizadas aquellas señaladas en Tabla 1.

TABLA 1. TÉCNICAS UTILIZADAS EN CORTES HISTOLÓGICOS CON MAYOR FRECUENCIA PARA EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS

Tinción Histoquímica	Agente demostrado
Zielh Neelsen	Micobacterias
Grocott	Hongos
PAS	Hongos, parásitos (amebas)
Gram	Mayoría de las Bacterias
Whartin Starry	Bacterias (espiroquetas, bartonella, etc)
Giemsa	Campilobacterias (H. Pylori, etc) Parásitos (Tripanosoma)
Mucicarmin	Criptococo
Inmunohistoquímica (Anticuerpos)	Todas las clases de microorganismos
Sondas de ADN (PCR e Hibridación "in situ")	Todas las clases de microorganismos

A continuación se muestran dos ejemplos de diagnóstico histopatológico de cuadros infecciosos.

Caso 1: Mostrado en microfotografía 1, corresponde a una mujer de 28 años de edad con síndrome diarreico de meses de evolución. Su estudio endoscópico alto no mostró alteraciones patológicas significativas. En ellas se demuestra infestación por parásitos de tipo Giardia Lamblia.

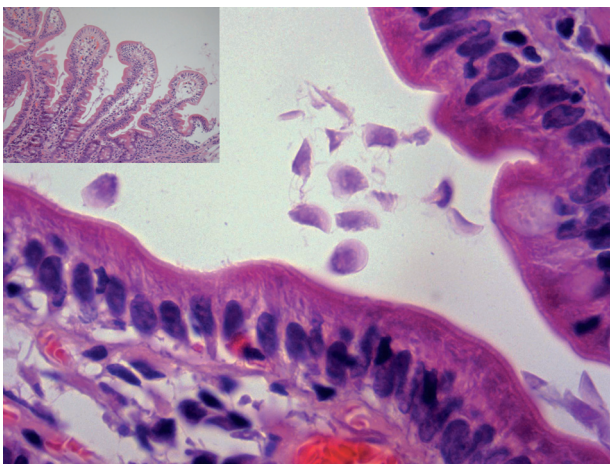


Figura 1

Caso 2: Mostrado en microfotografías 2 y 3 corresponde a mujer de 24 años de edad con historia tratamiento esterooidal por Sarcoidosis, quien comienza con síndrome febril y molestias digestivas vagas. Se efectuó colonoscopia que demuestra lesiones ulceradas aisladas. Las tinciones demuestran presencia de hongos de tipo Paracoccidioidomycosis brasiliensis. La paciente al ser reinterrogada relata viaje a Brasil un par de años atrás. Este caso ilustra la importancia del estudio de rutina en el diagnóstico de enfermedades infecciosas, corresponde a una micosis adquirida en el extranjero y diagnosticada en nuestro país. Lo cual pone de relieve otro aspecto importante en el diagnóstico de estas enfermedades, ya que la facilidad de traslado entre un país y otro, a pesar de tener condiciones ambientales diferentes puede condicionar la aparición y difícil diagnóstico de casos que habitualmente no se presentan en una región determinada.

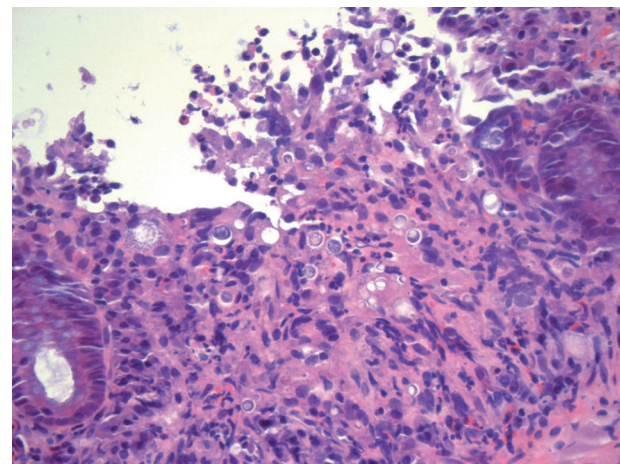


Figura 2

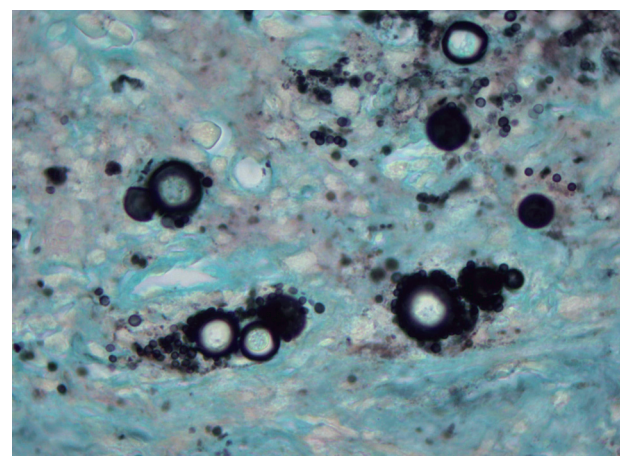


Figura 3

PLUS DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR EN ANATOMÍA PATOLÓGICA DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS

Los estudios moleculares en anatomía patológica están orientados en general al diagnóstico de enfermedades genéticas, neoplásicas e infecciosas.

Los métodos moleculares aumentan la sensibilidad y especificidad de detección de agentes infecciosos en anatomía patológica y pueden ser particularmente útiles cuando los microorganismos no pueden ser detectados por pruebas histoquímicas, estar presentes en escasa cantidad, o bien cuando se tiñen pobremente o exhiben morfología atípica. Previo a la aparición de los exámenes moleculares fueron los estudios inmunohistoquímicos que revolucionaron la histopatología en lo que se refieren a la clasificación de tumores sólidos, neoplasias hematopoyéticas y en la identificación de agentes infecciosos. Estas técnicas usan anticuerpos mono o policlonales dirigidos contra antígenos microbianos específicos, demostrando de esta manera agentes de difícil diagnóstico microbiológico (i.e Virus Papiloma Humano).

El plus de la biología molecular en la anatomía patológica de las enfermedades infecciosas se basa en los siguientes dos aspectos:

- Diagnóstico de la infección propiamente tal, especialmente en relación con microorganismos de difícil o lento cultivo (virus, micobacterias y otros).
- Efectos secundarios de infecciones crónicas como por ejemplo: Neoplasias.

Las técnicas de biología molecular que con mayor frecuencia se usan para demostrar agentes infecciosos en material de anatomía patológica (Citología e Histología) corresponden a las técnicas de:

- Reacción de polimerasa en cadena (PCR) e
- Hibridación "in situ"

En general las técnicas de biología molecular usadas en material citológico no difieren de aquellas efectuadas en sangre o fluidos corporales, en cambio los estudios efectuados en tejidos incluidos en parafina presentan ventajas y desventajas, dentro de estas últimas

- El DNA puede ser degradado, por lo que es necesario amplificar fragmentos de ADN pequeños (300 pb), por otra parte se debe limitar el tiempo de fijación y evitar algunos fijadores especialmente aquellos que contienen mercurio (Bouin).

Entre las ventajas están:

- El ADN puede ser extraído de cortes teñidos en rutina o con técnicas especiales, lo que a través de técnicas de microdissección permite aislar grupos o células de interés.
- El tejido incluido en parafina puede ser mantenido por largo tiempo, pero los tejidos en fijadores no permiten estudio molecular.

Técnicas de Biología Molecular en demostración de agentes infecciosos en material de Anatomía Patológica

- PCR: la reacción en cadena de polimerasa permite la amplificación de copias fragmentos de DNA en forma exponencial, de tal manera que una vez terminada la reacción se obtienen millones de copias a partir de los originales, estos fragmentos amplificados pueden ser demostrados a través de electroforesis en geles revelados con Bromuro de Etidio o Tinciones de Plata, entregando una banda de acuerdo con el tamaño del fragmento amplificado.
- Hibridación "in situ": Técnica usada para determinar copias de un segmento de DNA presentes en una célula.

Pasos básicos:

- Fijación de la muestra en lámina histológica.
 - Hibridación de sondas marcadas a fragmentos homólogos de ADN.
- La hibridación "in situ" tiene las mismas ventajas que los estudios IHQ. Pero este método usa la naturaleza complementaria los ácidos nucleicos en lugar de anticuerpos para entregar especificidad. La sonda de ácidos nucleicos puede ser revelada por tinciones fluorescentes o por cromógenos similares a los usados en tinciones inmunohistoquímicas. La hibridación "in situ" está ganando popularidad con el desarrollo de métodos más estandarizados y automatizados abaratando sus costos. Este método ha sido utilizado para detectar la presencia de una variedad de microorganismos en cortes histológicos, aunque con mayor frecuencia se usa para detectar virus. Se ha usado también en la detección de hongos y bacterias intracelulares. Los virus que con mayor frecuencia se detectan a través de este método son virus papiloma humano, Epstein-Barr y Citomegalovirus.

La hibridación "in situ" es una técnica

- Rápida.
- Buena resolución.
- Permite visualización de diferentes blancos en forma simultánea, utilizando sondas con diferentes espectros de fluorescencia (FITC, Rodamina, Texas red, etc.).

Las sondas pueden variar desde pocos pares de bases a 1Mbp, pueden ser utilizadas en cualquier tejido o grupo celular, incluyendo tejido congelado, cultivos celulares o tejido incluido en parafina. Las sondas de ADN pueden hibridar a cromosomas de células en división (metafase) o en G0 (interfase).

Los siguientes tres casos ilustran el plus de la Biología Molecular en el diagnóstico de enfermedades infecciosas.

Caso 3: Corresponde a hombre de 60 años con tumor nasofaríngeo. La biopsia incisional demuestra tumor maligno con caracteres de Carcinoma Nasofaríngeo. La hibridación "in situ" con sondas para virus de Epstein Barr (Foto 4) demuestra la presencia de este virus, el que tiene una relación causal con la enfermedad.

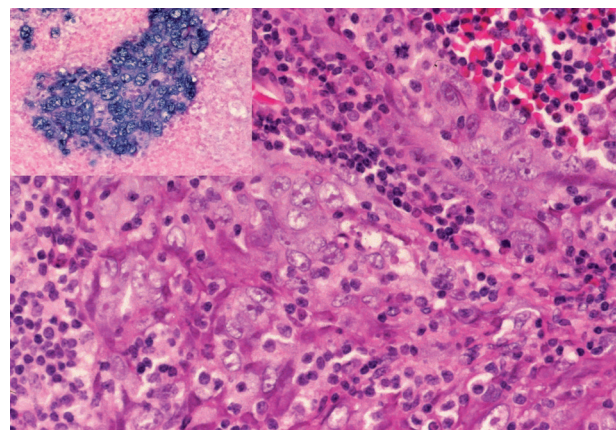


Figura 4

Caso 4: Mostrado en fotos 5 y 6 corresponde a mujer de 61 años con cuadro de hemorragia digestiva alta. En endoscopia se demuestra lesión ulcerada con vaso sangrante en su centro. La hemorragia no es contenida a pesar de tratamiento endoscópico esclerosante por lo que es intervenida quirúrgicamente. La muestra demuestra la presencia de proliferación linfoide atípica con producción de lesiones linfoepiteliales. La tinción con Whartin Starry demuestra la presencia de *Helicobacter pylori* y el estudio de clonalidad B por PCR es positivo reflejado en la banda monoclonal de la izquierda. En este caso la demostración del agente patógeno se hizo a través de tinción histoquímica y el efecto a largo plazo de esta infección (Linfoma MALT de bajo grado) por técnica molecular.

Caso 5: Mostrado en fotos 7 y 8 corresponde a hombre de 62 años con antecedentes de Enfermedad de Alport que evolucionó a Insuficiencia renal crónica y es trasplantado con donante cadavérico en junio del 2004. Debido a disfunción del injerto se efectúa Citología urinaria que demuestra presencia de células Decoy con cuantificación de virus polioma en sangre de 1.606×10^6 partículas virales/ml y de 5.3×10^{10} partículas virales /ml en orina. La biopsia renal efectuada en marzo de 2007 comprueba la presencia de Virus polioma tanto en tinción inmunohistoquímica, microscopía electrónica y PCR.

El virus polioma es un subgrupo de la familia de papovavirus: corresponde a Virus DNA doble hebra no capsulado, con tamaño de 40nm, altamente especie específico con infecciones primarias subclínicas. Dos cepas causan enfermedad en humanos: BKV y JCV; BKV fue aislado en pacientes trasplantados con estenosis ureteral y JCV fue aislado de un paciente con PML, ambos comparten 70% de homología con virus SV40 de primates. El virus BKV permanece latente en urotelio y en túbulos renales; su reactivación está asociada con diferentes condiciones,

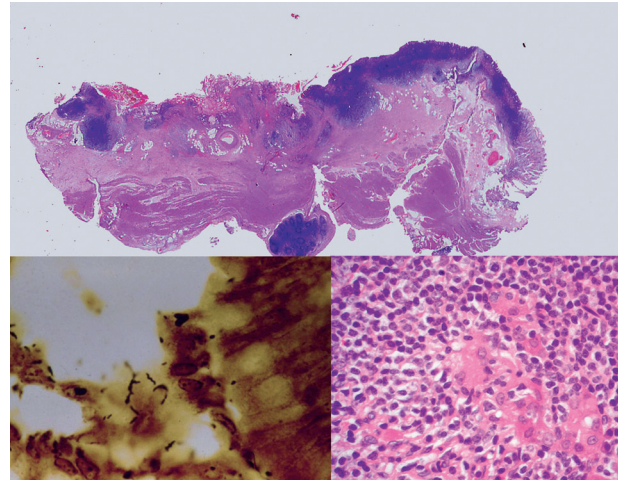


Figura 5

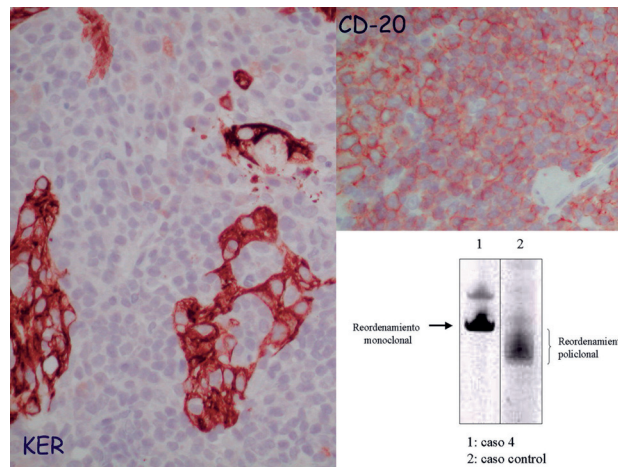


Figura 6

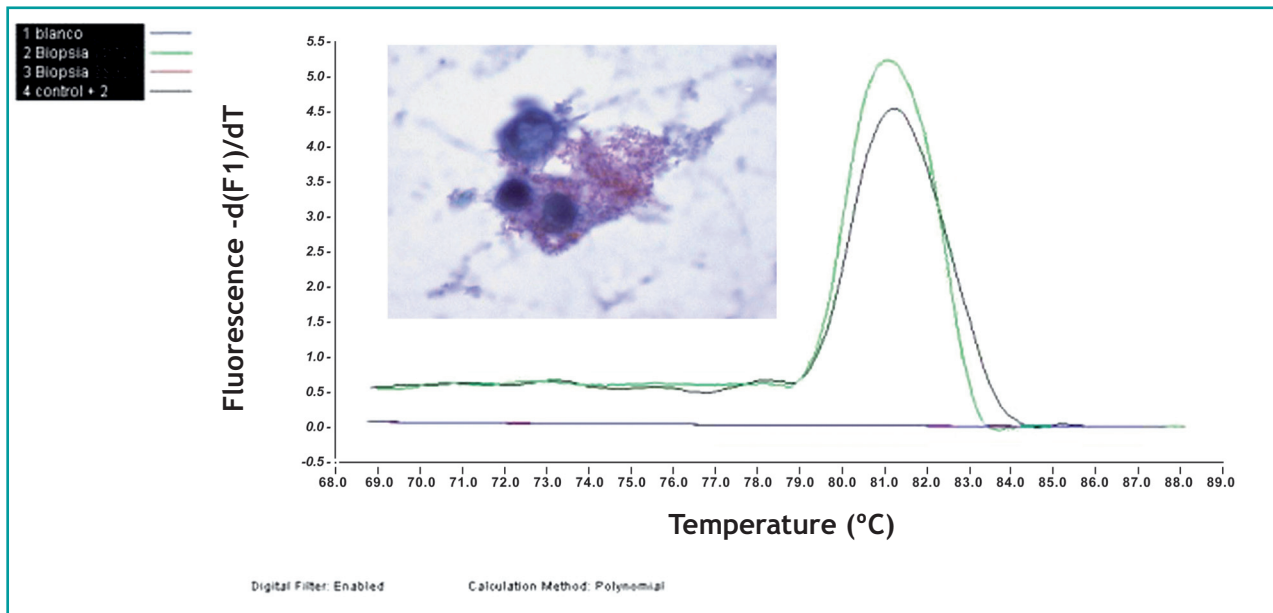


Figura 7

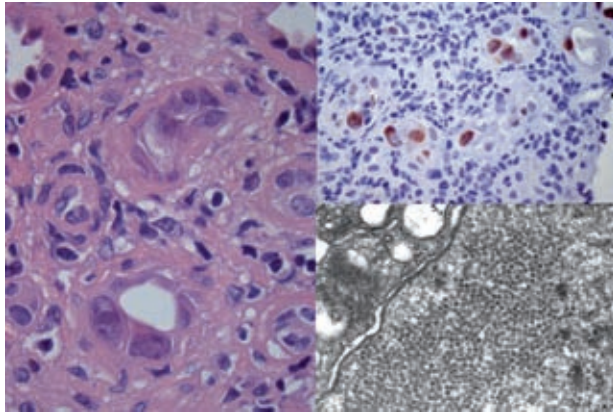


Figura 8

dentro de las más importantes está la que ocurre en enfermos con trasplante renal, se estima que un 20-30% de los pacientes trasplantados renales tendrá reactivación de BKV causando fundamentalmente Nefropatía intersticial asociada a Polioma virus (PVAN) que es una causa relativamente frecuente de pérdida de injertos.

En resumen, el uso de técnicas de Biología Molecular en Anatomía Patológica permite la identificación de agentes infecciosos incluyendo subtipos así como la detección de microorganismos de difícil cultivo o que no son cultivables aún. Además permite investigar la relación entre agentes infecciosos y otros procesos patológicos (Neoplasias, etc).

BIBLIOGRAFÍA

1. Louie M, Louie L, Simor AE. The role of DNA amplification technology in the diagnosis of infectious diseases. CMAJ. Aug 8;163(3):301-9, 2000.
2. Procop GW, Wilson M. Infectious disease pathology. Clin Infect Dis. Jun 1;32(11):1589-601, 2001. Epub 2001 Apr 30.
3. Netto G J., Domiati R S. Diagnostic Molecular Pathology. An Increasingly Indispensable Tool for the Practicing Pathologist. Arch Pathol Lab Med. 130:1339-1348, 2006.
4. Pan L.X., Diss T.C., Isaacson P.G. The polymerase chain reaction in histopathology. Histopathology 26: 201-217, 1995.

BIOSONDA S.A.

Biología molecular

Nuestro NUEVO Servicio de Biología Molecular ofrece

... al alcance de su mano

- Purificación de plasmidios con calidad para ensayos de transfección
- Purificación de ácidos nucleicos (ADN y ARN)
- Clonamiento de productos obtenidos por PCR
- Secuenciación de ADN

Marcación de primer
Plasmidios
Anticuerpos-Análisis de
muestras-Detección BioRobots
PCR-Secuenciación DNA
Microarrays-Oligonucleótidos
ELISA-Purificación

Cotizaciones y ventas
ventas@biosonda.cl

Consultas y problemas técnicos
soporte@biosonda.cl

www.biosonda.cl

Fono: 2 209 6770

