

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE PROCESOS DERMATOLÓGICOS DE ORIGEN INFECCIOSO EN ANIMALES DE COMPAÑÍA. *Reflexiones diagnósticas de un dermatoperrólogo viejo*

Dr. Miguel Hermoso de Mendoza Salcedo. Catedrático de Enfermedades Infecciosas. Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura.

Hace treinta y muchos años de mi primer diagnóstico dermatológico animal, y me falta ya muy poco para tomar el camino de la jubilación. Ya no aguanto horas seguidas al microscopio, ni veo como veía, ni analizo como analizaba, ni razono como razonaba, ni tengo nada que demostrar.

Esta condición de cansado veterano y el hecho de que a este Simposio concurren tantos trabajos de sólida base y mucha mayor calidad científica que lo que yo sea ya capaz de aportar, me han animado a presentar esta serie de reflexiones prácticas sobre el proceso diagnóstico dermatológico infeccioso.

Al ser autodidacta como dermatólogo, algunas resultarán incorrectas incluso políticamente, otras habrán quedado anticuadas y otras resultarán perogrullescas, pero todas están basadas en la experiencia, y confío en que puedan ser de utilidad al dermatólogo veterinario en su lucha con las dermatitis infecciosas.

Efectivamente, a lo largo de este tiempo he realizado o participado en el diagnóstico de muchas infecciones dermatológicas en animales de compañía, y he visto aparecer y desaparecer nuevas herramientas, nuevas modas y nuevos procedimientos diagnósticos.

Sin embargo, el problema básico sigue siendo el mismo: un animal de compañía con alteraciones cutáneas, y un dermatólogo infeccioso que debe:

- determinar si existen agentes infecciosos implicados en ese cuadro clínico-lesional
- determinar si éstos son o no los agentes causales de esas alteraciones
- proponer un procedimiento de lucha adecuado.

Disequemos el problema en sus componentes:

EL DERMATÓLOGO INFECCIOSO.

Cualquier dermatólogo debe ser vocacional. La Dermatología tiene que gustar, ésto es imprescindible. Es sin duda una de las especialidades más gratificantes, pero también es de las más complejas y a menudo, de las más frustrantes. Ahora bien, dado que a un veterinario le guste la Dermatología, para diagnosticar como Dios manda ¿debe ser uno o dos, o tres, o cuarenta, como decía el fandango?

En el HCV de mi Facultad, normalmente en el diagnóstico de los casos dermatológicos participan Patología Médica, Parasitaria e Infecciosa. Ésto *a priori* es estupendo, puesto que en principio se contará con los mejores y más actualizados medios y en el diagnóstico participarán expertos de cada especialidad, pero en la realidad presenta varios problemas. A no todos los profesores les gusta la Dermatología, pero todos tienen docencia práctica. Si estos casos se usan en prácticas, como a menudo ocurre, la presión del calendario y la rotación entre los profesores de cada servicio resienten su continuidad y dificultan la discusión

conjunta de los casos, y a falta de ésta, la coordinación entre los servicios participantes no siempre es la deseable. Como resultado, el diagnóstico puede retrasarse, quedar inconcluso o resultar sesgado.

Otra situación es la del equipo humano de un Laboratorio de Diagnóstico si incluye bajo un mismo techo especialistas en Patología Médica, Infecciosa y Parasitaria, que pueden observar y analizar simultáneamente un mismo caso maximizando las probabilidades de un diagnóstico certero y un tratamiento eficaz. Pero eso sí, siempre y cuando a todos les guste la Dermatología y estén dispuestos a dedicarle a su parcela diagnóstica en cada caso todo el tiempo, la dedicación y el estudio que necesite.

Pero ¿y la Clínica Veterinaria modesta, con un equipo humano reducido? Aquí el dermatólogo infeccioso no tiene muchas opciones: además de una base sólida en su propia parcela, debe también adquirir suficientes conocimientos de Dermatología Médica y Parasitaria, o bien recurrir a un Laboratorio de Diagnóstico externo.

En resumidas cuentas, el dermatólogo infeccioso veterinario si quiere ser autosuficiente debe tener una gran afición a la Dermatología y estar dispuesto a informarse y formarse con bastante profundidad en campos dermatológicos ajenos al suyo propio.

EL PACIENTE DERMATOLÓGICO

En la dermatología de animales de compañía, el paciente habitualmente es un perro o gato, más raramente un lagomorfo, pequeño mamífero o ave más o menos exótico, o incluso una desconcertante pitón de dos metros y pico.

Por definición el paciente dermatológico es un animal con alteraciones cutáneas. El diagnóstico dermatológico infeccioso requiere habitualmente demostrar la presencia del agente infeccioso en las lesiones, por lo que es imprescindible obtener muestras de las mismas. Evidentemente las alteraciones clínico-lesionales del paciente condicionan directamente el tipo y calidad del muestreo.

CONSIDERACIONES SOBRE EL MUESTREO

Lo primero que se nos viene a la cabeza cuando se habla de muestreo dermatológico es el raspado. A menudo es imprescindible, como en las lesiones costrosas o paraqueratóticas, pero no siempre es necesario y a veces puede ser sustituido con ventaja por otras técnicas. Hay quien preconiza el raspado profundo, pero en mi experiencia es innecesario "hacer sangre", al haber suficiente concentración de los agentes infecciosos en la epidermis. Además, no es una experiencia agradable para el paciente, que puede optar por la defensa activa, y parece excesivo recurrir a la sedación para un simple raspado.

La técnica en sí es de todos conocida, pero puede ser útil matizar algunos detalles prácticos. Especialmente fastidioso es el caso de los raspados en zonas muy peludas. El exceso de pelo complica enormemente el estudio microscópico de los aclarados y los macerados, y aporta muy poco a los procedimientos de siembra. Efectivamente, el material infeccioso se localiza en la base, en el folículo, la

porción intradérmica y los dos o tres primeros milímetros del tallo piloso. La visibilidad y facilidad de interpretación de los aclarados mejora enormemente al cortar el pelo de la lesión a tijera o maquinilla unos milímetros por encima de la superficie cutánea antes de proceder a raspar, así como se facilita el aislamiento, tanto en siembra parcelar del raspado como al sembrar a partir de un macerado.

Otro problema asociado al raspado es la posible suciedad de la piel. No suele ser tan grave como en grandes animales, en que a menudo las lesiones presentan salpicaduras o verdaderas plastas de barro o estiércol, pero a veces es suficiente para dificultar gravemente el propio aclarado o su interpretación, por no mencionar los intentos de aislamiento.

Los exudados sanguinolentos, que se endurecen en presencia de la potasa y retrasan la queratolisis, y los seborreicos, que pueden saponificarse y producir artefactos tubulares refringentes similares a hifas, son igualmente indeseables. Por tanto, una limpieza superficial de la lesión con una gasa o torunda, seca o humedecida en SSF pueden mejorar enormemente la calidad del raspado, tanto para aclarado como para aislamiento.

La limpieza profunda de las lesiones puede ser imprescindible en procesos exudativos o supurativos, especialmente en lesiones fistulizadas que pueden albergar un cuerpo extraño (menuda sorpresa la primera vez que extraje una espiguilla de una fístula interdigital, tirando de una arista que tomé por un pelo enquistado). Una vez limpia la lesión se puede recoger la muestra de exudado fresco con un hisopo estéril con un mínimo de contaminación.

En lesiones dermatofíticas sobreagudas de tipo *kerion*, muy inflamatorias y dolorosas y que sangran con facilidad, es preferible sustituir el raspado por una extracción selectiva de pelos rotos o costras con unas pinzas, seguido de un hisopo estéril para los exudados.



Impétigo



Kerion

La utilización de hisopos conlleva la duda entre si usarlos secos o con medio de transporte. Aquí hay argumentos a favor y en contra de cada postura. Yo personalmente prefiero el hisopo seco. Aún no he visto un medio de transporte que permita obtener una buena extensión de los exudados en el porta; sólo se extiende el maldito agar y una vez teñido sólo se ven artefactos. En cambio un hisopo seco cuyo exudado se haya secado siempre puede ser humedecido con una gota de SSF estéril. Por no hablar de las dudas que me

suscita el medio de transporte en cuanto a su capacidad de mantener constante la composición microbiana del exudado que se introduzca en él.

Y otro problema íntimamente asociado al raspado es el recipiente para su transporte y conservación. Probablemente el más usado sea la placa Petri desechable, tan ancha y cómoda para recoger pelillos volanderos y descamaciones saltarinas. Una vez recogida la muestra y sellada con Parafilm, se mantiene en teoría herméticamente cerrada y a disposición indefinida del sufrido diagnosticador. Pero a menudo se sellan con esparadrapo o incluso Cello, con resultados infinitamente peores, e incluso el Parafilm, una vez abierto tiende a despegarse y la placa abierta a esparcir su contenido por todo el entorno, siguiendo fielmente la ley de Murphy.

Mejor resultado dan los frascos de muestras pequeños de tapón roscado, y a menudo he especulado con el uso de bolsas de polietileno de cierre Ziploc, aunque nunca me he decidido a probarlas.

Una vez obtenidas y a buen recaudo las muestras, mi procedimiento habitual ha sido siempre proceder primero a la observación microscópica y luego al aislamiento en medios selectivos.

BUSCANDO DERMATOFITOS: EL ACLARADO Y SU INTERPRETACIÓN

Para el dermatólogo infeccioso, el mejor agente aclarante es sin duda la potasa. El KOH 20% es un queratolítico mucho más activo que el lactofenol, y con un ligero calentamiento (15-20 min. en la estufa a 37 °C) ablanda el material lo suficiente para obtener preparaciones muy planas, lo que permite detectar con claridad en un raspado normal hifas y artrosporas fúngicas y ácaros o partes reconocibles de éstos. Como inconvenientes tiene la capacidad de saponificar las grasas presentes en el raspado, generando artefactos confusibles con hifas, y la rápida desecación, con formación de cristales que destruyen las estructuras orgánicas e impiden conservar las preparaciones.

Cuando se intenta aclarar muestras muy queratinizadas, como uñas, cuerno o plumas, se requiere más tiempo de aclarado, y puede ser útil realizarlo durante una o dos horas a temperatura ambiente para evitar la sobreconcentración del KOH.

Muchos y muy cualificados dermatólogos utilizan como técnica primaria de diagnóstico de dermatofitosis el aislamiento en medios selectivos. En mi caso, y durante toda mi actividad de diagnóstico dermatológico, siempre he confiado en la observación microscópica de aclarados en KOH como principal herramienta de detección de tiñas.

Podría contar con los dedos de una mano los casos negativos a la microscopía que se hayan revelado positivos en cultivo, mientras han sido multitud los casos de tiña detectados al microscopio que luego no han podido ser aislados. Ahora bien, el mejor aclarado del mundo puede resultar engañoso si no lo examinamos adecuadamente y con unos criterios de positividad muy definidos.

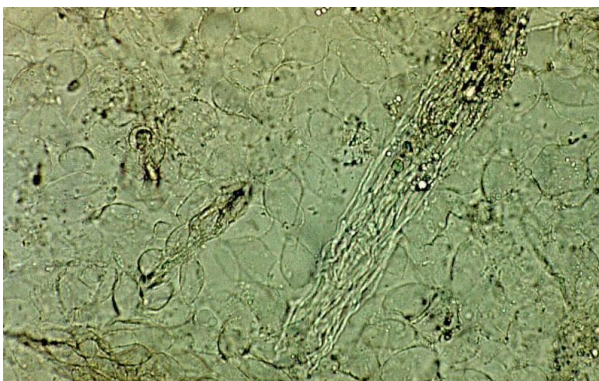
Desde el punto de vista meramente técnico, la observación del montaje entre porta y cubre a 400 X en seco, en campo claro con el diafragma abierto y el condensador bajo suele dar los mejores resultados. Así

preparados, nos sentamos al microscopio, enfocamos, nos relajamos y hacemos acopio de tiempo y paciencia; un examen microscópico adecuado está totalmente reñido con las prisas. Quien sea metódico puede seguir una pauta ordenada de recorrido, como en los contajes celulares. Quien sea caótico como es mi caso, tendrá que ir y venir por la preparación una y otra vez, saltando de un campo a otro, pero revisándolos siempre exhaustivamente.

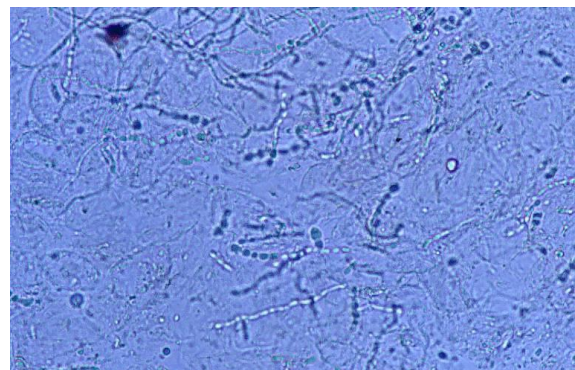
Como es bien sabido, buscamos hifas y artrosporas, pero si las vemos debemos ser muy restrictivos en su interpretación, siguiendo los siguientes criterios para considerarlas de dermatofito:

- las hifas deben ser múltiples, incoloras, ramificadas, septadas y refringentes
- deben ir acompañadas de artrosporas
- las artrosporas deben ser múltiples, incoloras, redondeadas y refringentes, y aparecer en cadenas, en mosaico o asociadas al bulbo o al tallo piloso
- si las artrosporas aparecen unidas a las hifas, mejor
- si hifas y artrosporas aparecen claramente asociadas al pelo (dentro o fuera) o a las células epiteliales, mejor que mejor

Si en un raspado debidamente aclarado con KOH 20% y exhaustivamente escrutado observamos hifas y artrosporas que cumplan al menos los tres primeros criterios...¡Bingo! hemos diagnosticado asertivamente tiña y ya podemos proponer el tratamiento.



Hifas y artrosporas en pelo



Hifas y artrosporas en epidermis

Si no vemos hifas ni artrosporas dermatofíticas, podemos evitar los falsos negativos repitiendo los montajes o incluso los muestreos, y siempre echándole paciencia y revisándolas exhaustivamente. Hubo un caso canino al que hice raspados y aclarados tres semanas consecutivas sin encontrar hifas ni artrosporas hasta observar lesiones en el dueño y hallarlo positivo en el primer raspado. El inmediato raspado y aclarado del perro salió escandalosamente positivo. Murphy está siempre al acecho.

BUSCANDO DERMATOFITOS: EL AISLAMIENTO Y LOS MEDIOS SELECTIVOS

Si en un buen raspado, aclarado y observado *secundum artem*, no observamos elementos dermatofíticos, o si queremos confirmar el diagnóstico microscópico e identificar el agente por motivos micológicos o epidemiológicos, debemos intentar el aislamiento.

Este es el momento de confesar humildemente una grave laguna en mi experiencia: nunca he usado de modo sistemático el Dermatophyte Test Medium, el conocido DTM. Las pocas veces que lo intenté sólo obtuve crecimiento de hongos contaminantes, probablemente por la escasa calidad del raspado sembrado, y desgraciadamente son bastantes los productores de ureasa que pueden contaminar el crecimiento dando falsos positivos.

La verdad es que la alternativa, el Sabouraud Glucosado en cualquiera de sus variantes, tampoco es para tirar cohetes por su tendencia a producir micelio indiferenciado con muchos dermatofitos y especialmente con los del Género *Trichophyton*, mientras a menudo permite crecer lujuriosamente a todo tipo de contaminantes, incluso bacterianos.

Pero a veces funciona, y es una verdadera satisfacción moral encontrar una colonia de *Microsporum* llena de macroconidias, con el reverso de la placa naranja intenso, o una de *Trichophyton* repleta de hifas espirales y microconidias y con el reverso color vino tinto.

BUSCANDO AGENTES BACTERIANOS Y LEVADURAS: EL MACERADO Y SU TINCIÓN

Si disponemos de muestras de exudados recogidas mediante hisopo estéril y éste se mantiene fresco, basta con hacer una extensión, fijar y teñir al Gram. Si se ha secado, cosa fácil en nuestros climas, se humedece previamente con SSF estéril. Pero si la muestra es un raspado y queremos evaluar al microscopio su contenido bacteriano, lo mejor es macerarlo previamente. Un vidrio de reloj con SSF es todo lo que se necesita, depositando con pinzas flameadas una muestra representativa de las costras, descamación y otras partículas, y calentándolo en la estufa a la vez que se hace el aclarado. Triturando posteriormente las partículas ablandadas entre dos portas, suelen conseguirse dos extensiones con suficiente adherencia al cristal para poder fijar y teñir al Gram (y al Panóptico o cualquier otra tinción de nuestra elección).

Las levaduras se tiñen como Gram+, por lo que no es raro observar las blastosporas características de *Candida* spp. o *Malassezia* spp. en tinciones de exudados o macerados, aunque es necesario valorar su patogenicidad en función de la clínica y de la situación de las lesiones.

Sin embargo, lo que suele mostrar la observación microscópica de estas tinciones, tanto de exudados como de macerados, son cantidades variables de cocos Gram+.

EL AISLAMIENTO BACTERIANO, O CUÁNDO TOMARSE EN SERIO UN ESTAFILOCOCO

"Estafilococia" y "pioderma" son probablemente los diagnósticos infecciosos más frecuentes en dermatología de pequeños animales. Casi en cualquier paciente dermatológico podemos observar y aislar estafilococos, incluso coagulasa + y potencialmente patógenos. Desgraciadamente, en cualquier animal sano también.

Cuando empecé mis pinitos dermatológicos en el equipo de Infecciosas de la Facultad de Córdoba, el medio estándar de aislamiento de estafilococos era el Agar Manitol Salino de Chapman, pero pronto

consensuamos en sustituirlo por el Agar Baird- Parker con yema de huevo, telurito y cloruro de litio, por su mayor eficacia en la detección de estafilococos, colonias negro azabache sobre fondo amarillo por la reducción del telurito, y rodeadas de un halo claro producido por la lecitinasa en los aislamientos coagulasa +. Su carácter selectivo permitía hacerse una buena idea de la densidad de estafilococos en la muestra por la densidad de colonias en la placa, y su peor inconveniente siempre fue la complejidad de preparación, al añadir *ex tempore* la yema de huevo estéril al medio base fundido.

Seguí confiando en este medio junto con mi nuevo equipo durante nuestros primeros años de actividad en la Facultad de Cáceres, pero posteriormente se fue imponiendo el criterio de usar Agar Sangre para el aislamiento de estafilococos, por las supuesta facilidad de reconocer como tales a las colonias β -hemolíticas por su doble halo de hemólisis, así como por su polivalencia y mayor facilidad de preparación. En la actualidad es lo que seguimos utilizando, y he de confesar que no me gusta. En Agar Sangre crece absolutamente TODO, y a menudo resulta kafkiano aislar una colonia β -hemolítica en una placa apresuradamente sembrada durante una práctica, y densamente cubierta de todo tipo de colonias. Y más con mi vista y mi pulso. Echo terriblemente de menos el viejo Baird-Parker.



Estafilococos en Agar Baird- Parker



Estafilococos con doble halo de hemólisis

Pero pasemos de nostalgias y consideremos que tenemos aislado un estafilococo certificado como tal y además coagulasa +. ¿Podemos sólo con esto diagnosticar una pioderma? Con desgraciada frecuencia así ocurre.

Estoy harto de ver muestras procedentes del exterior, de animales tratados de "piodermas recidivantes" y con lesiones poco o nada exudativas, y que ya en el aclarado muestran abundante presencia de *Demodex* u otros ácaros, o dermatofitos, o bien padecen leishmaniosis, o acaban mostrando algún problema subyacente alérgico, hormonal o metabólico. Naturalmente, las muestras también contienen estafilococos. ¿Son multirresistentes y es en verdad una recidiva, o simplemente la estafilococia es secundaria y no se ha tratado la causa real?

La ubicuidad de los estafilococos en las muestras dermatológicas y la frecuencia de portadores sanos obliga a establecer algún criterio de causalidad. Me permito ofrecer los míos propios, aunque no sean tan claros y concisos como los de identificación de estructuras dermatofíticas. Para considerarlos agentes causales de una dermatitis, los estafilococos:

- deben ser muchos, presentar una gran densidad en la muestra
- deben ser coagulasa +
- deben proceder de una lesión supurativa o exudativa, al menos al principio de su evolución (como ocurre en el impétigo)
- en lesiones supurativas se debe excluir la presencia de cuerpos extraños
- si proceden de una lesión seca, esta debe ser costrosa
- si proceden de una lesión alopecica o descamativa sin costras, debemos excluir previamente cualquier otra causa infecciosa, parasitaria, alérgica, metabólica u hormonal.

Desgraciadamente, no son infalibles y me han fallado estrepitosamente alguna vez, pero por no ser lo bastante estricto en su aplicación.

A la consulta de dermatología llegan a veces exudados procedentes de abscesos subcutáneos fistulizados. La técnica de procesado es igual, y a menudo se encuentran bacterias piógenas Gram + o Gram - "normales", pero conviene recordar que existen actinomicetos piógenos como *Actinomyces* o *Nocardia* que se tiñen mal o nada al Gram, y hay que estar dispuesto a usar el Kinyoun o el Diff-Quick si el Gam no muestra nada.

Y DOS PALABRAS SOBRE TRATAMIENTO

Para tiñas soy decidido partidario de los imidazoles tópicos, excepto en gatos, que no los toleran y además se lamen, y en los que hay que recurrir a griseofulvina, itraconazol (oral, mejor tolerado que el resto) o terbinafina.

Para estafilococos, siempre según antibiograma, a dosis altas y durante un mínimo de diez días. A menudo funciona, especialmente si la pioderma es primaria. Pero si no funciona, conviene recordar que una alternativa terapéutica de primer orden son las autovacunas, actualmente muy olvidadas. En épocas en que se podían preparar libremente, las usamos con mucha frecuencia y gran éxito en piodermas crónicas y recidivantes.

Y nunca debemos olvidar que una vez cumplido íntegro el tratamiento, aunque éste sea eficaz, la piel y el pelo pueden tardar hasta un mes en recobrar su integridad y aspecto normal.