



Diagnóstico histopatológico de las micosis

Emilio Mayayo Artal

Hospital Universitario Juan XXIII y Facultad de Medicina, Universidad Rovira i Virgili, Tarragona, España

Resumen

Las enfermedades infecciosas emergen como causa de patología en nuestros pacientes. Entre las posibles etiologías, las micosis son una de sus causas, habiendo experimentado un considerable aumento en las dos últimas décadas. En general, la clínica de las enfermedades fúngicas es poco definitoria, siendo la morfología del hongo y la clínica un protocolo a seguir para su correcta identificación. Clínicos, microbiólogos y patólogos son esenciales para el diagnóstico. El patólogo, con una metodología sencilla y rápida, puede llegar a diagnosticar algunos tipos de micosis, pero no sólo identifica el agente causante sino el tipo de lesión que produce, la respuesta inflamatoria y el órgano u órganos afectados. Además, puede clasificar el tipo de micosis en superficial, cutánea, subcutánea, profunda o sistémica en virtud de la localización. En la presente revisión se describen las pautas de estudio del patólogo frente a las infecciones por hongos y los nuevos avances técnicos que se están instaurando en los laboratorios de patología para una más precisa identificación de las micosis.

Palabras clave

Micosis, Patólogo, Histopatología, Metodología

Histopathological diagnosis of mycoses

Summary

Infectious diseases emerge as a cause of pathology in our patients. Among the possible etiologies, mycoses have shown a considerable increase in the two last decades. In general, the clinical features of fungal diseases are not very distinctive. The morphology and the clinical aspects of the fungi serve as a protocol for their correct identification. Clinicians, microbiologists and pathologists are essential for the diagnosis. The pathologist using a simple and fast methodology can diagnose some types of mycosis, but they do not only identify the causal agent, but also the kind of injury that produces, the inflammatory response and the affected organ or organs. Moreover, they can classify the mycosis as superficial, cutaneous, subcutaneous, deep and systemic depending on the location. The present review paper describes study guidelines for the pathologist faced with a fungal infection and new technical advances that are established in pathology laboratories for a more precise identification of the mycoses.

Key words

Mycoses, Pathologist, Histopathology, Methodology

A lo largo de las dos últimas décadas, la patología fúngica ha experimentado un considerable aumento, sobre todo en pacientes inmunodeprimidos, pero no exclusivamente en ellos [41,54]. Su incidencia se ha tasado en un aumento de más del 300% en este corto periodo de tiempo [6]. Hay múltiples factores que favorecen la instauración de las micosis, sobre todo cambios en los protocolos, cli-

mato-ecológicos, socio-económicos y migratorios, entre los que podemos destacar a los enfermos muy debilitados inmunológicamente, el SIDA, el uso y abuso de antibióticos o de fármacos inmunosupresores, los trasplantes, las leucemias y linfomas, o la realización de una medicina cada vez más agresiva. Éstos y otros factores hacen que las micosis tengan esta alta incidencia, como hemos comentado anteriormente.

Clínicamente, o a partir de preparaciones citológicas y/o biópsicas, es difícil diferenciar e identificar correctamente las más de 400 especies de hongos descritas hasta el momento como patógenos para el hombre [14]. Sin embargo, tras un detallado estudio se pueden distinguir, en algunos casos, características morfológicas clave que son las que ayudan a diferenciar estos géneros o especies. Con ello se puede conseguir un diagnóstico preciso y, en consecuencia, realizar un tratamiento más efectivo [4,16,39,55]. Recordemos que las micosis sistémicas tienen un alto porcentaje de mortalidad, cifrado para algunas especies en el 100%, por lo que se deduce que es muy importante un diagnóstico rápido y la histopatología puede contribuir a ello [58].

Dirección para correspondencia:

Dr. Emilio Mayayo
Unidad de Patología
Departamento de Ciencias Médicas Básicas
Facultad de Medicina
C/ S. Llorenç, 21
43201 Reus, Tarragona, España
Correo electrónico: ema@fmcs.urv.es

Para un diagnóstico más correcto es muy importante la colaboración entre clínicos, microbiólogos y patólogos, profundizando, sobre todo, en los protocolos de toma y procesado de las muestras. La metodología de estudio del patólogo se basa, fundamentalmente, en reconocer la morfología del hongo para su identificación, pero también en observar determinados aspectos de su patogenicidad, la respuesta orgánica y las estructuras tisulares afectadas. Dichas estructuras se pueden observar en preparaciones citológicas, secciones biópsicas y en los estudios autópsicos, que son los tres campos de trabajo básicos del patólogo. La citología es una metodología muy útil, ya sea obtenida la muestra por extensión o por punción-aspiración con aguja fina (PAAF), pudiéndose conseguir un diagnóstico muy rápido, que la hace óptima en pacientes graves que precisan de un tratamiento precoz y específico. Los otros métodos de estudio, debido a que el protocolo de manipulación de la muestra implica la fijación, procesado, corte y tinción de la misma, hacen que los resultados se demoren, pero ofrecen una información más valiosa, ya que muestran la afectación orgánica y el tipo de respuesta tisular, así como la presencia del agente infeccioso, su abundancia y morfología. Es precisamente esta última característica la que nos permite identificar, al menos a nivel de género y, en determinados casos, también de especie, el hongo causante de la lesión.

Algunos hongos tales como *Aspergillus* spp., *Candida* spp., zigomicetos o criptococos, no son difíciles de identificar con la ayuda de determinadas técnicas de tinción como Grocott, PAS, mucicarmin o Fontana-Masson. Todas realizan detalles morfológicos o morfo-químicos, como se indica más adelante.

Hay nuevos avances técnicos, sobre todo en biología molecular mediante PCR o secuenciación del DNA fúngico, que están siendo de gran ayuda para el diagnóstico de muchas micosis y que se están instaurando en nuestros laboratorios, aunque dichas técnicas no son muy frecuentes cuando se trata de muestras parafinadas [11,30-32,34,37,38,46,57,59,61].

El patólogo, además de diagnosticar el agente causante de una patología concreta, puede tipificar las lesiones observadas en granulomatosas, necróticas o purulentas y puede determinar si se trata de una infección local o difusa y, a su vez, clasificarla en superficiales, cutáneas, subcutáneas y profundas o sistémicas [19,56].

En este artículo describimos la metodología utilizada por el patólogo, las principales características morfológicas que presentan los hongos en los tejidos y la respuesta orgánica, así como los nuevos avances técnicos que el patólogo tiene a su alcance para poder realizar un diagnóstico más preciso, de la infección fúngica.

Metodología

Los posibles orígenes de las muestras patológicas son: la citología, la biopsia convencional fijada, la biopsia intraoperatoria, donde los tejidos están sin fijar, y la autopsia.

A) La citología. Como comenta Pontón en un reciente trabajo [51], las posibilidades de obtener resultados diagnósticos en tiempo real (menos de 10 min) son limitadas y se basan en la observación directa de las muestras. Las muestras citológicas (raspados, PAAF, lavados broncoalveolares, extensiones de mucosa vaginal o de otras mucosas) son especímenes donde se puede diagnosticar diferentes tipos de hongos y, de una forma rápida, mediante observación directa. *Cryptococcus* spp., *Asper-*

gillus spp., *Candida* spp., *Scedosporium* spp. y también *Pneumocystis* spp., son algunos hongos que pueden ser identificados de forma rápida y precisa, como así lo demuestran numerosos trabajos [4,10,12,13,16,18,36,39,55,58], con una mínima experiencia. Para ello hay determinadas tinciones y procedimientos que pueden ser de especial ayuda.

Veamos algún ejemplo donde la citología puede ser clave. Ante un enfermo inmunodeficiente con SIDA y clínica neurológica de meningismo, la primera sospecha es la de afectación meníngea por *Cryptococcus*. Al obtener líquido cefalorraquídeo (LCR), es prioritario realizar una tinción con tinta china, pudiendo diagnosticar esta infección de forma rápida. Las características morfológicas de la levadura, en gemación o no, con un amplio halo claro a su alrededor, que corresponde a la cápsula, hacen fácilmente reconocible este hongo. Otro ejemplo puede ser el de un paciente con SIDA y patología respiratoria. En este caso, lo más lógico es pensar en una infección por *Pneumocystis*. En la citología de lavado broncoalveolar se puede observar el agrupamiento de estructuras fúngicas irregulares que poseen una muesca central, acompañadas por material mucoprotéico, visibles ya en las tinciones rutinarias de Papanicolaou y Hematoxilina-Eosina (H-E). Sin embargo, sus características son más evidentes con la tinción de Grocott, que puede realizarse directamente sobre extensiones citológicas (Figura 1). Otro hongo que también puede diagnosticarse en citologías respiratorias o PAAF es *Scedosporium prolificans*, hongo emergente en nuestro país, sobre todo en enfermos hematológicos. El poder observar conidios con forma oval o de pera creciendo en filídes hinchadas constituye una característica diagnóstica que lo hace fácilmente distinguible (Figura 2). *Candida* spp., *Aspergillus* spp. o zigomicetos son hongos frecuentes y en general fáciles de reconocer, aunque también es fácil realizar diagnósticos erróneos; por ello, hemos de ser prudentes al respecto ya que, por ejemplo, la ramificación en 45° es una peculiaridad de *Aspergillus*, pero existen otros hialohifomicetos con ramificaciones de forma similar. La PAAF es la técnica citológica más idónea para la obtención del material, ya que permite acceder a partes profundas, se evitan contaminaciones y, sobre todo, permite prescindir de un procedimiento tan agresivo como es la biopsia. Con la ayuda de una aguja y una jeringa para la aspiración, se llega a lesiones profundas obteniéndose material tan idóneo como el conseguido por medio de la incisión biópsica y permite buenos resultados en un breve plazo de tiempo [15,17,29,35].

B) La biopsia es la técnica más común para el patólogo. Permite observar la causa de la lesión, los cambios histopatológicos producidos, así como la respuesta orgánica que producen en los tejidos u órganos (Figura 3). En algunas infecciones fúngicas es el método indiscutible de diagnóstico. Existen varios tipos de biopsias: la diagnóstica de pequeño tamaño, las escisionales de mayor tamaño y las piezas quirúrgicas. Generalmente se reciben conservadas en un medio fijador, básicamente formol al 10%, pero la situación ideal es la observación de las muestras en fresco, como se hace en los procedimientos intraoperatorios, donde el patólogo procede en el mismo momento a su estudio macroscópico, observa el tipo de patología y realiza una visión directa para confirmar la infección. Este último tipo de muestras permite realizar extensiones citológicas, técnicas de inmunofluorescencia, cultivos o conservar porciones en congelación para un posterior estudio, sin necesidad de realizar nuevas tomas [23].

Podemos esquematizar los pasos a realizar para llevar a cabo un correcto diagnóstico en los siguientes apartados:

- a) Observación macroscópica
- b) Fijación
- c) Selección de zonas a estudio
- d) Deshidratación
- e) Inclusión
- f) Realización de cortes microscópicos
- g) Hidratación
- h) Tinción
- i) Examen microscópico

a y b) Ya hemos adelantado cómo se realiza la **observación macroscópica** y la **fijación rutinaria** con formal al 10%, pero hay otros medios de fijación como la congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, la ultracongelación en nitrógeno líquido, o simplemente el guardar los tejidos en nevera. Existen otros fijadores más selectivos que son utilizados en función de la técnica que se emplee posteriormente, como son el glutaraldehído para realizar estudios ultraestructurales, el B5 para los tejidos hematopoyéticos o el líquido de Zenker para órganos endocrinos. Si no se dispone de ninguno de ellos, se puede fijar el tejido en alcohol de 96° .

c) Como **selección**, nos referimos al seccionamiento de las piezas de biopsia realizando una serie de cortes seriados, con el objeto de determinar las áreas más representativas de las lesiones, para su procesamiento en vistas a un estudio microscópico en detalle. Este paso será imprescindible en el caso de especímenes de gran tamaño.

d) Deshidratación, es el paso que se realiza para que los tejidos se puedan incluir en parafina, ya que este compuesto es hidrófobo.

e) Inclusión. Los tejidos deben adquirir una consistencia firme para poder ser seccionados en cortes muy finos. La parafinación es la metodología más usada, aunque disponemos de otras técnicas como son la plastificación (básica en ultramicroscopía), el uso de gelatina, celoidina o de otras ceras. En todo caso, previamente a la obtención de los cortes, debemos incluir y orientar el tejido problema en el bloque.

f) La sección microscópica. Los cortes del bloque pueden realizarse de forma seriada o a demanda, pero lo más importante es que representen la totalidad del tejido a estudio. Estas secciones, de entre $2\text{-}3\text{ }\mu\text{m}$ de grosor, se depositan sobre portaobjetos para su tinción.

g) Hidratación. En el caso de que los colorantes utilizados en la tinción sean hidrófilos, deberemos proceder previamente a la rehidratación de los cortes según los protocolos habituales. Se colocan en portaobjetos con la ayuda de un baño de flotación donde hay agua y aditivos adherentes, que son necesarios para evitar que los tejidos se despeguen de los portaobjetos donde están depositados, en los diferentes pasos de la tinción.

h) Tinciones. En la actualidad la utilizada de forma más rutinaria es la H-E que junto con el PAS y el Grocott (variación de impregnación argéntica), constituyen la tripleta básica de tinciones para el estudio de las micosis. Tinciones opcionales son la de Fontana-Masson, para el estudio de pigmento melánico, importante en las feohiomicosis y las tinciones para mucopolisacáridos, como la de mucicarmin, básicas para el estudio de *Cryptococcus* spp. y otros hongos que en su pared o cápsula contengan glucoproteínas.

i) En la actualidad disponemos de un amplio abanico de **técnicas histoquímicas, inmunohistoquímicas y moleculares** que permiten conseguir unos resultados más precisos, por ser estudios más dirigidos hacia el diagnóstico de esta patología.

C) Autopsia. Facilita el estudio más completo y en detalle de la enfermedad. Permite observar macroscópicamente los cambios patológicos producidos por la infección fúngica en los diferentes órganos pudiéndose evaluar su extensión, las características de la lesión y el daño producido. Se puede determinar si una micosis afecta una cavidad, si produce lesión necrótica, purulenta o si son varios los puntos de infección (Figura 4). Además, permite seleccionar el material más adecuado para la realización de improntas, extensiones, cultivos, etc. Cabe destacar que gracias a este estudio se podrán precisar las causas de la muerte, diagnosticar todos los trastornos y ser un material muy importante para la docencia.

Las micosis bajo el microscopio del patólogo

Hay dos grandes grupos de hongos que afectan al hombre, los saprofitos y los patógenos [4,14,16,19,51,56]. Se considera a un hongo como patógeno cuando produce daño tisular. Ninguna lesión histopatológica es específica de las micosis, pudiéndose hallar un variado espectro de lesiones inflamatorias. Es muy importante valorar el potencial inmunológico del paciente, que en muchos casos suele estar disminuido debido a que las micosis son mucho más frecuentes en pacientes inmunodeprimidos. Este déficit de defensas condiciona el grado de respuesta del organismo ante estos agentes patógenos. Como ya se ha comentado, para que se produzca una lesión deben existir una serie de factores que la favorezcan como son la inmunidad del huésped, la virulencia, la cantidad de células fúngicas y la coexistencia de otras enfermedades. La primera respuesta que el organismo produce es una inflamación supurativa por el infiltrado de polimorfonucleares, para posteriormente pasar a una respuesta de células mononucleares y, si evoluciona, presentar macrófagos, células epitelioides y células gigantes multinucleadas, dando lugar a una infección crónica y a fibrosis. Sin embargo, todo esto puede estar atenuado si en el paciente coexiste una enfermedad inmunosupresora. La lesión más característica es la granulomatosa con células gigantes multinucleadas, estimulada por una respuesta inmune tipo IV o respuesta celular [36] (Figura 5).

El patólogo puede observar a los hongos con dos morfologías básicas, con una disposición tubular o hifas (multicelular) y una segunda de forma redondeada u oval que correspondería con las esporas o conidios (unicelular). Estas formas, a su vez, pueden ser pigmentadas o no [4,14,16,39,55]. Conocidos los cambios tisulares que se producen en los tejidos y las diferentes morfologías, podemos pasar a clasificarlos. En relación a estas características, el patólogo puede identificar y diagnosticar infecciones por hongos pertenecientes a alguno de estos cuatro grupos: dimorfos, patógenos clásicos, patógenos oportunistas emergentes y otros [4,16,19,39,55,56] (Figura 6).

1) Hongos dimorfos

En este grupo describimos las cuatro micosis ya clásicas, frecuentes en otras latitudes, sobre todo en América. A pesar de ser inusuales en nuestro entorno, son fáciles de diagnosticar por su particular morfología, pudién-

dose realizar un diagnóstico preciso tanto en las muestras citológicas como en las biópsicas.

Histoplasmosis. Hay dos formas de presentación: la americana (clásica) y la africana, con rasgos morfológicos bien diferenciables entre ellas. La americana está producida por *Histoplasma capsulatum*, el hongo de menor tamaño que se observa en el ámbito humano y de otros animales, que penetra en el organismo por inhalación de conidios que rápidamente se diseminan por vía hematólogica provocando infección intracelular. Su tamaño entre 1-3 μm , con forma de levadura, lo hace claramente diferenciable de otros hongos. Siempre lo observaremos en el interior de macrófagos, en forma de pequeñas células con un fino halo alrededor. El diagnóstico diferencial primordial es con *Leishmania*: ésta se tiñe con la tinción de Giemsa e *Histoplasma* es positivo con PAS y Grocott, produciéndose un halo claro alrededor de las células en Giemsa. La otra forma de presentación es la africana, producida por *Histoplasma duboisii*, de mayor tamaño, entre 7 y 12 μm , con esporas gemantes de gruesa pared y alguna inclusión lipídica. Estos no son intracelulares, salvo que estén fagocitados por células gigantes multinucleadas, en el contexto de una lesión granulomatosa. El diagnóstico diferencial de esta especie se realiza con la lobomycosis; sin embargo, el tipo de lesión que produce y su hábitat geográfico son muy importantes para el diagnóstico [21,45].

Blastomycosis. Como todas las micosis de este grupo la localización principal es pulmonar, ya que la infección se produce por la inhalación de los conidios. *Blastomyces dermatitidis* se puede diseminar por vía hematógena a otros órganos, especialmente a la piel. En las secciones teñidas con H-E, entre un componente inflamatorio crónico granulomatoso o supurativo, se observan estructuras ovales o redondeadas de entre 7-15 μm con pared gruesa de doble contorno (dato muy importante y diferencial) y en su citoplasma se puede observar material basófilo amorfo y destaca algún núcleo (Figura 7). Pueden verse gemaciones unipolares únicas con amplia base de implantación, y todo ello es más manifiesto con las tinciones de PAS y Grocott. El diagnóstico diferencial más importante es con *H. duboisii* y se realiza por su gemación, que en este caso es de base muy estrecha y también se debe tener en cuenta la zona geográfica donde se origina la infección, que básicamente es América. Asimismo puede confundirse con *Paracoccidoides brasiliensis*, pero en esta última especie las gemaciones son múltiples [4,16,58].

Paracoccidoidomycosis. A pesar de tener un área de distribución localizada en Centroamérica y Sudamérica, se están describiendo casos importados de infecciones por *P. brasiliensis* en España y en otros países europeos. La afectación principal es pulmonar, seguida por las lesiones en mucosas bucal o nasal y en la piel. En las lesiones se puede hallar un componente inflamatorio crónico con fibrosis, células gigantes multinucleadas y células fúngicas de gruesa pared, que tiene entre 10-60 μm , con pequeñas y múltiples gemaciones de base de implantación estrecha dispuestas en forma de "timón de barco" muy fácilmente reconocibles mediante tinción de Grocott (Figura 8). Esta técnica de plata es imprescindible para el diagnóstico ya que, en algunos casos, las características mencionadas no se observan en las tinciones de H-E y de PAS [1,17,22,24].

Coccidoidomycosis. Producida por *Coccidioides immitis*, se localiza fundamentalmente en América, tanto del norte como del sur, aunque también se están describiendo casos en otros países, como España [33]. La

afectación más importante es pulmonar, donde pueden observarse granulomas supurativos, consistentes en una reacción inflamatoria crónica con células gigantes a la que se unen elementos polinucleares. Esta lesión es debida a que las esférulas de los hongos (hallazgo típico) pueden llegar a romperse y liberar endosporas que filtran los tejidos dando una respuesta inflamatoria aguda. Las esférulas son de gran tamaño, 20-200 μm , observándose en diferentes estadios evolutivos, visibles con H-E, pero consiguiéndose una observación más detallada en las tinciones de PAS y Grocott. En su interior se pueden observar múltiples endosporas redondeadas de 2-5 μm (Figura 9). Hay que diferenciarlas de *Rhinosporidium seeberi*, cuya localización orgánica es en zonas nasal u ocular, produciendo típicas lesiones polipoides. También hay que tener presentes otras micosis como la adiaspiromycosis y la infección por algas del género *Prototheca* spp., pero ambas tienen características morfológicas diferentes [10,33,50].

2) Hongos más frecuentes en nuestro entorno

Queremos describir en este apartado algunas peculiaridades de los hongos más conocidos y con mayor incidencia en nuestro país, como son *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Cryptococcus* spp. y los agentes de las zigomicosis.

Candidiasis. *Candida* es el género más habitual que suele observar el patólogo, ya sea en citologías o biopsias, siendo muchas veces detectado en portadores sanos. Es un importante agente infeccioso que se localiza en mucosas. Es fácil observarlo en citologías ginecológicas donde se pueden encontrar células levaduriformes, hifas o pseudohifas acompañadas de polimorfonucleares, dispuestas entre células escamosas que suelen mostrar cambios reactivos inflamatorios. Son menos frecuentes en esputos o secreciones pulmonares, pero pueden ser observadas en pacientes mayores, con alguna patología inmunosupresora. En biopsias del tracto respiratorio alto o gastrointestinales, no es infrecuente hallarlas colonizando otros procesos patológicos como úlceras o tumores. En piel presentan el aspecto histológico de una dermatitis subaguda o crónica, pudiendo ser observado el hongo en capas córneas, sobre todo con PAS y Grocott. La candidiasis sistémica se puede hallar en múltiples localizaciones orgánicas o presentarse como sepsis diseminada, no solo en adultos, sino también en niños prematuros sometidos a cuidados intensivos [43]. Su diseminación es hematógena, como la práctica totalidad de las micosis, y no es infrecuente observar embolizaciones vasculares, aunque éstas son más habituales en aspergilosis y zigomicosis. Se pueden observar focos de necrosis con mayor o menor respuesta inflamatoria (deendiendo del estado inmunológico del paciente) y células ovales de 4 a 8 μm con una o varias gemaciones, acompañadas por hifas o pseudohifas finas y tabicadas, visibles con H-E y también con tinción de Gram, aunque son más fácilmente observables con PAS o Grocott. Las características morfológicas de *Candida* facilitan su diagnóstico, pero siempre debería ser confirmado por los cultivos, sobre todo para diferenciar la especie. *Candida glabrata*, se suele observar en tomas citológicas ginecológicas y se presenta como pequeñas células de 2-4 μm , sin presencia de formas pseudomiceliales y poca respuesta inflamatoria (Figura 10). El diagnóstico diferencial, sobre todo en el material obtenido a nivel pulmonar, debe de realizarse con *H. capsulatum* y *Pneumocystis carinii*. Observar los hongos intracelularmente es específico de *H. capsulatum* y poseer forma oval y zona central densa es un rasgo característico de *P. carinii*. En muestras cutáneas, se tiene que

diferenciar de los dermatofitos: éstos poseen hifas mayores y pleomorfas. Para confirmar el diagnóstico, además del cultivo, podemos realizar técnicas de inmunohistoquímica con anticuerpos monoclonales específicos de género, que además de ser de los pocos anticuerpos comercializados poseen un notable poder de resolución [19,56,58].

Aspergilosis. *Aspergillus* además de ser causa de patologías alérgicas o de otros procesos patológicos, es un agente colonizador de cavidades y productor de aspergilosis invasora. El patólogo ocasionalmente se encuentra con aspergilomas o masas fúngicas con asiento en patologías crónicas con cavitaciones, como pueden ser las cavernas tuberculosas, bronquiectasias, así como en senos paranasales obstruidos. Histológicamente se observan multitud de hifas apiladas pudiéndose observar también la presencia de las cabezas conidiales, que permiten reconocer la especie más frecuente, *Aspergillus fumigatus*. Las cabezas conidiales solamente las hallaremos si la lesión tiene o ha tenido contacto con el aire. Un dato muy importante en los aspergilomas, es que no invaden el parénquima vecino, pudiéndose valorar como saprófitos. La aspergilosis invasora es una micosis importante en nuestro medio y grave en pacientes inmunodeficientes, sometidos a cuidados intensivos, trasplantes o terapias agresivas. Su localización principal es pulmonar, produciendo unos característicos infartos hemorrágicos, que ya hacen sospechar esta patología cuando observamos macroscópicamente el pulmón. En su estudio histológico presenta una disposición radial de las hifas, con tejido necrotico-hemorrágico a su alrededor y una respuesta inflamatoria variable, sobre todo crónica con células gigantes multinucleadas que pueden estar fagocitando las células fúngicas. Las hifas se disponen de forma paralela y son septadas, con una distribución a intervalos regulares, de entre 3 y 6 µm de grosor y muchas veces con ramificaciones en ángulo agudo de 45°, siendo este detalle interpretado por muchos patólogos como determinante para su diagnóstico, aunque hay un buen grupo de hialohifomicosis que tienen idéntica apariencia, como son las provocadas por *Fusarium*, *Scedosporium* o *Trichoderma*, y de ellas se deben diferenciar. Por su capacidad angioinvasora, *Aspergillus* puede diseminarse a otros órganos como cerebro, riñones, bazo e hígado, donde se localizan las metástasis en las necropsias. En esta fase, con los tejidos en fresco, se deben realizar extensiones, confirmar la presencia de hongos, proceder a su cultivo y guardar tejido en fresco. Hay que recordar que es sumamente raro poder observar cabezas conidiales en las secciones histológicas de las muestras. Para la confirmación del diagnóstico son esenciales los cultivos, aunque en el momento actual se dispone de anticuerpos específicos para la realización de estudios de inmuno-histoquímica, que son altamente resolutivos [4,16,39,52] (Figura 11).

Zigomicosis. Frecuentemente llamada mucormicosis por muchos patólogos, es una de las micosis más fácilmente reconocible con H-E. La presencia de hifas irregulares, anchas, de pared delgada y no septadas, con ramificaciones irregulares, normalmente en ángulo de 90°, son los rasgos morfológicos que se destacan preferentemente mediante la tinción de Grocott (Figura 12). Es muy frecuente hallarlas embolizando vasos, acompañadas de necrosis, donde las hifas atraviesan las paredes arteriales o se disponen entre las capas musculares. Son hifas anchas de entre 15-30 µm, pudiendo observarse también algunos esporangios. Se localiza frecuentemente en la región rinosinusal, sobre todo en pacientes diabéticos con acetosis. Puede llegar a invadir la base del cráneo y afectar el sistema nervioso central (SNC). Sin embargo, cualquier localización es posible, incluso la gastrointestinal (por inges-

ción). La confirmación la podemos realizar por medio de técnicas de inmuno-histoquímica y por cultivo [15,56,58].

Criptococosis. La especie causante *Cryptococcus neoformans* posee una característica única que la hace fácilmente distinguible: su cápsula de mucina de entre 2-20 µm de grosor (Figura 13). Dicha estructura se pone de relieve con las tinciones histoquímicas para mucoproteínas, como es la técnica de mucicarmin. En cambio, no se colorea con Giemsa, Gram, PAS o Grocott. En H-E se observa una célula encapsulada de tamaño considerable, entre 3-8 µm con gemación uni o multipolar, de pared no muy gruesa y un gran halo claro a su alrededor que la separa del tejido, donde hay una mayor o menor respuesta inflamatoria de polimorfonucleares, dependiendo del estado inmunitario del huésped. Normalmente la respuesta inflamatoria es escasa, ya que la mayor incidencia de esta micosis se da en pacientes con SIDA. Otra de las características es su gran tropismo por el SNC, sobre todo por las meninges, pudiéndose diagnosticar la infección por medio de estudio citológico del LCR, mediante coloración con tinta china, aunque en un 50% puede que no sea efectiva. Si la afectación es cerebral produce abscesos, granulomas o incluso pequeños quistes gelatinosos. Son poco frecuentes los casos diseminados con afectación multiorgánica, presentándose sobre todo en pacientes con SIDA. En estos casos se observan las mismas características morfológicas pero localizadas en pulmón, riñón, hígado, bazo, etc. Su diagnóstico diferencial no tiene dificultad por las peculiaridades descritas, que son únicas, pero hay que tener en cuenta que *B. dermatitidis* y *R. seeberi* pueden también dar positivo con la tinción de mucina. En estos casos, la realización de una tinción de Fontana-Masson ayuda mucho en su diferenciación ya que *C. neoformans* es positivo para la tinción de pigmento melánico. Para finalizar, comentar que *C. neoformans* var. *gattii* tiene las mismas características, si bien su forma es más alargada cuando se observa a gran aumento [4,5,13,35,62].

3) Hongos emergentes

Nos referimos especialmente a aquellos hongos que en la actualidad están adquiriendo gran relevancia por su mayor frecuencia. Son oportunistas, habitualmente no patógenos, pero los pacientes neutropénicos, inmunodeficientes, sometidos a agresiones médicas o trasplantes, frecuentemente pueden ser infectados por estos hongos, no por su especial virulencia, sino por el deficiente estado de las defensas, ya sean primarias o secundarias. Se pueden presentar bien como micosis localizadas o bien sistémicas. La mayoría son hongos miceliares hialinos (productores de hialohifomicosis), aunque también puede tratarse de hongos pigmentados (productores de feohifomicosis). No describiremos en este apartado los hongos levaduriformes que causan lesiones superficiales y que, en casos excepcionales, han llegado a desarrollar micosis sistémicas, como *Malassezia furfur*, *Saccharomyces cerevisiae*, o *Rhodotorula rubra* entre otros. Nos vamos a ceñir a los emergentes más frecuentes como *Fusarium*, *Scedosporium*, *Paecilomyces*, *Scopulariopsis*, *Acremonium*, *Trichoderma*, *Alternaria*, *Cladophialophora*, etc. Precisamente, es con estos hongos con los que nuestro grupo tiene una larga experiencia, tanto en el ámbito clínico como en el experimental [3,20,26-28,43,44,48,53]. Histológicamente son muy difíciles de diagnosticar y diferenciar entre ellos, y es más probable que sean confundidos con *Aspergillus*. El rasgo morfológico más importante para su diferenciación consiste en la observación de los conidios, pero otros rasgos morfológicos que

pueden ser fundamentales para su identificación, como la conidiogénesis, son difíciles de observar en biopsias o citologías. En nuestra experiencia *Scedosporium proliferans* es uno de los hongos que permite la observación de células conidiógenas y conidios que facilitan su diagnóstico. La característica de hifas monomorfas, septadas y presencia de ocasionales conidios con forma de pera, emergiendo de células conidiógenas, son indicativos de esta especie [7]. Estos hongos muestran cierto tropismo por SNC y riñón [8], siendo las lesiones que produce de tipo granulomatoso. También es conveniente aportar que son más sensibles a los nuevos fármacos azólicos que a los tratamientos convencionales con anfotericina B [9,49]. Otro de ellos, *Fusarium* spp. es muy difícil o casi imposible de diferenciar, ya que ni en biopsias ni en estudios con animales de experimentación se ha observado la formación de macro o microconidios [25], aunque sí se ha podido constatar un tropismo por el tejido muscular estriado (cardíaco o de contracción voluntaria) en la primera semana de infección y, posteriormente, un tropismo por SNC, riñón e, incluso, por el ojo [44] (Figura 14). Con *Paecilomyces* y *Scopulariopsis*, la información obtenida en nuestras experimentaciones ha sido escasa, salvo por el tipo de lesión y su tropismo por riñón [2]. Podemos matizar que, ante un hongo de características miceliales, debe realizarse estudio inmunohistoquímico para diferenciarlo de *Aspergillus* y una tinción de Fontana-Masson o bien de inmunohistoquímica con HMB-45 para detectar el pigmento melánico en la pared de los hongos y etiquetarlos como feohifomicosis, porque también están emergiendo hongos dematiáceos, sobre todo *Alternaria*, *Cladophialophora*, *Phaeoacremonium* [40,49] (Figura 15). Estas técnicas son imprescindibles ya que con H-E es muy raro observar la pigmentación, e imposible con PAS y Grocott.

Indudablemente, la posibilidad de realizar un cultivo o técnicas de biología molecular, en el momento actual, constituye una gran ayuda para poder realizar un diagnóstico preciso sobre cualquier hongo de los mencionados en este apartado. Sin duda si se consiguen nuevos anticuerpos monoclonales o aplicar las técnicas de biología molecular a las muestras parafinadas, podría ser posible llegar a un diagnóstico similar al que se realiza por medio de los cultivos.

4) Hongos potencialmente diagnosticables

En este apartado describimos una serie de micosis que, por sus signos clínicos, hacen posible su diagnóstico. Entre los más destacables están las siguientes:

Cromomicosis. Son infecciones en piel y tejido celular subcutáneo presentándose en forma de nódulos o lesiones verrucosas de evolución crónica, especialmente afectando a las extremidades inferiores. En zonas tropicales o subtropicales, las personas que tienen contacto con restos vegetales, como los campesinos, pueden sufrir frecuentemente microtraumas o pinchazos, y de una manera lenta pueden desarrollar estas micosis. Son hongos pigmentados (pertenecientes a las especies *Fonsecaea pedrosoi*, *Cladosporium carrionii*, *Phialophora verrucosa*, *Fonsecaea compacta* o *Rhinocladiella aquaspersa*). En H-E se observa una hiperplasia pseudoepiteliomatosa con hiperqueratosis, microabscesos epidérmicos y, en dermis e hipodermis, una inflamación granulomatosa supurativa con células gigantes y epitelioides, así como con neutrófilos, linfocitos y plasmocitos. En el interior de las células gigantes multinucleadas o libremente se observan estructuras esféricas de color pardo de 10-15 μm con doble pared

y tabiques transversales, que habitualmente se disponen agrupadas en varios elementos dando formación de los cuerpos esclerotalos o fumagoides (forma de mórula) que diagnostican a esta micosis [4,16,56].

Esporotricosis. Producida por un hongo dimorfo que puede causar lesiones subagudas o crónicas. La especie causal es *Sporothrix schenckii*, con conidios pequeños, fusiformes de 2 a 8 μm , que produce lesiones subcutáneas. Las lesiones son múltiples y adquieren un patrón lineal o disposición linfática. Producen granuloma mixto de centro supurativo o necrótico con células epitelioides, gigantes multinucleadas y corona linfoplasmocitaria. Es en el centro donde se pueden observar las células fúngicas con forma de cuerpos asteroides, más visibles en estadios iniciales de la lesión o en enfermos con marcada inmunodeficiencia. Son difíciles de hallar en las biopsias convencionales, ya que se deben realizar muchas secciones para su observación. Son de apariencia globosa con una corona de elementos radiados acidófilos que producen un fenómeno de Splendore-Hoepli. Con PAS se tiñen fuertemente de color rojo púrpura [16,56,58].

Lobomicosis. Infección producida por *Lacazia loboi*, hongo que no ha podido ser cultivado, y que produce lesiones queloides en hombres y delfines. Su hábitat es acuático y la mayoría de pacientes infectados tiene relación con este medio. Se localiza frecuentemente en la zona baja de la espalda y causan lesiones elevadas, nodulares, en ocasiones ulceradas. La epidermis presenta hiperplasia con atrofia de anejos y la dermis superficial posee una nítida banda de tejido colágeno que separa la epidermis del infiltrado inflamatorio crónico profundo. Pueden hallarse células gigantes multinucleadas que fagocitan las células fúngicas. Estos elementos son muy abundantes, esféricos de 5-8 μm con pared de doble contorno y de tamaño uniforme que producen una peculiar característica consistente en la formación de pequeñas cadenas de 3 a 5 elementos, poco visibles en H-E y sí con PAS o Grocott (Figura 16). Si se observan a gran aumento muchos de ellos tienen una forma de casquete o media luna que los hacen fácilmente diferenciables de *H. duboisii*, aunque la clínica y la zona geográfica, son datos importantes ya que *L. loboi* se localiza en la zona central de América del sur y, sobre todo, en Brasil y Venezuela [12,13,58].

Rinosporidiosis. Producida por *Rhinosporidium seberi*, que presenta también su hábitat en aguas estancadas. Produce lesiones verrucosas, nodulares o polipoides en las mucosas, preferentemente nasal u ocular. Bajo un epitelio poco modificado se observa presencia de endosporas, esporangios, esporangios rotos o formas inmaduras con mayor o menor respuesta inflamatoria crónica. Las endosporas miden 7 μm , pero las formas más características y específicas son los esporangios de gran tamaño, de 250-350 μm , que contienen numerosas endosporas. La pared de los esporangios es de 5 μm y tiene una cubierta interna que se tiñe con mucicarmín. Se observan bien con H-E, pero como en toda micosis, son más específicas las tinciones de PAS y Grocott. El diagnóstico diferencial se debe de realizar con *C. immitis* y adiaspiromicosis [56,58].

Adiaspiromicosis. Está causada preferentemente por *Chrysosporium* spp. Presenta un solo elemento con endosporas en diferentes fases de maduración o degeneración. Posee respuesta granulomatosa alrededor de cada elemento que puede medir desde 500 μm a 2 mm. En ella destaca la presencia de una gruesa pared con tres capas concéntricas visibles con las tres tinciones básicas para el estudio de las micosis, H-E, PAS y Grocott [4,16,56,58].

Micetomas. Clínicamente se presentan como nódulos subcutáneos persistentes, de localización básica en pies o piernas, que llegan a fistulizarse produciendo una secreción purulenta en la que se observan numerosos gránulos de color blanco-amarillento que corresponden a microcolonias. Las lesiones progresan por contigüidad y se hacen confluyentes y más grandes, llegando a deformar la zona de afectación. Se observa una marcada respuesta inflamatoria mixta pero, sobre todo, de células gigantes multinucleadas. En el centro de la lesión hay agrupamientos de hifas de hongos, dispuestas de forma radial y que en periferia producen un fenómeno de Splendore-Hoeppli. Los agentes causantes son diversos hongos pigmentados o no pigmentados, a destacar *Madurella* spp. o *Scedosporium apiospermum*, entre muchos otros, que producen el llamado eumicetoma. Debe diferenciarse de los actinomicetomas (producidos por actinomicetos) y los botriomicomas por bacterias (estafilococos, *Pseudomonas*) [12,13,51].

Pneumocistosis. *P. carinii*, actualmente *Pneumocystis jiroveci*, fue considerado durante bastante tiempo un protozoo. Con PAS y, sobre todo, con Grocott, se observa la presencia de agrupamientos de diversas esporas ovales con una muesca central, de 5-7 μm , siempre acompañadas por material mucoproteico. Son visibles en citologías de esputos inducidos o mejor de lavados broncoalveolares y en las biopsias pulmonares, donde se observan a nivel intraalveolar y también entre el material proteico. Pueden hallarse fuera del pulmón, habiéndose descrito en ganglios, bazo e incluso en SNC, como nosotros pudimos observar hace unos años en el estudio de autopsia de un paciente con SIDA [42].

Finalmente, para realizar un buen estudio histopatológico en las micosis, es necesario proceder con cautela en el diagnóstico, realizar muchas secciones de la pieza biopsiada, ya que la morfología puede variar dependiendo de la zona, disponer de buenas técnicas para obtener óptimas morfologías, tener mucha paciencia y buscar detalles mínimos y profundizar en su estudio [60,63,64]. Con todo esto se puede llegar a identificar varios de los géneros y especies más usuales, como ya se ha relatado, pero sobre todo hay que ser prudentes y correlacionar los resultados con los cultivos y la clínica. Indudablemente, las nuevas técnicas moleculares y de inmunohistoquímica que se están instaurando en los laboratorios de patología, van a ayudar mucho en la realización de un diagnóstico correcto.

A los Dres. Josep Guarro Artigas y José Cano Lira, de la Universitat Rovira i Virgili, por la revisión, corrección y consejos en la confección de este trabajo.

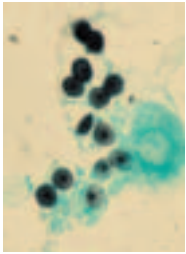


Figura 1. *Pneumocystis carinii*. Esporas ovales con zona central densa. Biopsia de pulmón en paciente con SIDA (Grocott, x1.000).

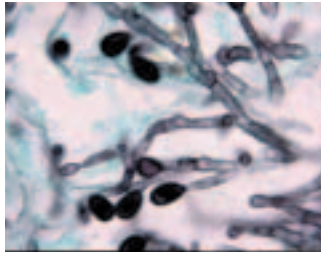


Figura 2. *Scedosporium prolificans*. Proliferación de hifas septadas y tabicadas de donde emergen conidios ovales con forma de pera (Grocott, x1.000).

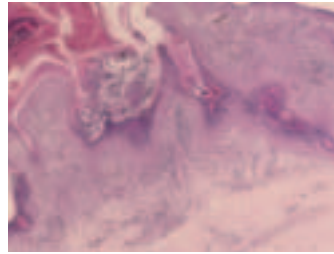


Figura 3. Biopsia cutánea donde se observa hiperplasia pseudocarcinomatosa del epitelio y en dermis superficial un componente inflamatorio crónico con presencia de células gigantes multinucleadas (H-E, x25).

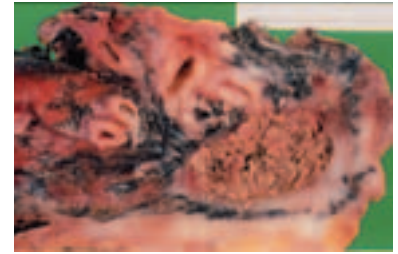


Figura 4. Pieza de pulmón en autopsia. En su centro hay una gran cavidad totalmente ocupada por masa fúngica o aspergiloma. Fibrosis a su alrededor.

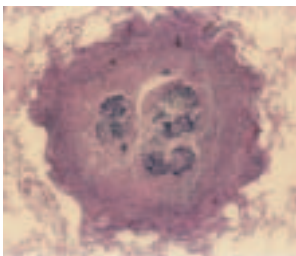


Figura 5. Biopsia de pulmón. Lesión abscesificada de centro necrótico con abundantes formas micóticas rodeadas por componente inflamatorio crónico (H-E, x25).

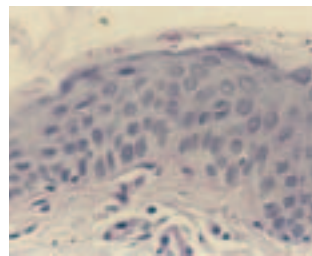


Figura 6. Biopsia de piel mostrando micosis superficial. En la capa córnea de epidermis se observan varias hifas (PAS, x100).

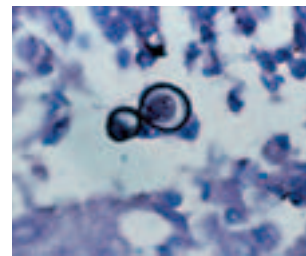


Figura 7. Blastomicosis. Imagen característica de *Blastomyces dermatitidis* con pared de doble contorno y material basofílico amorfo en su interior (Grocott, x1.000).

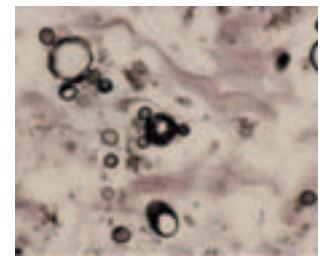


Figura 8. *Paracoccidioides brasiliensis*. Destaca la presencia de dos grandes esporas con varias gemaciones de base fina que le dan un aspecto de "timón de barco". (Grocott, x1.000).

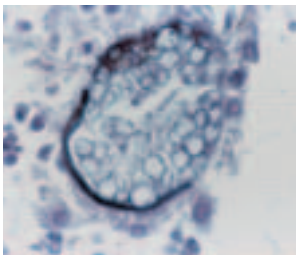


Figura 9. Esférula de gran tamaño rota liberando endosporas que corresponden a *Coccidioides immitis* (Grocott, x1.000).

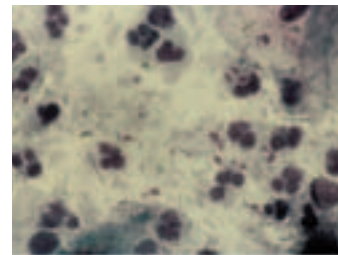


Figura 10. Citología vaginal. Entre algunas células escamosas y polimorfonucleares, se observa flora bacilar y esporas de pequeño tamaño con fino halo claro a su alrededor (Papanicolaou, x1.000).

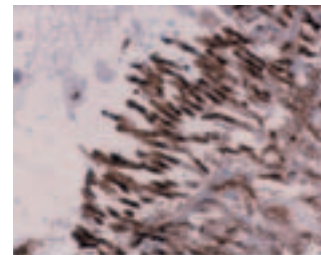


Figura 11. Biopsia de pulmón. Numerosas hifas septadas positivas a anticuerpo monoclonal de *Aspergillus* (Inmunohistoquímica, x400).

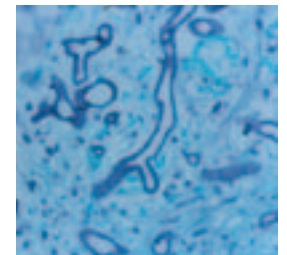


Figura 12. Zigomicosis. Hifas grandes, no septadas, de grosor variable y ramificadas en ángulo recto (Grocott, x1.000).

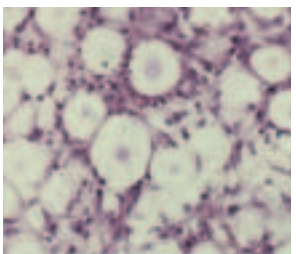


Figura 13. *Cryptococcus neoformans* en meninges. Esporas redondeadas, rodeadas de un gran halo claro rico en mucopolisacáridos (H-E, x1.000).

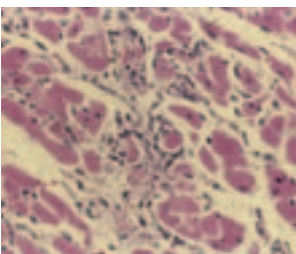


Figura 14. Sección de miocardio donde se observa la presencia de abundantes hifas de *Fusarium solani* con poca respuesta inflamatoria acompañante (H-E, x100).

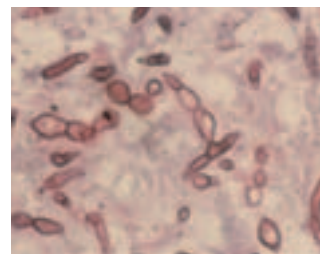


Figura 15. Feohifomicosis. *Cladophialophora bantiana* en absceso cerebral. Tinción para pigmento melánico (Fontana-Masson, x1.000).

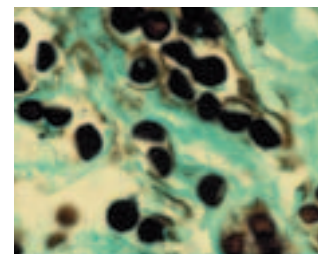


Figura 16. *Lacazia loboi*. Esporas en forma de casquete con pequeños agrupamientos enlazados de dos o tres elementos celulares (Grocott, x1.000).

Bibliografía

- Achenbach R, Negróni R, Khaski S, Lococo L, Beresnak A, Gai L. Paracoccidioidomycosis: unusual clinical presentation and utility of computerized tomography scanning for diagnosis. *Int J Dermatol* 2002; 41:881-882.
- Aguilar C, Pujol I, Sala J, Guarro J. Antifungal susceptibilities of *Paecilomyces* species. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42:1601-1604.
- Aguilar C, Pujol I, Guarro J. In vitro antifungal susceptibilities of *Scopulariopsis* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:1520-1522.
- Anaissie EJ, McGinnis MR, Pfaller MA. *Clinical Mycology*. New York, Churchill Livingstone, 2003.
- Bava AJ, Negróni R, Arechavala A, Robles AM, Bianchi M. Cryptococcosis associated with AIDS in the Muñiz Hospital of Buenos Aires. *Mycopathologia* 1997; 140:13-17.
- Bouza E, Muñoz P. Invasive infections caused by *Blastoschizomyces capitatus* and *Scedosporium* spp. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10S:76-85.
- Cabañes FJ, Rourax X, Gracia F, Domingo M, Abarca ML, Pastor J. Nasal granuloma caused by *Scedosporium apiospermum* in a dog. *J Clin Microbiol* 1998; 36:2755-2758.
- Cano J, Guarro J, Mayayo E, Fernández-Ballart J. Experimental infection with *Scedosporium inflatum*. *J Med Vet Mycol* 1992; 30:413-420.
- Capilla J, Yustes C, Mayayo E, Fernandez B, Ortoneda M, Pastor FJ, Guarro J. Efficacy of Albacozazole (UR-9825) in treatment of disseminated *Scedosporium prolificans* infection in rabbits. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:1948-1951.
- Caraway NP, Fanning CV, Stewart JM, Tarrand JJ, Weber KL. Coccidioidomycosis osteomyelitis masquerading as a bone tumor: A report of 2 cases. *Acta Cytol* 2003; 47:777-782.
- Chan PKS, Chan DPC, To KF, Yu MY, Cheung JLK, Cheng AF. Evaluation of extraction methods from paraffin wax embedded tissues for PCR amplification of human and viral DNA. *J Clin Pathol* 2001; 54:401-403.
- Costa Sidrim JJ, Bezerra Moreira JL. Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica. Rio de Janeiro, Guanábana Koogan Ed., 1999.
- Da Silva Lacaz C, Porto E, Costa Martrus JE, Heins-Vaccari EM, Takahashi de Melo N. Tratado de Micología Médica Lacaz. Sao Paulo, Sarvier, 2002.
- De Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. Atlas of Clinical Fungi. 2nd Ed. Baarn/Reus, Centralbureau voor Schimmelcultures/Universitat Rovira i Virgili, 2000.
- Deshpande AH, Munshi MM. Rhinocerebral mucormycosis diagnosis by aspiration cytology. *Diagn Cytopathol* 2001; 23:97-100.
- Dismukes WE, Pappas PG, Sobel JD. *Clinical Mycology*. Oxford, Oxford University Press, 2003.
- Drut R. Paracoccidioidomycosis: diagnosis by fine needle aspiration cytology. *Diagn Cytopathol* 1995; 13:52-53.
- Elder D, Elenitsas R, Jaworsky C, Jonhson B. *Lever Histopatología de la piel*. 8ª Ed. Buenos Aires, Intermédica, 1999.
- Ellis DH. *Clinical mycology. The human opportunistic mycoses*. New York, Pfizer Inc., 1994.
- Fernández-Torres B, Mayayo E, Boronat J, Guarro J. Subcutaneous infection by *Microsporium gypseum*. *Brit J Dermatol* 2002; 146:311-313.
- Flor A, Estivill D, Pérez R, Ordeig J, Ramos F, Soler J, Puig X. Histoplasmosis pulmonar aguda en un viajero español a Nicaragua: Ejemplo de enfermedad importada. *Rev Iberoam Micol* 2003; 20:24-28.
- García Bustinduy M, Guimera FJ, Arévalo P, Castro C, Saez M, Dorta Alom S, Noda A, Diaz-Flores L, Garcia Montelongo R. Cutaneous primary paracoccidioidomycosis. *J Eur Dermatol Venereol* 2000; 14:113-117.
- García del Moral R. El laboratorio de Anatomía Patológica. Madrid, Interamericana, McGraw-Hill, 1993.
- Ginarte M, Pereiro M, Toribio J. Imported paracoccidioidomycosis in Spain. *Mycoses* 2003; 46:407-411.
- Guarro J, Pujol I, Mayayo E. In vitro and in vivo experimental activities of antifungal agents against *Fusarium solani*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 35:245-247.
- Guarro J, Gene J, Stchigel AM. Developments in fungal taxonomy. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12:454-500.
- Guarro J, Cano J, Tapiol J, Aguilar C, Mayayo E. *Microspheeropsis olivacea* as an etiological agent of human skin infection. *Med Mycol* 1999; 37:133-137.
- Guarro J, Alves SH, Gene J, Graziotin NA, Mazzucco R, Dalmagro C, Capilla J, Zoror L, Mayayo E. Two cases of subcutaneous infection due to *Phaeoacremonium* spp. *J Clin Microbiol* 2003; 41:1332-1336.
- Gupta S, Sidhani P, Jain S. Macroconidia of *Fusarium* species. An unusual finding in cervical smears. *Acta Cytol* 2001; 45:411-414.
- Hagari Y, Ishioka S. Cutaneous infection showing sporotrichoid spread caused by *Pseudallescheria boydii* (*Scedosporium apiospermum*): Successful detection of fungal DNA in formalin-fixed, paraffin-embedded sections by seminester PCR. *Arch Dermatol* 2002; 138:271-272.
- Hamilton AJ, Gomez BL. The application of monoclonal antibodies to the diagnosis of disseminated mycoses. *Rev Iberoam Micol* 1998; 15:118-124.
- Hayden RT, Qian X, Procop GW, Roberts GD, Lloyd RV. In situ hybridization for the identification of filamentous fungi in tissue section. *Diagn Mol Pathol* 2002; 11:119-126.
- Hernández JL, Echevarría S, García-Vaultuille A, Mazorra F, Salesa R. Atypical coccidioidomycosis in an AIDS patient successfully treated with fluconazole. *Eur J Microbiol Infect Dis* 1997; 16:592-594.
- Jensen HE, Salonen J, Eklors TO. The use of immunohistochemistry to improve sensitivity and specificity in the diagnosis of systemic mycoses in patients with haematological malignancies. *J Pathol* 1997; 181:100-105.
- Kumar S, Ferns S, Jativa L. A rare case of cryptococcosis diagnosed by fine needle aspiration cytology. *Acta Cytol* 2003; 47:528-529.
- Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. *Robbins Patología Humana*. 7ª Ed. Madrid, Elsevier, 2004.
- Kaufman L. Immunohistologic diagnosis of systemic mycoses: an update. *Eur J Epidemiol* 1992; 8: 377-382.
- Kaufman L, Standard PG, Jalbert M, Kraft DE. Immunohistologic identification of *Aspergillus* spp. and other hyaline fungi by using polyclonal fluorescent antibodies. *J Clin Microbiol* 1997; 35:2206-2209.
- Larone DH. *Medically important fungi*. 4th Ed. Washington DC, ASM Press, 2003.
- Liu K, Howell DN, Perfect JR, Schell WA. Morphologic criteria for the preliminary identification of *Fusarium*, *Paecilomyces*, and *Acremonium* species by histopathology. *Am J Clin Pathol* 1998; 109:45-54.
- Marques SA, Robles AM, Tortorano AM, Tuculet MA, Negróni R. Mycoses associated with AIDS in the Third World. *Med Mycol* 2000; 38 (Suppl.1):269-279.
- Mayayo E, Vidal F, Alvira R, González J, Richart C. *Pneumocystis carinii* in cerebral abscesses in a patient with AIDS. *Lancet* 1990; 336:227.
- Mayayo E, Moralejo J, Camps J, Guarro J. Fungal endocarditis in premature infants. *Clin Infect Dis* 1996; 26:366-368.
- Mayayo E, Guarro J, Pujol I. Endogenous endophthalmitis by *Fusarium solani*: an animal experimental model. *Med Mycol* 1998; 36:249-253.
- Molina L, Garau M, Gracia J, Odriozola M, del Palacio A. A propósito de tres casos de histoplasmosis importada en nuestro hospital. *Rev Iberoam Micol* 2002; 19:204-207.
- Moskowitz LB, Ganjei P, Ziegels-Weisman J, Cleary TJ, Penneys NS, Nadjji M. Immunohistologic identification of fungi in systemic and cutaneous mycoses. *Arch Pathol Lab Med* 1986; 110:433-436.
- Negróni R, Helou SH, Petri N, Robles AM, Arechavala A, Bianchi MH. Case study: posaconazole treatment of disseminated phaeohyphomycosis due to *Exophiala spinifera*. *Clin Infect Dis* 2004; 38:15-20.
- Ortoneda M, Pastor FJ, Mayayo E, Guarro J. Comparison of the virulence of *Scedosporium prolificans* strain from different origins in a murine model. *J Med Microbiol* 2002; 51: 924-928.
- Ortoneda M, Capilla J, Pujol I, Pastor FJ, Mayayo E, Fernández-Ballart J, Guarro J. Liposomal amphotericin B and granulocyte colony stimulating factor therapy in a murine model of invasive infection by *Scedosporium prolificans*. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49: 525-529.
- Petrini B, Skold CM, Bronner V, Elmberger G. Coccidioidomycosis mimicking lung cancer. *Respiration* 2003; 70:651-653.
- Pontón J. Diagnóstico microbiológico de las micosis. *Rev Iberoam Micol* 2002; 19:25-29.
- Pontón J (Ed.). *Aspergilosis invasora, guía de bolsillo*. Bilbao, Revista Iberoamericana de Micología, 2003.
- Pujol I, Aguilar C, Gene J, Guarro J. In vitro antifungal susceptibility of *Alternaria* spp. and *Ulocladium* spp. *J Antimicrob Chemother* 2000; 46:357.
- Quindós G. Las micosis en el amanecer del siglo XXI. *Rev Iberoam Micol* 2002; 19:1-4.
- Richardson MD, Johnson EM. *The pocket guide to Fungal Infection*. London, Blackwell Science, 2000.
- Rippon JW. *Medical Mycology*. 3th Ed. Philadelphia, WB Saunders Co., 1988.
- Saeed GN, Hay RJ. Immunoperoxidase staining in the recognition of *Aspergillus* infections. *Histopathology* 1981; 5:437-444.
- Salfelder K. *Atlas of Fungal Pathology*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1990.
- San Millán R, Quindós G, Garaizar J, Salesa R, Guarro J, Pontón J. Characterization of *Scedosporium prolificans* clinical isolates by randomly amplified polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol* 1997; 35:2270-2274.
- Schwartz J. The diagnosis of deep mycoses by morphologic methods. *Hum Pathol* 1982; 13:519-533.
- Schofield DA, Westwater C, Paulling EE, Nicholas PJ, Balish E. Detection of *Candida albicans* rRNA from formalin-fixed, paraffin-embedded mouse tissues by nested reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 2003; 41:831-834.
- Torres Rodríguez JM y cols. *Micología Médica*. Barcelona, Masson, 1993.
- Watts JC, Chandler FW. Morphologic identification of mycelial pathogens in tissue sections. A caveat. *Am J Clin Pathol* 1998; 109:1-2.
- Watts JC, Chandler FW. The surgical pathologist's role in the diagnosis of infectious diseases. *J Histotechnol* 1995; 18:191-193.