

CAPÍTULO 5

Identificación de agentes infecciosos

Adriana Massone

En el presente capítulo se describen los criterios generales a tener en cuenta para la citología diagnóstica en enfermedades infecciosas seleccionadas y se ilustran ejemplos representativos de diferentes clases de microorganismos.

Los tipos de agentes infecciosos incluyen bacterias comunes, bacterias superiores, levaduras, hifas fúngicas, protozoos, parásitos y virus.

El tamaño, la forma y las características de tinción son importantes en la identificación citológica de los agentes infecciosos. Este capítulo contiene breves descripciones de los mismos, incluyendo las tinciones utilizadas de rutina o especiales que permiten identificar agentes con particularidades de tinción.

Infección primaria e infección secundaria o *versus* microbiota normal

Las bacterias intracelulares se observan en infecciones activas (primarias o secundarias), mientras que las bacterias extracelulares pueden indicar una infección activa, microflora normal o contaminación (Lane 2015).

Las bacterias intracelulares y extracelulares son indicativas de infección activa. También una población bacteriana monomórfica (solo un tipo de bacteria presente) sugiere infección, mientras que una población mixta (cocos, bastones) puede indicar contaminación, microflora normal o una infección bacteriana mixta. Un proceso bacteriano mixto puede presentarse, por ejemplo, en infecciones gastrointestinales, en heridas por mordeduras o en lesiones por cuerpos extraños.

Bacterias

Cocos

Entre los procesos infecciosos incluimos, en primer lugar, a los abscesos bacterianos agudos y piodermas. Estos procesos se ubican generalmente en el tejido subcutáneo y se observan

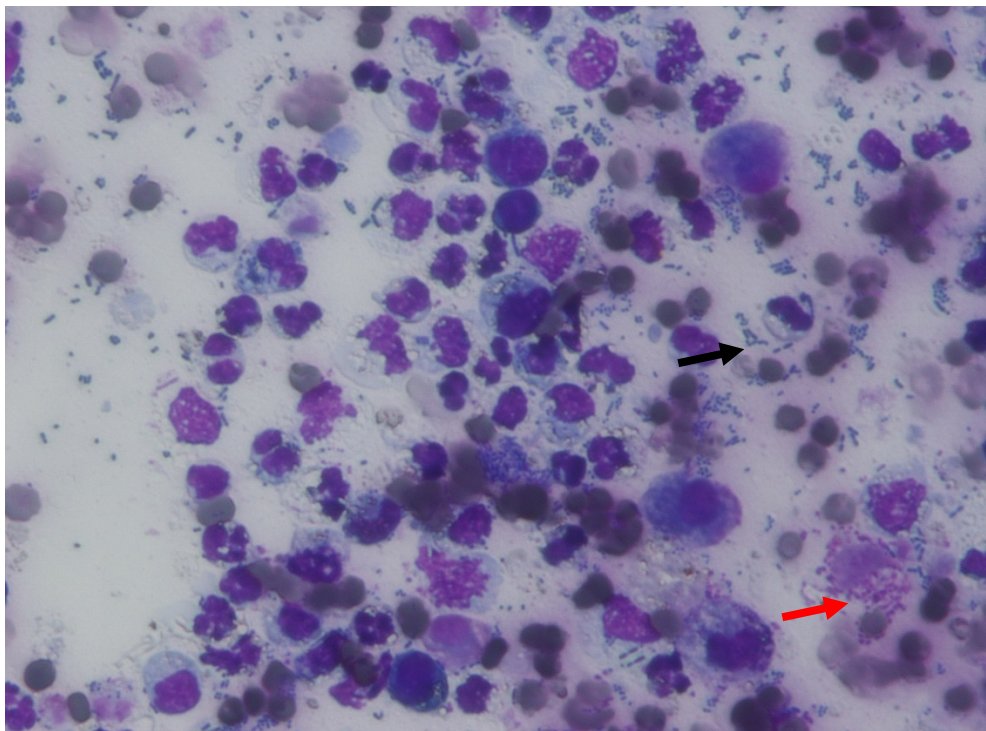
como resultado de heridas causadas por mordeduras u otras heridas punzantes. También pueden observarse como manifestación de enfermedades sistémicas. Macroscópicamente se observan como lesiones firmes a fluctuantes, eritematosas, calientes y dolorosas. Generalmente se aprecia un exudado de color blanco amarillento.

La pioderma profunda se manifiesta como una inflamación bacteriana que se extiende a la dermis, con compromiso de los folículos (foliculitis y furunculosis). La destrucción de la pared folicular libera fragmentos de pelo y restos de queratina folicular en el tejido circundante, lo que genera una reacción de cuerpo extraño e inflamación piogranulomatosa, con formación de un nódulo dérmico (Gross 2005, Raskin 2006).

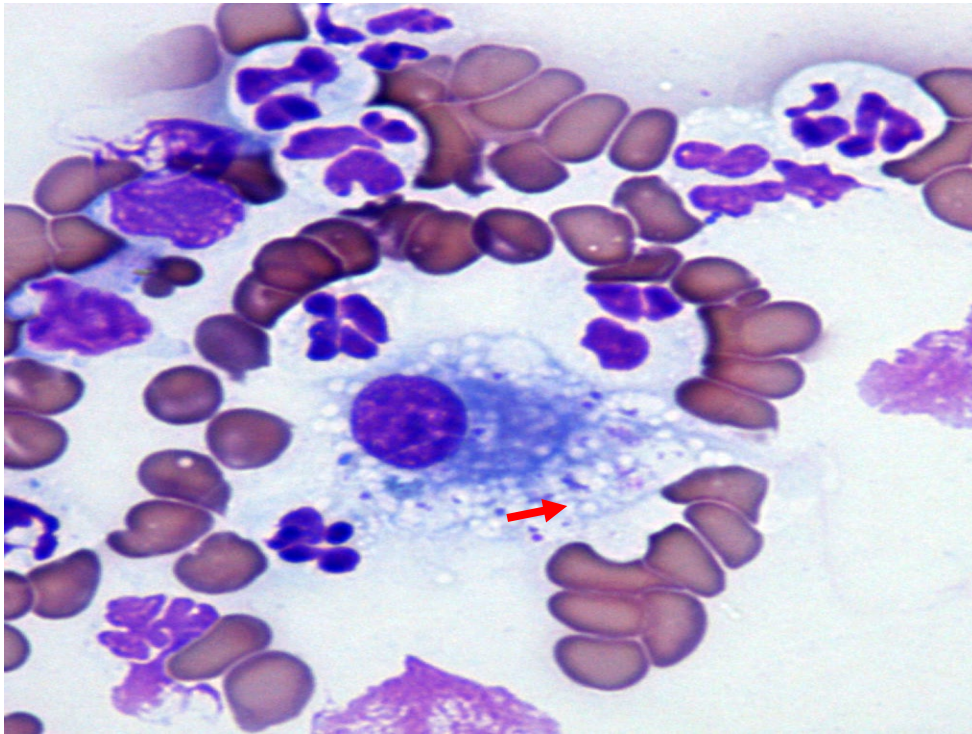
Los principales agentes son cocos Gram positivos patógenos, de los géneros *Staphylococcus* y *Streptococcus*.

Los estafilococos se presentan en grupos de 4 a 12, mientras que los estreptococos tienden a formar cadenas cortas o largas. Estafilococos y estreptococos son aerobios. Cuando se identifican cocos en preparaciones citológicas se deben realizar cultivos para aerobios y anaerobios, como así también las pruebas de sensibilidad (Figura 5.1 y 5.2).

Figura 5.1. Bacterias.



Abundantes cocos intracitoplasmáticos (flecha roja) y libres (flecha negra). Tinción 15, Biopur®. Obj. 20X.

Figura 5.2. Bacterias.

Abundantes cocos intracitoplasmáticos (flecha roja) Tinción 15, Biopur®. Obj.60X.

Dermatophilus congolensis se replica por división transversal y división longitudinal, produciendo largas cadenas dobles de microorganismos cocoides azules, que se asemejan a pilas de monedas. Estas bacterias colonizan la dermis superficial y producen lesiones costrosas. En el material obtenido debajo de estas costras se observan fácilmente estas cadenas, junto con abundantes células epiteliales, restos de queratina y detritus celulares y muy escasos neutrófilos (Albanese 2017, Lane 2015, Raskin 2016).

Bastones

Actinomyces/Nocardia

La infección se presenta como lesiones subcutáneas tumefactas, las que posteriormente se ulceran y exudan líquido pardo rojizo. Frecuentemente están relacionadas con heridas penetrantes. Las infecciones pueden estar asociadas con signos sistémicos, incluido el pitorax.

Los microorganismos se reconocen como estructuras filamentosas características. A menor aumento, cuando están presentes, los grupos de bacterias extracelulares se observan de color azul o rojizo, inmersos en una respuesta inflamatoria compuesta por neutrófilos y macrófagos.

A mayor aumento se identifican como microorganismos filamentosos alargados, delgados y ramificados.

Actinomyces sp. son Gram positivos pero no ácido alcohol resistentes, mientras que *Nocardia* sp. son Gram positivos y variablemente ácido alcohol resistente. Se recomienda realizar el cultivo para arribar al diagnóstico definitivo (Raskin 2016).

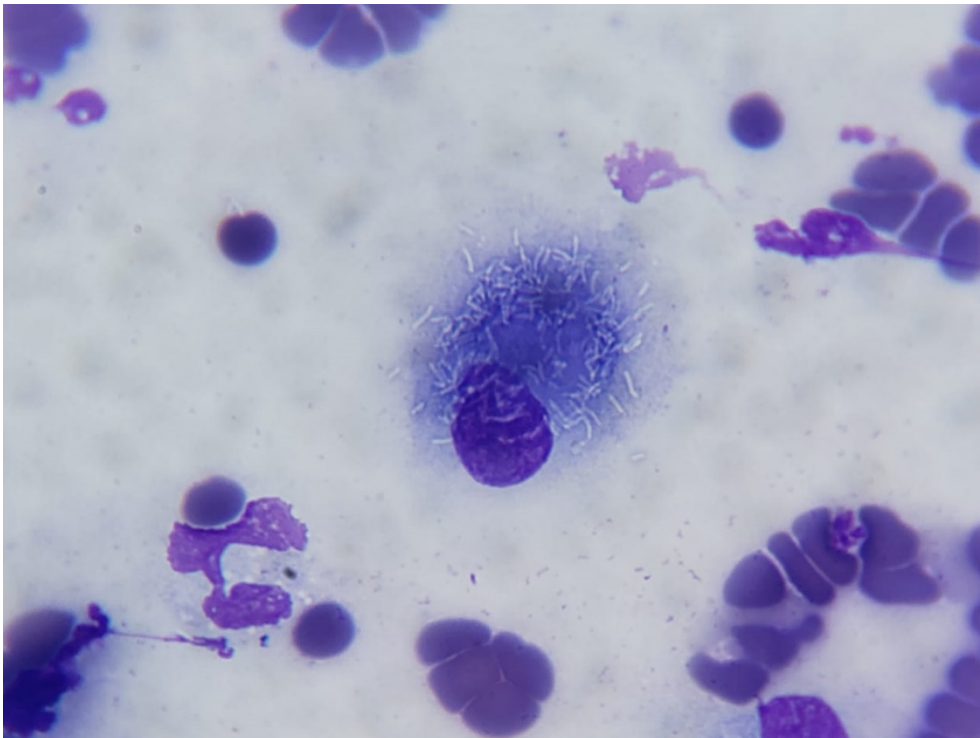
Mycobacterias

Las micobacterias son bacterias con forma de bastones, ácido alcohol resistente, que se clasifican en dos grandes grupos: patógenos obligados y patógenos facultativos, estos últimos también denominados micobacterias oportunistas o atípicas (Greene 2012).

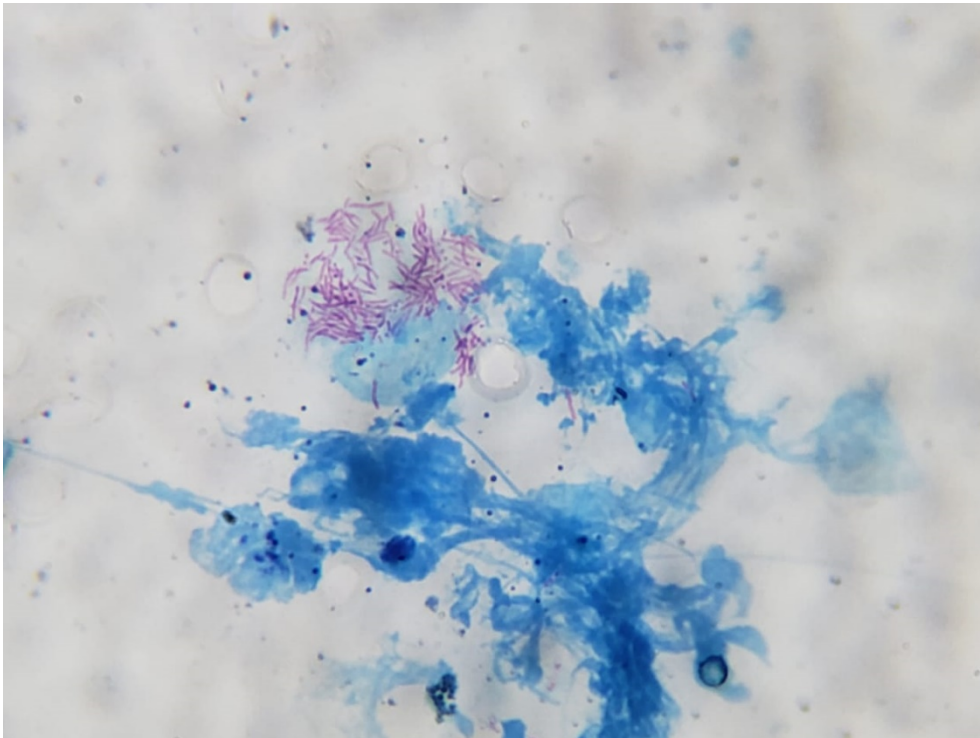
Las bacterias del género *Mycobacterium* spp. no se tiñen con las coloraciones de rutina (Figura 5.3). Por ello, los bastones con tinción negativa se observan en el citoplasma de los macrófagos, macrófagos epitelioides y células gigantes. Ante la presencia de estas células en preparados citológicos, en las que, luego de una cuidadosa búsqueda no se observan microorganismos pero sí imágenes negativas, debería recurrirse a coloraciones para organismos ácido alcohol resistentes como es la Tinción Ziehl Neelsen (Figura 5.4).

Debido a que, a menudo, son refractarios a la terapia con antibióticos y el cultivo puede demorar, la citología resulta muy útil para indicar rápidamente la presencia de estos microorganismos (Lane 2015, Raskin 2016).

Figura 5.3. *Mycobacterium* spp.



Citoplasma de macrófagos con bacilos (imágenes negativas). Tinción Color Fast, Biopack®. Obj 100X.

Figura 5.4. *Mycobacterium* spp.

Bacilos ácido-alcohol resistentes (color rosa). Tinción Ziehl Neelsen, Britani®. Obj 100X.

Hongos

Los procesos infecciosos producidos por hongos (micosis) se caracterizan por producir lesiones granulomatosas con presencia de neutrófilos, macrófagos, células epitelioides, linfocitos y células plasmáticas. En algunas ocasiones, se observan solamente neutrófilos y eosinófilos. (Gross 2005, Greene 2012).

Sporothrix schenckii

Sporothrix schenckii es un hongo dimórfico que a menudo se encuentra en forma de levadura a temperatura corporal (37° C). La transmisión es a través de la inoculación directa por arañazos o mordeduras y, con menor frecuencia, por inhalación (Greene 2012).

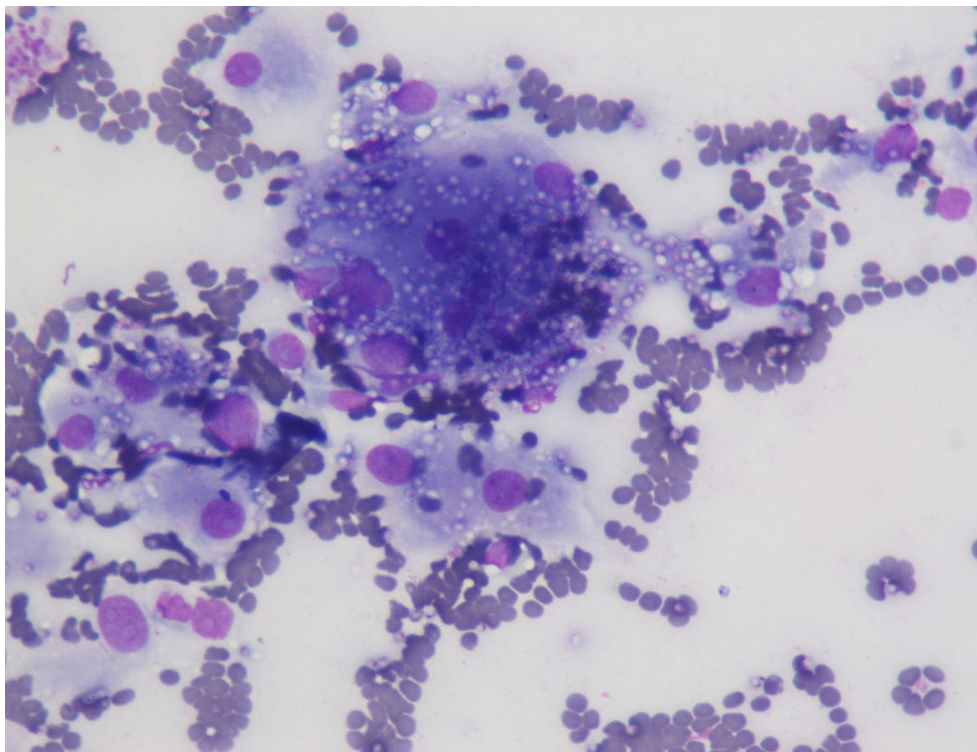
La respuesta inflamatoria es piogranulomatosa. En los gatos es frecuente hallar numerosas levaduras, a diferencia de la escasa cantidad que se encuentran en caninos. Estos hongos pueden hallarse libres o en el interior de las células. Su forma es redonda u ovalada a fusiforme ("forma de cigarro"), mide aproximadamente de 1 a 3 µm de ancho y de 3 a 9 µm de largo, contienen citoplasma azul claro y pared celular delgada y transparente (Albanese 2017, Lane 2015, Raskin 2016).

Histoplasma capsulatum

Histoplasma capsulatum es un hongo dimórfico de distribución mundial. El microorganismo crece en el suelo y material contaminado con excrementos de aves o murciélagos (guano). La infección en personas y animales probablemente se produce por inhalación de las esporas de la fase micelial. Las infecciones pueden ser localizadas o diseminadas y los síntomas dependen del tejido afectado. *H. capsulatum* se puede encontrar en la piel, linfonódulos, órganos internos, articulaciones, médula ósea, sangre periférica, o, rara vez, en líquido cefalorraquídeo (LCR). (Greene 2012). La respuesta inflamatoria es piogranulomatosa con abundante cantidad de microorganismos en macrófagos y, ocasionalmente, en neutrófilos.

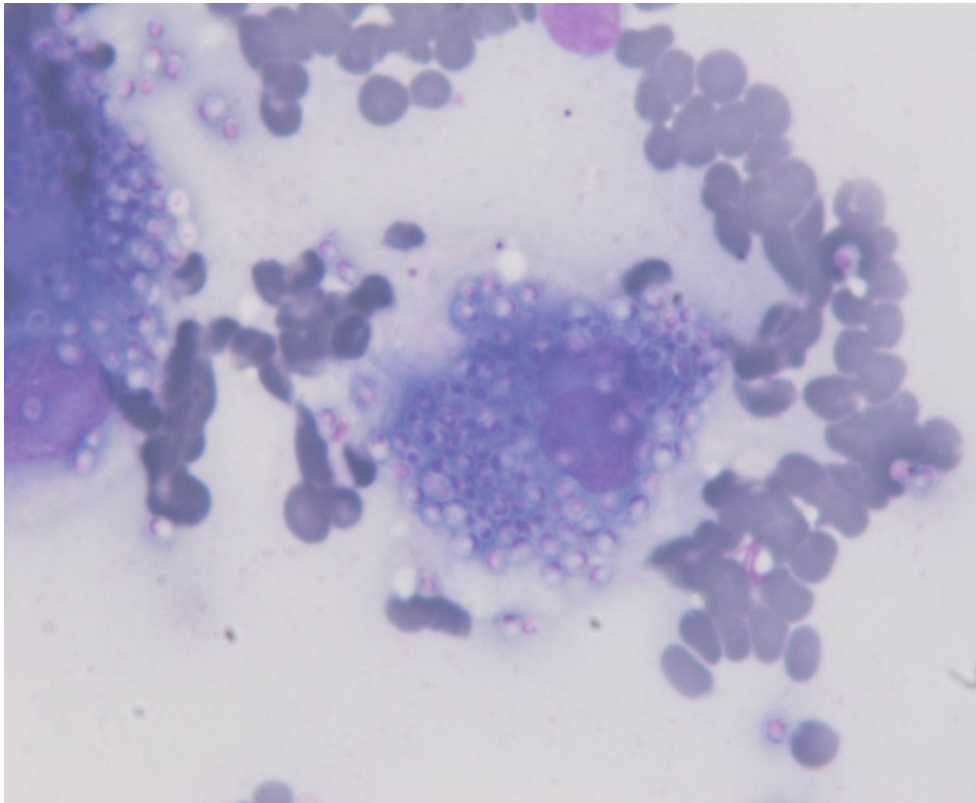
Los microorganismos se describen como pequeñas levaduras, de 2 a 4 µm de diámetro y de forma redonda a ovalada, con un núcleo excéntrico en forma de medialuna de color rosa a púrpura, con citoplasma azul claro y una pared celular delgada. Puede observarse un brote con un cuello estrecho (Figuras 5.5, 5.6 y 5.7) (Albanese 2017, Lane 2015, Raskin 2016).

Figura 5.5. *Histoplasma spp.*



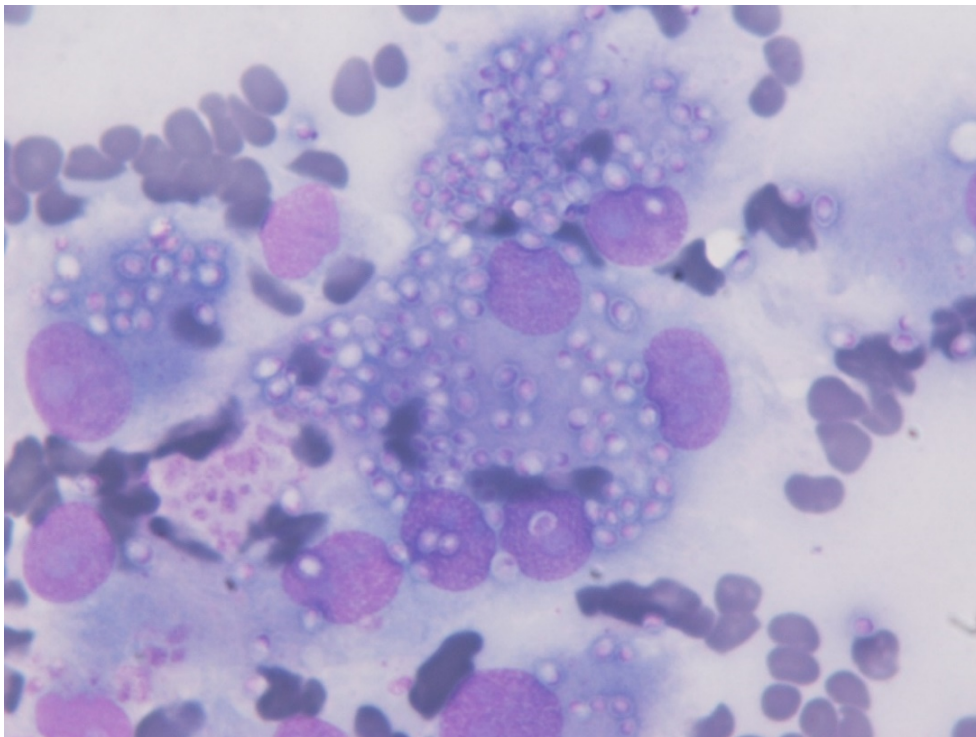
Tinción 15, Biopur®. Obj 20X.

Figura 5.6. *Histoplasma spp.*



Tinción 15, Biopur®. Obj. 40X.

Figura 5.7. *Histoplasma spp.*



Abundantes microorganismos intracitoplasmáticos en células gigantes multinucleadas. Tinción 15, Biopur®. Obj 100X

Blastomyces dermatitidis

Blastomyces dermatitidis es un hongo dimórfico. La mayoría de los casos de blastomicosis se deben a la inhalación de esporas de la fase micelial.

Este hongo no puede transmitirse a través de aerosoles entre animales y humanos; sin embargo, la inoculación directa puede producir infecciones en humanos. La blastomicosis en perros y gatos puede diseminarse y producir lesiones pulmonares, oculares, cutáneas y óseas. Las lesiones cutáneas se encuentran comúnmente en la nariz y las extremidades y, por lo general, están ulceradas (Greene 2012).

La respuesta inflamatoria es piogranulomatosa, con variable cantidad de microorganismos. Estos a menudo están rodeados de neutrófilos o bien, más raramente, pueden observarse en los macrófagos. *B. dermatitidis* es de tamaño mediano, esféricos, de 5 a 20 µm de diámetro, color azul oscuro, con una doble pared gruesa y refractaria y ocasionalmente se observa una gemación de base ancha (Albanese 2017, Lane 2015, Raskin 2016).

***Cryptococcus* spp.**

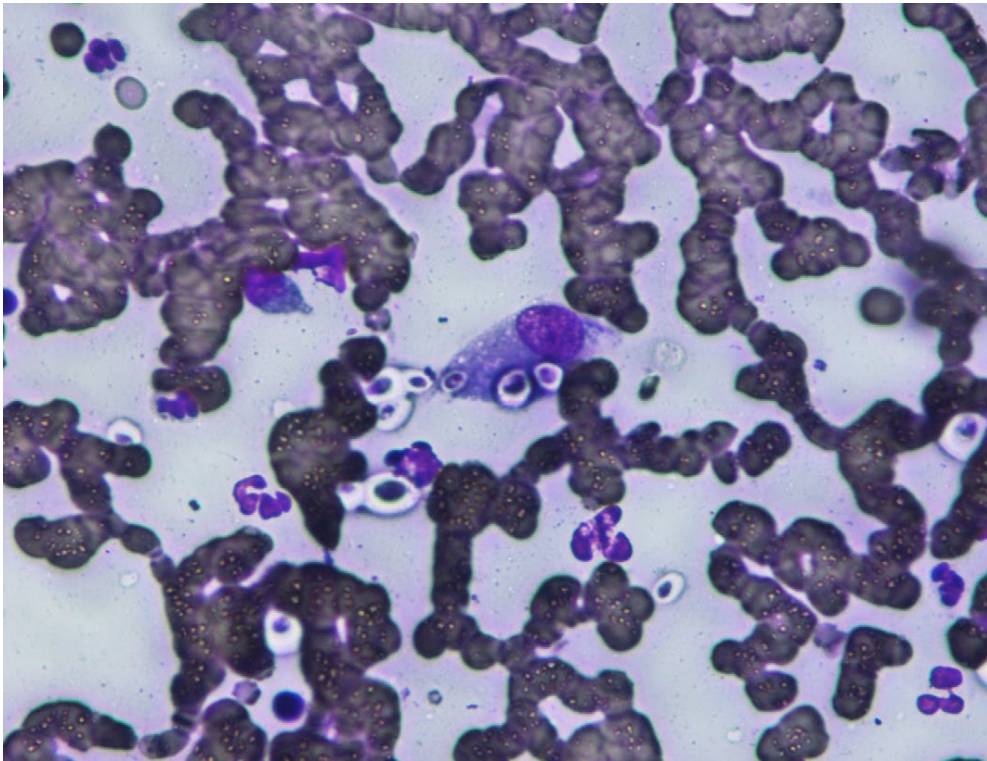
Las dos especies patógenas más comunes son *Cryptococcus neoformans* y *C. gattii*. Estos son hongos dimórficos que se encuentran en forma de levadura a 37° C, aunque rara vez se han informado formas de hifas. *C. neoformans* se encuentra en todo el mundo, mientras que *C. gattii* se encuentra principalmente en regiones tropicales y subtropicales.

La infección de las vías respiratorias superiores es más común en los gatos y forma una masa en la cavidad nasal que puede incluso invadir el seno frontal. Se pueden observar otitis media, adenopatías mandibulares, lesiones orales y lesiones cutáneas. También puede alcanzar al sistema nervioso central, ojos o incluso ser sistémico. Los perros a menudo desarrollan una enfermedad diseminada grave, con compromiso del sistema nervioso central, ojos, sistema urinario y cavidad nasal. Los organismos pueden verse en aspirados de lesiones masivas y en líquido cefalorraquídeo (Greene 2012).

En las muestras se observan principalmente macrófagos, linfocitos y neutrófilos. En el líquido cefalorraquídeo se observan eosinófilos.

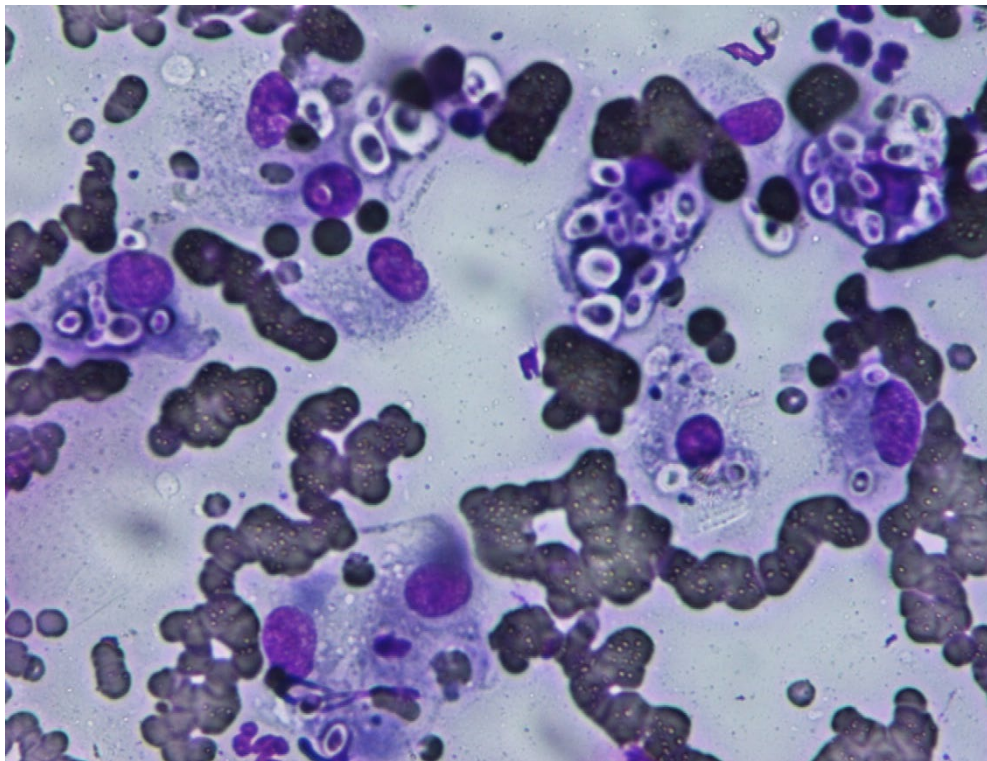
Estos microorganismos poseen un polisacárido que no permite colorear la cápsula o solo se observa de un color rosa claro (“cubierta rugosa”). Es posible encontrar formas no encapsuladas. Estos hongos son redondos, ovalados o alargados, miden aproximadamente de 4 a 15 µm sin cápsula, o de 8 a 40 µm con cápsula y, ocasionalmente, se puede observar la gemación (Figura 5.8 y 5.9) (Albanese 2017, Lane 2015, Raskin 2016).

Figura 5.8. *Cryptococcus* spp.



Tinción 15, Biopur®. Obj. 40X.

Figura 5.9. *Cryptococcus* spp.



Tinción 15, Biopur®. Obj. 60X.

***Coccidioides* spp.**

La coccidioidomicosis es causada por *Coccidioides immitis* o *C. posadasii*. Son hongos dimórficos que forman esférulas a 37° C, las que internamente se dividen para formar endosporas.

La enfermedad pulmonar es común en los perros y puede diseminarse sistémicamente e involucrar los huesos, ojos, corazón, pericardio, sistema nervioso central, bazo, hígado y riñones. En los perros, las lesiones cutáneas supurativas se asocian con lesiones óseas subyacentes. En los gatos las lesiones óseas son raras (Greene 2012).

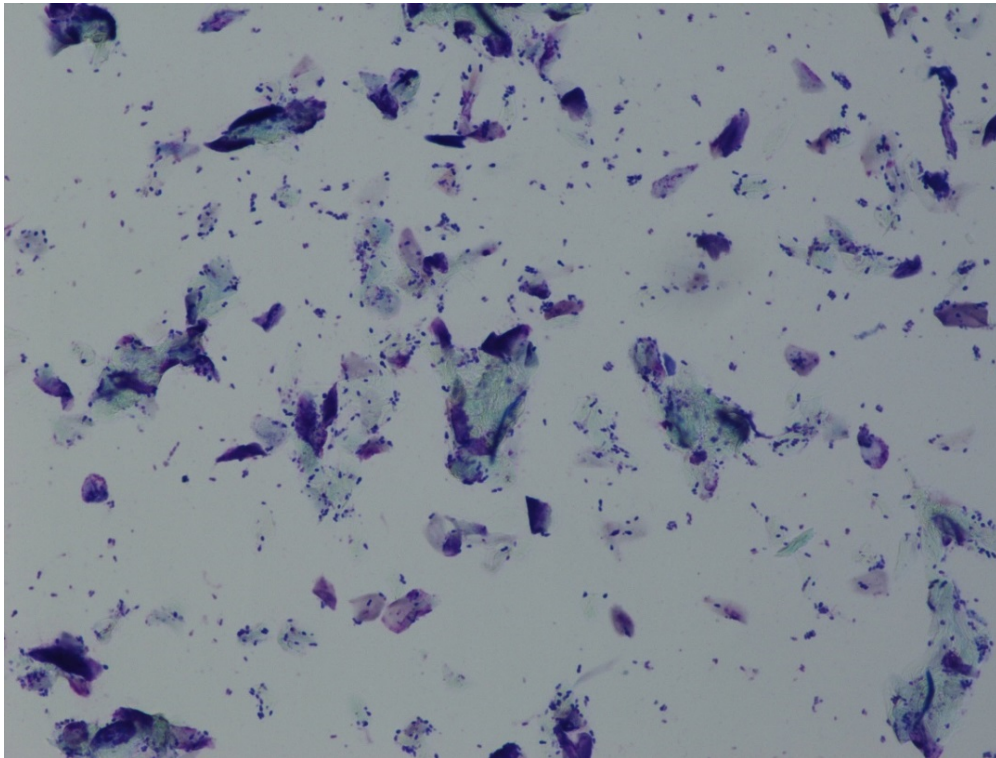
La inflamación característica es piogranulomatosa y puede contener muy pocos microorganismos. Estos se observan como estructuras redondeadas, azules, que miden aproximadamente de 10 a 200 µm de diámetro. Son de pared doble y contienen protoplasma finamente granular. Las endosporas se pueden observar dentro de las esférulas, fagocitadas por neutrófilos o macrófagos y dispersas en el fondo. Las endosporas son pequeñas, redondas u ovoides, de aproximadamente 2 a 5 µm de diámetro, contienen una pared delgada, citosol claro a azul claro a púrpura y núcleo excéntrico. Las esférulas de tamaño pequeño a mediano pueden parecerse morfológicamente a *B. dermatitidis*. Sin embargo, la falta de gemación, la variación de tamaño de las esférulas y la presencia de endosporas ayudan a identificar *Coccidioides* spp. (Albanese 2017, Lane 2015, Raskin 2016).

***Malassezia* spp.**

Malassezia spp. son un grupo de levaduras lipofílicas no micelioides, de las cuales *M. pachydermatis* es un comensal y oportunista común de la piel. Patógeno en perros y gatos. Los ambientes cálidos y húmedos de la piel, como las orejas, el mentón, las axilas, la ingle y los pies, suelen verse afectados en los perros. (Gross 2005).

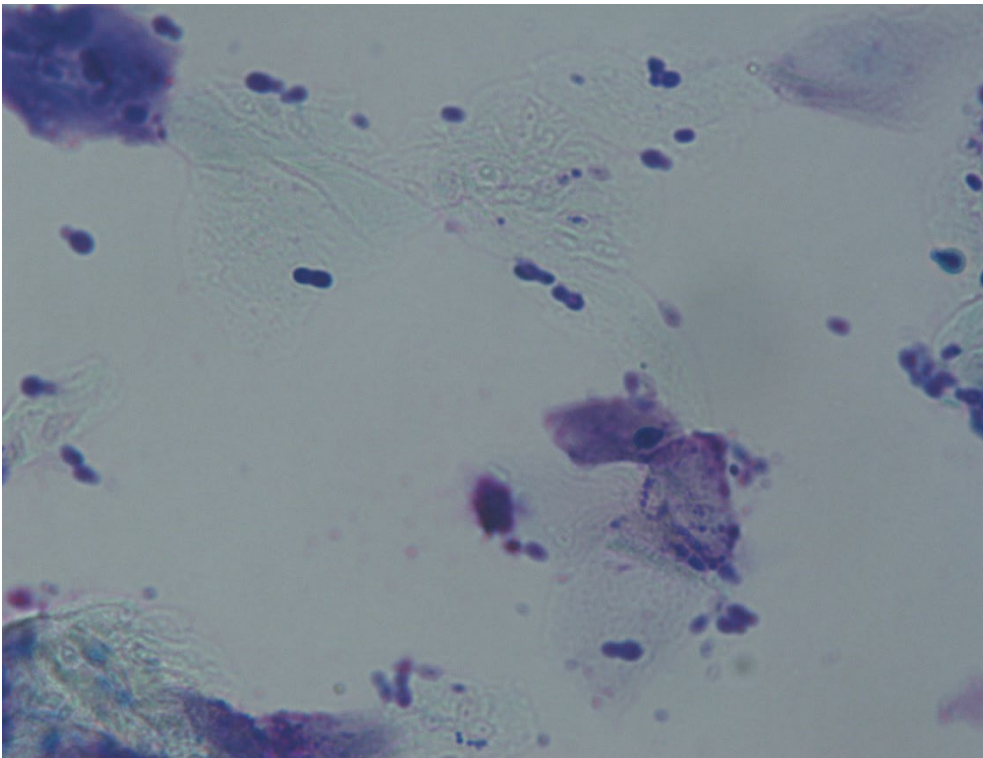
Estas levaduras son pequeñas, Gram positivas, típicamente en forma de maní o de huella de bruja, puede ser globoso o elipsoidal (Figuras 5.10 y 5.11) (Albanese 2017, Lane 2015, Raskin 2016).

Figura 5.10. *Malassezia* spp



Abundante cantidad de microorganismos y células epiteliales queratinizadas. Tinción 15, Biopur®. Obj.20X.

Figura 5.11. *Malassezia* spp.



Tinción 15, Biopur®. Obj.60X

Dermatofitos

Microsporum y *Trichophyton* spp. son hongos queratinófilos que comúnmente causan dermatofitosis (tiña) en perros y gatos. La dermatofitosis es zoonótica y se pueden observar lesiones similares en humanos.

Las lesiones son costrosas, focales, escamosas y alopécicas y ocurren en la cabeza, patas y cola de los animales. A partir de raspados en el borde de las lesiones activas se pueden visualizar los dermatofitos. Se pueden identificar en preparaciones de inmersión en aceite sin teñir (con o sin tratamiento con hidróxido de potasio al 10%), o extendidos secados al aire teñidos con coloraciones de rutina. Se pueden utilizar también, para su identificación, tinción de plata o reacción de ácido periódico de Schiff (Gross 2005).

En algunas ocasiones puede observarse inflamación piogranulomatosa e identificar al micelio fúngico y las artrosporas en la superficie de las células epiteliales, libres o en el interior de los pelos (*Trichophyton* spp.) o en la superficie de los pelos (*Microsporum* spp.) (Gross 2005, Albanese 2017, Lane 2015, Raskin 2016).

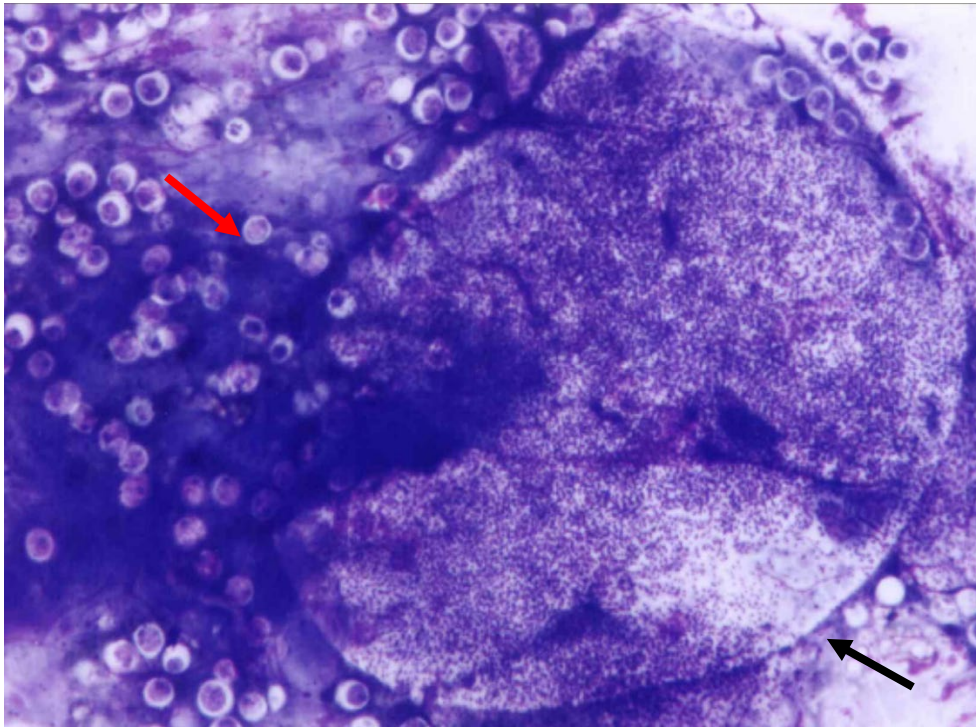
Otros microorganismos

Muchos hongos y organismos similares a hongos que infectan a perros y gatos pueden formar hifas en el tejido. Estos incluyen patógenos oportunistas (microflora comensal, por ejemplo *Candida albicans*), y hongos saprofitos que causan zigomicosis, hialohifomicosis y eohifomicosis. Los organismos fúngicos a menudo inducen una respuesta inflamatoria granulomatosa y con muchos eosinófilos. Aunque las características de las hifas como el ancho, la ramificación, tabiques, formación de pseudohifas, tinción e imágenes negativas pueden sugerir un organismo específico, el diagnóstico definitivo requiere cultivo y evidencia histopatológica de invasión tisular.

Rhinosporidium seeberi

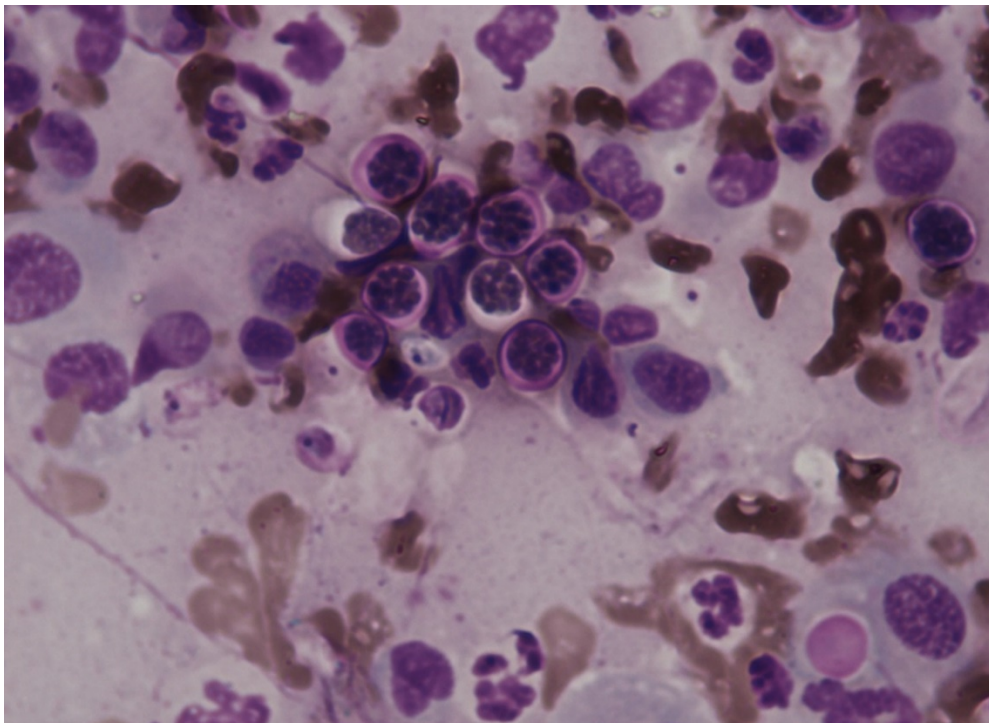
Rhinosporidium seeberi es un patógeno eucariótico Mesomycetozoea (una clase entre hongos y animales). Generalmente se encuentra en regiones tropicales y se asocia con ambientes acuáticos (Greene 2012). La rinosporidiosis se caracteriza en perros y gatos por crecimientos nasales polipoides con una superficie granular. Se diagnostica al encontrar endosporas maduras redondas u ovales en exudados nasales o en improntas tisulares. Las endosporas maduras tienen aproximadamente de 7 a 15 µm de diámetro, se tiñen de rosa brillante, con estructuras rosadas intensas rodeadas de paredes celulares dobles. Pueden hallarse esporangios grandes de 100 a 450 µm (Figura 5.12 y 5.13) (Albanese 2017, Lane 2015, Raskin 2016).

Figura 5.12. *Rhinosporidium seeberi*.



Presencia de endosporas maduras (flecha roja) en el interior de esporangios (flecha negra). Tinción 15, Biopur®. Obj.20X

Figura 5.13. *Rhinosporidium seeberi*.



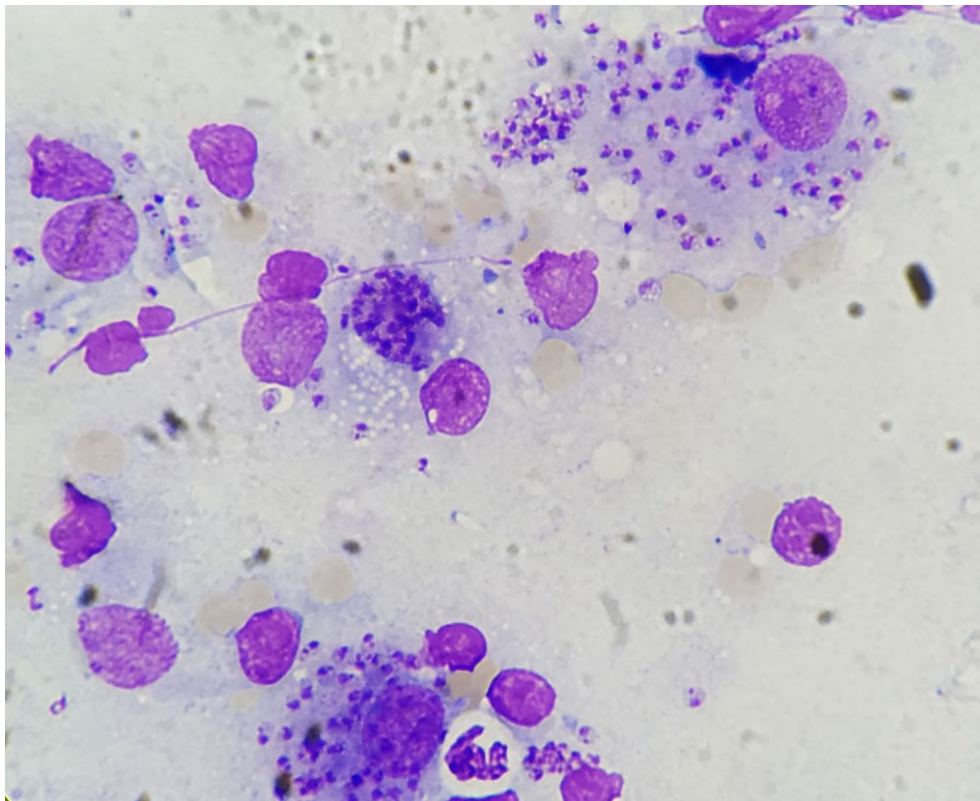
Presencia de endosporas maduras. Tinción 15, Biopur®.Obj.100X.

Protozoos

Leishmania spp.

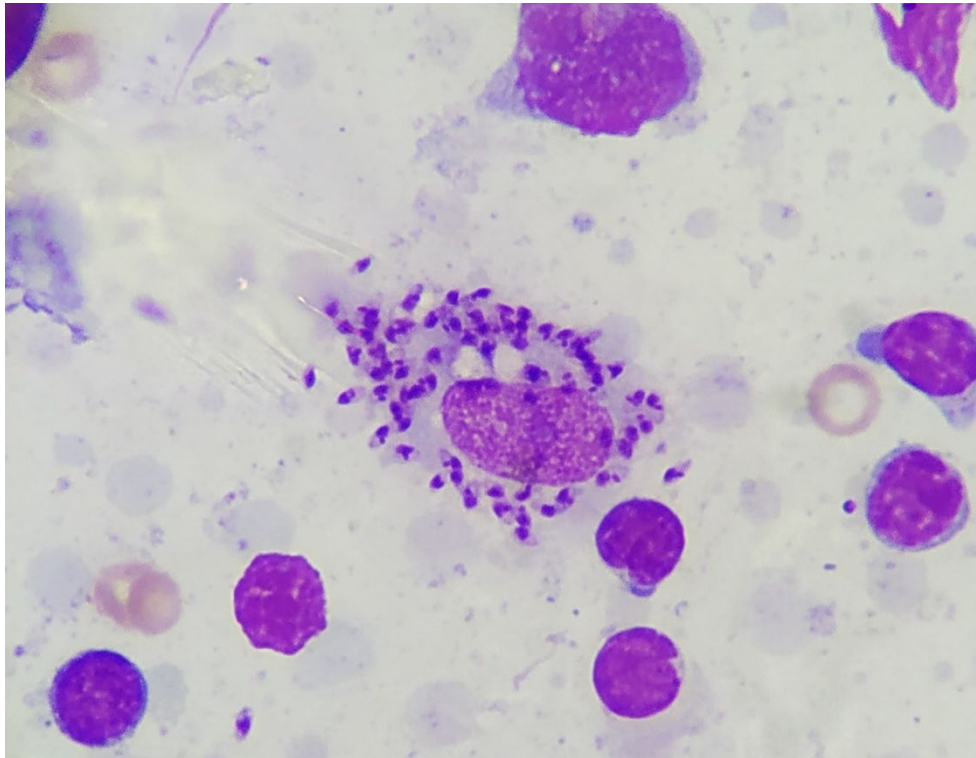
Los perros son el principal reservorio de *Leishmania infantum* (chagasi), que causa la leishmaniasis visceral humana. Es endémica en la cuenca del Mediterráneo, Oriente Medio y América del Sur. Los flebótomos son el principal vector de transmisión en áreas endémicas, y solo un pequeño porcentaje de perros infectados desarrollan la enfermedad clínica. Los organismos se pueden encontrar en cualquier tejido o líquido corporal. La infección produce lesiones cutáneas, linfadenomegalia y esplenomegalia. Los amastigotes de *Leishmania* spp. se pueden ver en la impresión o frotis de lesiones ulcerativas, aspirados de nódulos, linfonódulos, bazo o médula ósea, que a menudo tienen inflamación piogranulomatosa o granulomatosa (Greene 2012). Los amastigotes son ovoides, de aproximadamente 2,5 a 5 μm de largo y de 1,5 a 2 μm de ancho, y contienen un núcleo ovalado de color rosa a púrpura y un cinetoplasto pequeño, de color azul oscuro a púrpura, en forma de bastoncillo (Figura 5.14 y 5.15) (Albanese 2017, Lane 2015, Raskin 2016).

Figura 5.14. *Leishmania* spp.



Presencia de amastigotes libres y en el interior de macrófagos. Tinción May Grunwald Giemsa. Obj.40X.
(Cortesía Dr. Ricardo Sánchez, ROSLAB Concordia, Entre Ríos)

Figura 5.15. *Leishmania* spp.



Presencia de amastigotes en el interior de macrófagos. En esta imagen se hace visible el cinetoplasto. Tinción May Grunwald Giemsa. Obj. 100X. (Cortesía Dr. Ricardo Sánchez, ROSLAB Concordia, Entre Ríos)

Referencias

- Albanese F (2017). Cytology of Canine and Feline Non-neoplastic Skin Diseases. En F Albanese (Ed), *Canine and feline skin cytology*. (77-290). First edition. Cham, Switzerland: Springer International Publishing
- Greene CE (2012). Rhinosporidiosis. En CE Greene (Ed), *Infectious Diseases of dog and cat* (702-704). Fourth edition. St. Louis, USA: Saunders Elsevier.
- Gross TL (2005). Infectious nodular and diffuse granulomatous and pyogranulomatous diseases of the dermis. En TL Gross, PJ Ihrke, EJ Walder, VK Affolter (Eds), *Skin disease of the dog and cat*. (273-319). Second Edition. Ames, USA: Blackwell Science Ltd.
- Lane LV (2020). Selection infectious agents. En AC Valenciano y RL Cowell (Eds), *Cowell and Tyler's Diagnostic cytology and hematology of the dog and cat* (44-64). Fifth Edition St. Louis, USA: Elsevier.
- Raskin RE (2016). Skin and subcutaneous tissues. En RE Raskin y DJ Meyer (Eds), *Canine and feline cytology, a color atlas and interpretation guide* (34-90). Third Edition. St. Louis, USA: Elsevier.