
DETECCIÓN DE BACILOS ÁCIDO ALCOHOL RESISTENTES EN BIOPSIAS EMBEBIDAS EN PARAFINA EN CASOS DE INFLAMACIÓN GRANULOMATOSA CRÓNICA.

Detection of Acid-Fast Bacilli in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues of Patients with Chronic Granulomatous Inflammation.

JAVIER ANDRÉS BUSTAMANTE¹, MIRYAM ASTUDILLO², M.Sc.;
ALVARO JAIRO PAZOS³, M.Sc.; LUIS EDUARDO BRAVO⁴, M.D., M.Sc.

¹ Facultad de Ciencias Naturales, Universidad del Valle, Ciudadela Universitaria Meléndez, Edificio 320. Cali, Colombia.

² Grupo de Biotecnología e Infecciones Bacterianas. Departamento de Microbiología, Universidad del Valle, Campus San Fernando, Edificio 116. Cali, Colombia.

³ Departamento de Biología, Universidad de Nariño. Calle 18, carrera 50, Pasto, Colombia.

⁴ Registro Poblacional de Cáncer de Cali, Departamento de Patología, Facultad de Salud, Universidad del Valle. Calle 4B # 36-00. Edificio 116, piso 4, oficina 4016. Cali, Colombia. bravo.luiseduardo@gmail.com

Presentado 17 de octubre de 2009, aceptado 29 de abril de 2010, correcciones 18 de agosto de 2010.

RESUMEN

La detección de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) en frotis resulta un aporte significativo al diagnóstico y tratamiento de individuos con inflamación granulomatosa crónica (IGC). Con el objetivo de evaluar la presencia de BAAR en diferentes tejidos de pacientes con IGC demostrada y comparar la frecuencia de los extendidos positivos para BAAR con el grado de formación de granulomas y necrosis, se diseñó un estudio retrospectivo, en el que se seleccionaron 57 bloques embebidos en parafina que contenían biopsias de pleura, pulmón, pericardio, ganglio linfático y lóbulo cerebral, correspondientes a 30 pacientes (63,3% hombres), mayores de 18 años, con IGC demostrada y remitidos al departamento de patología del Hospital Universitario del Valle entre el 2002-2008. A cada muestra se le realizaron tres cortes y se sometieron a tinciones de H/E, Ziehl Neelsen y Auramina. La detección de BAAR en frotis fue similar para ambas tinciones especiales en pacientes con IGC necrotizante, reflejando una excelente concordancia en el diagnóstico ($\kappa=0,89$, IC95%[0,68-1,0]). Sin embargo, la tinción con Auramina fue superior a la tinción Ziehl Neelsen para la detección de BAAR en pacientes con IGC no necrotizante ($\kappa=0,65$, IC95%[0,23-1,0]). No se encontraron diferencias significativas entre la presencia de BAAR y el tipo de inflamación, sexo y localización anatómica comprometida. En general, fue buena la concordancia entre los métodos histológicos

empleados. Además, se hizo evidente la importancia de implementar el uso de técnicas moleculares mínimamente afectadas por el escaso número de bacilos presentes en las muestras, que finalmente ayudan en el reconocimiento del microorganismo.

Palabras clave: biopsia, granuloma, necrosis, infecciones por *mycobacterium*, diagnóstico.

ABSTRACT

Detection of acid fast bacilli (AFB) in smears is a significant aid in diagnosis and treatment of individuals with chronic granulomatous inflammation (CGI). This study was designed in order to detect the presence of AFB in several tissues of patients with histologically proven CGI and to compare the frequency of AFB positive smears with the degree of granuloma formation and necrosis. We selected 57 formalin-fixed, paraffin embedded blocks containing specimens of pleura, lung, pericardium, lymph nodes and cerebral lobe, from 30 patients (63.3% males) older than 18 years, with biopsy proven CGI referred to the Pathology department at University Hospital of Valle del Cauca (Colombia), between 2002 and 2008. Each sample was cut into 3 sections, and stained using the H/E, Ziehl-Neelsen and Auramine staining. AFB smear detection was similar in both special staining procedures in individuals with necrotizing CGI, reflecting an excellent diagnostic agreement ($\kappa=0.89$, IC 95% [0.68-1.0]). However, Auramine was superior to Ziehl-Neelsen staining for AFB detection among subjects with nonnecrotizing CGI ($\kappa=0.65$, IC95% [0.23-1.00]). Non-significant differences were found between the presence of AFB and the degree of granuloma necrosis, gender, and specific anatomic location. In general, there was a good agreement between both histological methods employed. Additionally it is clear that implementation of molecular tests that are minimally influenced by scant numbers of bacilli in samples is necessary for a definite diagnosis.

Key words: Biopsy, Granuloma, Necrosis, Mycobacterium Infections, Diagnosis.

INTRODUCCIÓN

Los cambios tisulares granulomatosos abarcan un amplio espectro de enfermedades raras y comunes que en conjunto imponen una enorme carga de enfermedad. Durante la última década, se han implementado nuevas herramientas diagnósticas y notables avances que han facilitado un mejor conocimiento de los trastornos granulomatosos. Sin embargo, continúa el reto para el clínico y el investigador quienes deben comprender los complejos genéticos, microbiológicos, inmunológicos, ambientales y factores que son responsables de las diferentes manifestaciones clínicas y los resultados dispares de estos trastornos (Geraint y Alimuddin, 1999). La inflamación granulomatosa como tal, es un patrón morfológico de inflamación crónica caracterizada por un núcleo central constituido por células epiteloideas, rodeado principalmente por linfocitos y células gigantes multinucleadas con o sin componente necrotizante (Robbins *et al.*, 2000). El reconocimiento de esta clase de inflamación crónica es muy importante dado el limitado número de enfermedades crónicas asociadas con este tipo específico de respuesta tisular (Baehner, 1990; Liese *et al.*, 2000). Cuando sea posible es importante identificar

el agente etiológico porque estas lesiones pueden ser producidas en otras enfermedades como: brucelosis, sífilis, algunas infecciones micóticas, y reacciones a cuerpo extraño (Robbins *et al.*, 2000). El número actual de pacientes afectados se ha incrementado como consecuencia del aumento en la prevalencia de las enfermedades emergentes que parecían controladas por los progresos alcanzados en la prevención y tratamiento. Entre estas enfermedades se destaca el VIH/SIDA que aumenta la prevalencia de tuberculosis y de otro tipo de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) asociados con la IGC (Jackson, 2000). La disponibilidad de métodos diagnósticos complementarios aumenta la posibilidad de detección de BAAR y proporciona al clínico una guía de manejo etiológico (Hsiao *et al.*, 2003). El propósito de este trabajo es estudiar la frecuencia de bacilos ácido alcohol resistentes en pacientes con IGC.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente es un estudio retrospectivo realizado en el periodo 2002-2008 por los Departamentos de Patología y Microbiología de la Universidad del Valle, Cali, Colombia. Los especímenes se obtuvieron de un banco de tejidos embebidos en parafina en un hospital de tercer nivel que cuenta con 495 camas, y es centro de referencia para el suroccidente colombiano. Se incluyó una colección de 57 bloques disponibles, que contenía biopsias de pleura, pulmón, pericardio, ganglio linfático y lóbulo cerebral; correspondientes a 30 pacientes adultos (63,3% hombres) con diagnóstico histológico de IGC necrotizante y no necrotizante. Se excluyeron los casos con insuficiencia de tejido y diagnóstico histopatológico consistente con infecciones micóticas, y reacciones a cuerpo extraño. Esta investigación contó con el aval del Comité Institucional de Revisión de Ética Humana (CIREH) de la Universidad del Valle.

PROCEDIMIENTOS HISTOLÓGICOS

De cada bloque embebido en parafina se obtuvieron tres cortes de 5 μ m. Para el diagnóstico histopatológico se utilizó la tinción de Hematoxilina/Eosina (Castañeda y Arango, 2003) clasificando la IGC como necrotizante y no necrotizante. Los bacilos ácido alcohol resistentes se detectaron con las tinciones de Ziehl Neelsen y Auramina/ Rodamina, y se interpretaron con una escala semicuantitativa (OPS, 2008).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó un análisis univariado y bivariado, las variables continuas se describieron como promedios y las categóricas como proporciones. Al estudiar las diferencias entre categorías durante el análisis bivariado se utilizó una prueba χ^2 , con el programa SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) y para comparar el desempeño de los métodos empleados en la detección de BAAR, se estimó el estadístico Kappa en el programa EPIDAT 3.1 (Epidat Inc., Galicia, España) su interpretación se hizo según escala sugerida por Landis y Koch, 1977.

RESULTADOS

La IGC fue de tipo necrotizante en 19 pacientes y no necrotizante en 11 (Fig. 1). El 63,3% de los casos fueron hombres. En las mujeres predominó la IGC no necrotizante 45,4%, y

en los hombres, 68,4% tuvieron IGC de tipo necrotizante. No se observaron diferencias significativas del tipo de IGC según sexo, edad y localización de la lesión. El 80% de los casos correspondieron a muestras de pleura y pulmón. En las biopsias pleurales se observó inflamación necrotizante en 73,3% (Tabla 1). En los pacientes con IGC necrotizante la detección de BAAR fue similar con las tinciones de Ziehl Neelsen y Auramina/rodamina, la concordancia fue excelente $\kappa = 0,89$, IC 95% [0,68-1,0]. En los 11 casos con IGC no necrotizante la proporción de positividad fue mayor con la tinción por fluorocromos de Auramina/rodamina 63,6% (Tabla 2), al observar el coeficiente de kappa obtenido, se encontró una buena concordancia $\kappa = 0,65$, IC95% [0,23-1,00]. Ambas pruebas permitieron la detección de BAAR consistentes con *Mycobacterium* spp. en 12/15 (80%) de los casos con diagnóstico de IGC y sospecha de tuberculosis por antecedentes clínicos como: tratamiento antituberculoso, sintomatología y coinfección por VIH/SIDA. El coeficiente global de concordancia para ambos métodos de detección fue excelente, $\kappa = 0,8$, IC 95% [0,58-1,00]. No se observaron diferencias en la detección de los BAAR según el método de tinción y el tipo de inflamación granulomatosa crónica presente (Tabla 2). En la figura 1, se muestran los bacilos detectados con las tinciones utilizadas. Se observaron notables diferencias en cuanto a la resolución y la coloración de los diferentes tejidos sometidos a la tinción con Auramina/Rodamina.

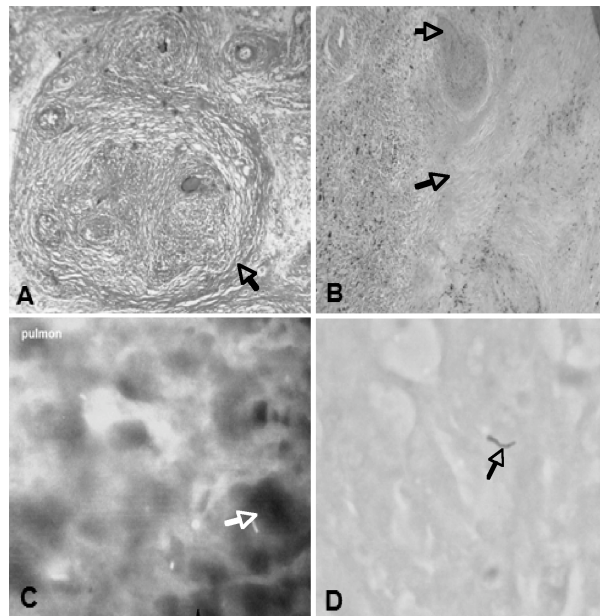


Figura 1. A. Típica reacción histopatológica en la pleura de un paciente en el presente estudio, en el cual se evidencia formación de un granuloma (flecha negra) y célula gigante tipo langhans (flecha blanca) (hematoxilina-eosina, magnificación X100). B. Formación de un granuloma con infiltrado linfocitario a su alrededor (flecha blanca) en tejido pulmonar de un paciente del presente estudio, se observa la presencia de necrosis (flechas negras) (hematoxilina-eosina, magnificación X100). C. Coloración con fluorocromos auramina/rodamina en una muestra de pulmón (magnificación X1000). D. Tinción convencional de Ziehl Neelsen en lóbulo cerebral mostrando un bacilo típico (flecha negra) en la región de necrosis caseosa (magnificación X1000).

Característica	Tipo de Inflamación granulomatosa						Valor-p
	Necrotizante		No necrotizante		Total		
Edad							
Promedio	36		42				
Error estándar	2,12		4,95				
IC de 95%	[31,8 - 40,1]		[32,3 - 51,7]				
Sexo	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
Masculino	13	68,4	6	31,6	19	63,3	0,447
Femenino	6	54,6	5	45,4	11	36,7	
Tipo de especimen							
Pleura	11	73,3	4	26,7	15	50	0,418
Pulmón	3	37,5	5	62,5	8	26,7	
Pericardio	3	75	1	25	4	13,3	
Ganglio linfático	1	50	1	50	2	6,7	
Lóbulo cerebral	1	100	0	0	1	3,3	
	19	63,3	11	36,7	30	100	

Tabla 1. Comparación de casos por tipo de inflamación, según edad, sexo y diagnóstico histopatológico de inflamación granulomatosa crónica por tinción convencional en hematoxilina-eosina.

Tipo de Inflamación	N	Tipo de tinción							
		Ziehl Neelsen		Auramina/rodamina		Concordancia			
		Positivo	Valor <i>p</i>	Positivo	Valor <i>p</i>	<i>K</i>	IC 95%		
		<i>n</i>	%			<i>n</i>	%		
Necrotizante	19	8	42,1	0,86	7	36,9	0,156	0,89	[0,68-1,0]
No necrotizante	11	5	45,5		7	63,6		0,65	[0,23-1,0]
Total	30	12	43,3		14	46,7		0,80	[0,58-1,0]

Tabla 2. Comparación de casos por diagnóstico histopatológico, tinción Ziehl Neelsen y tinción Auramina/Rodamina.

DISCUSIÓN

La respuesta inflamatoria granulomatosa es una alteración histopatológica asociada a muchas infecciones (Roos, 1994), presencia de agentes tóxicos, alergias, procesos autoinmunes, enfermedades neoplásicas y también a condiciones etiológicas desconocidas. El conocimiento de la base fisiopatológica de esta distintiva reacción tisular es de fundamental importancia para la comprensión de muchos procesos de la enfermedad (Barron *et al.*, 2006). En Latinoamérica y en el mundo muchos pacientes, víctimas de la tuberculosis, de la lepra y de otras enfermedades infecciosas, desarrollan esta reacción inflamatoria. En este estudio, se analizaron 57 biopsias embebidas en parafina de cinco diferentes localizaciones anatómicas. Estas localizaciones fueron seleccionadas bajo dos criterios: 1) las lesiones granulomatosas afectan con mayor frecuencia estos órganos (Baehner, 1990; Liese *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2003; Barron *et al.*, 2006) y 2) la facilidad para la toma de la biopsia, este último criterio permite explicar por qué el 77% de los casos

correspondieron a muestras de pleura y pulmón. Las muestras embebidas en parafina de los archivos patológicos son invaluable en estudios retrospectivos; aprovechando la gran cantidad de tejidos almacenados, el uso de técnicas histológicas y el desarrollo de la tecnología del ADN recombinante, se puede comparar el análisis morfológico con la investigación de los ácidos nucleicos y la correlación clínica (Florez y González, 2004). Sin embargo, la confiabilidad de los resultados depende de la calidad y cantidad de la muestra, la cual está directamente relacionada con los métodos utilizados en el procesamiento de los tejidos.

Al observar la distribución de los casos según el sexo se encontró que 63% de los pacientes comprometidos eran hombres, esta distribución no es clara y en nuestra población se carece de datos epidemiológicos para explicarla, por lo tanto se hace necesario realizar estudios que incluyan un mayor tamaño muestral. Llamó la atención, encontrar una marcada presencia de IGC de tipo necrotizante en 68,4% de los pacientes masculinos, sin embargo estas observaciones no fueron significativas. Al observar la distribución de los casos según el tipo de inflamación para todas las localizaciones anatómicas comprometidas, es de notar que más de la mitad de los casos presentaron inflamación con necrosis, 58% se encontraron en pleura. Este tipo de reacción tisular es clásicamente característica de un granuloma inmunitario producido por bacilos micobacterianos en especial *Mycobacterium tuberculosis* (Mycobacteriaceae). Por el contrario, en otras enfermedades granulomatosas no es frecuente la necrosis caseosa (Robbins *et al.*, 2000). No obstante, en este estudio se observó que no existe relación alguna entre la presencia de estos bacilos ácido alcohol resistentes, el sexo, la localización anatómica y el tipo de inflamación granulomatosa. No se descarta que este hallazgo pueda deberse a un sesgo por el tamaño de la muestra. Independientemente de esta observación, los patrones morfológicos de la inflamación granulomatosa por micobacterias pueden ser suficientemente característicos como para que el anatomopatólogo con experiencia pueda efectuar un diagnóstico razonablemente acertado, sin embargo, existen muchas formas de presentación atípica de esta inflamación, por lo que siempre es necesaria la identificación del agente etiológico específico por tinciones especiales para BAAR y por métodos moleculares, que desafortunadamente no están suficientemente validados y hasta el momento, no han logrado reemplazar los métodos tradicionales de diagnóstico en la práctica clínica (Cormican *et al.*, 1995). Es claro, que la detección de BAAR en extendidos observados al microscopio, en países de alta endemia de tuberculosis y otras infecciones micobacterianas como el nuestro, constituye la primera evidencia bacteriológica de la presencia de micobacterias. En nuestra experiencia, la tinción de auramina/rodamina no presentó diferencias significativas con la tinción rutinaria Ziehl Neelsen, ambas tinciones concordaron en la detección de BAAR. Es importante resaltar que la tinción con fluorocromos, es una técnica fácil y rápida, aunque relativamente costosa. Por lo tanto, se recomienda el uso de estos fluorocromos en cortes histológicos dudosos para Ziehl Neelsen y también en aquellos casos en donde el personal encargado tenga poca experiencia en la lectura de estos, para dar un diagnóstico preliminar.

Se encontraron notables diferencias en cuanto a la resolución y la coloración de los diferentes tejidos sometidos a la tinción con Auramina/rodamina. El tejido pleural en comparación con el tejido pulmonar, mostró pobre resolución y baja absorción de los fluorocromos, esto puede explicarse a partir de las diferencias en la composición

histológica de ambos tejidos. La composición serosa de la pleura (Gartner y Hiatt, 2002) parece generar impermeabilidad parcial a los componentes químicos de la auramina/rodamina. A diferencia del pulmón que se compone de tejido parenquimatoso que dada sus propiedades parece absorber mejor los compuestos de la tinción. Por otra parte, se encontró que pese a que la gran mayoría de las biopsias eran de origen pleural constituyendo el 50% de los casos de este estudio, la mayoría de casos diagnosticados positivamente para BAAR por ambas coloraciones se observaron en biopsias de origen pulmonar. Tal hallazgo puede explicarse considerando la fisiología del agente patógeno. Desde el punto de vista de los requerimientos de O₂, la mayoría de especies del género *Mycobacterium* son aerobios estrictos (Melero, 1987), entre ellas se destaca por su importancia clínica *M. tuberculosis*, estas características condicionan la preferencia y la búsqueda de la bacteria a nivel pulmonar. En una investigación publicada en el año 2006, Barron y colaboradores reportaron 40% menor sensibilidad para la tinción de auramina en muestras de pleura embebidas en parafina en relación a la TB-PCR. Estos resultados fueron justificados sugiriendo que el tratamiento con formalina y xilol, pueden disminuir drásticamente la sensibilidad de las técnicas de tinción para BAAR (Barron *et al.*, 2006), lo cual ha sido reportado por otros autores (Park *et al.*, 2003). No obstante, estos resultados también pueden explicarse a partir del origen anatómico de las muestras empleadas. Es claro, que la confirmación de los diagnósticos clínicos por tinciones especiales, presentan baja sensibilidad en muestras histológicas y en este tipo de muestras no es posible recurrir al cultivo, para garantizar un diagnóstico acertado de infección por BAAR del género *Mycobacterium*, se recomienda implementar métodos moleculares como estudio complementario a los métodos convencionales, que adicionalmente pueden llevar a la clasificación del microorganismo.

AGRADECIMIENTOS

A los histólogos James Diaz, Argenis Godoy y Guillermo López del H.U.V por la asesoría en el manejo de los especímenes, al Dr. Enrique Bravo, al biólogo Flavio Cerón, y a las bacteriólogas Mercedes Figueroa y Luz H. Daza de la Universidad del Valle, por sus oportunos aportes.

BIBLIOGRAFÍA

- BAEHNER L. Chronic granulomatous disease of childhood: clinical pathological, biochemical, molecular and genetic aspects of the disease. *Pediatr Pathol.* 1990;10:143-153.
- BARRON H, MONTEGHIRFO M, RIVERA, N. Diagnóstico molecular de *Mycobacterium tuberculosis* en biopsias pleurales embebidas en parafina. *An Fac Med Lima.* 2006;67(1):11-18.
- CASTAÑEDA GE, ARANGO M. Micosis humanas: procedimientos diagnósticos. 2 ed. Bogotá: Instituto Nacional de Salud; 2003.
- CORMICAN M, GLENNON M, NIRIAIN U. Evaluation of a PCR based method for identification of mycobacterial isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1995;22:20-22.
- FLOREZ O, GONZÁLEZ C. Amplificación por PCR de tejidos de archivo: efecto de los fijadores. *Salud UIS.* 2004;36:56-64.

GARTNER L, HIATT J. Texto atlas de Histología. 2 ed. Madrid: Editorial McGraw-Hill; 2002.

GERAINT J, ALIMUDDIN Z. The Granulomatous Disorders. N Engl J Med. 1999;343(1):74-75.

GERAINT W, JONES W. Review: Granulomatous inflammation. J Clin Pathol. 1983;36:723-733.

HSIAO P, TZEN C, CHEN H, SU H. Polymerase chain reaction based detection of *Mycobacterium tuberculosis* in tissues showing granulomatous inflammation without demonstrable acid-fast bacilli. Int J Dermatol. 2003;42:281-286.

JACKSON LI, STEPHEN T, CHI-SING F. Molecular Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Tissues Showing Granulomatous Inflammation without Demonstrable Acid-Fast Bacilli. Diagn Mol Pathol. 2000;9(2):67-74.

LANDIS JR, KOCH GG. The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics. 1977;33:159-174.

LIESEJ, KLOOS S, JENDROSSEK V, PETROPOULOU T, WINTERGERST U. Long-term follow-up and outcome of 39 patients with chronic granulomatous disease. Pediatric. 2000;137:687-693.

MELERO M. Paratuberculosis. Aspectos microbiológicos y cultivo de *Mycobacterium paratuberculosis*. Bovis. 1987;18:43-60

OPS. Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Parte I: Baciloscopia. Ed. Oficina regional Organización Mundial de la Salud; 2008. Disponible en: <http://www.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/tb-labs-baciloscopia.pdf>.

PARK D, CHOI KU, LEE JS, LEE CH, SOL MY, SUH K. Comparison of Polymerase Chain Reaction with Histopathologic Features for Diagnosis of Tuberculosis in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Histopathologic specimens. Arch Pathol Lab Med. 2003;127:326-30.

ROBBINS S, COTRAN R, KUMAR V, COLLINS T. Patología estructural y funcional. 6 Ed. Madrid: McGraw-Hill; 2000.

ROOS D. The genetic basis of chronic granulomatous disease. Immunol Rev. 1994;138:121-157.