

Mayo 2022

Asma equina: consejos y trucos del diagnóstico citológico

By Dra. Maria Christian



Fuente: Dra. Maria Christian

La evaluación de las enfermedades respiratorias equinas se basa en la anamnesis, el examen clínico, los hallazgos endoscópicos y las pruebas de función pulmonar; adicionalmente los exámenes de laboratorio, como la citología de material del tracto respiratorio (TBS -secreción traqueobronquial y BAL - lavado broncoalveolar), son también elementos importantes en el proceso de diagnóstico. Como siempre, el valor de las pruebas laboratoriales depende de la selección de la muestra y de su adecuada preparación.

El examen de TBS y/o BAL está indicado ante signos clásicos de enfermedad del tracto respiratorio, como tos, ruidos respiratorios patológicos, secreción nasal y disnea. Otra de las indicaciones es la intolerancia al ejercicio, que puede aparecer en el curso del asma equina de carácter leve a moderado (antes denominada: enfermedad inflamatoria de las vías respiratorias (IAD), en la que otros signos clínicos pueden ser muy sutiles.

La **obtención de TBS y BAL** ha sido descrita recientemente con gran detalle por Schwarz y Kühn con consejos útiles para su aplicación práctica. Pero, ¿cuándo es preferible examinar la TBS y cuándo es mejor realizar un BAL? ¿Qué importancia tienen los resultados a partir de las diferentes muestras? Para estudios bacteriológicos, se prefiere muestras traqueales, por lo que si se sospecha de enfermedades bacterianas (por ejemplo cuando hay fiebre), siempre se debe tomar TBS. El BAL está incluso contraindicado ante la sospecha de una neumonía bacteriana; sin embargo, es mucho más adecuado para el examen citológico porque sus hallazgos se correlacionan bien con la fisiopatología del proceso, en contraste con los del TBS. Además, dado que la imagen citológica de la TBS no es representativa de las vías respiratorias más profundas, el BAL es el método de elección para el estudio citológico de las enfermedades pulmonares difusas. Por ello, lo ideal es obtener ambos materiales de muestra.

La correcta preparación de las muestras es tan importante para el éxito del diagnóstico como su recogida. Lamentablemente, las células degeneran muy rápidamente en los líquidos de lavado, por lo tanto, aunque las muestras se envíen a un laboratorio para su evaluación, la preparación citológica debe realizarse inmediatamente a partir del material de muestra recién obtenido. Si los frotis solo se realizan en el laboratorio, a menudo las células, tras sólo unas horas de transporte/almacenamiento, ya no son evaluables y el valor de los hallazgos citológicos disminuye rápidamente.

Si la **TBS puede obtenerse sin lavado**, el frotis debe prepararse directamente a partir de la mucosidad. Para ello, se coloca una gota del material sobre un portaobjetos, sobre el que se posiciona un segundo portaobjetos sin presión y se desplaza rápidamente sobre el primero, o se separan ambos portaobjetos

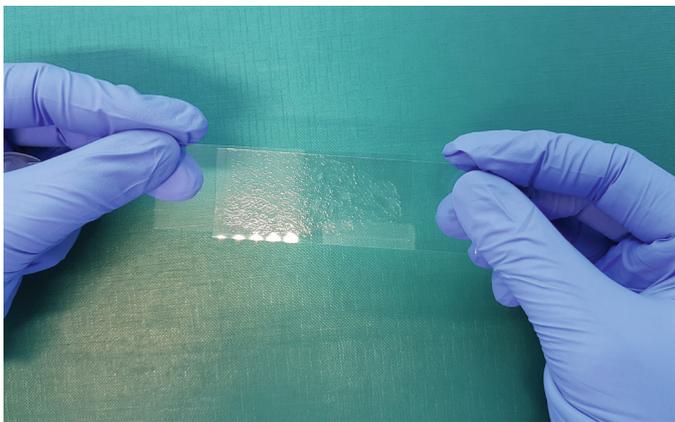


Fig. 1: Técnica de presión o squeeze

Fuente: Laboklin

en direcciones opuestas para que el material de la muestra se distribuya en el portaobjetos "como la mantequilla en una barra de pan" (Fig. 1). Si la **TBS** se ha obtenido por lavado, el material se centrifuga primero a baja velocidad (200 - 300 g), se **decanta el líquido** y, por último, se deposita una gota del moco sedimentado como se ha descrito anteriormente.

El líquido del **BAL** siempre es pobre en células, por lo que se debe enriquecer la muestra para su evaluación citológica. El método más sencillo es realizar un frotis de sedimento: se centrifuga a baja velocidad una parte de la muestra, de forma análoga a las muestras del lavado traqueal, y se decanta el sobrenadante. El pellet de células se resuspende con el resto del líquido y se extiende mediante la técnica de frotis de sangre: colocar una pequeña gota de esta suspensión en un extremo del portaobjetos, posicionar un segundo portaobjetos delante de la gota con un ángulo de unos 45° y desplazar hacia la gota hasta que el líquido se extienda por todo el borde. Por último, extender la muestra sobre

el portaobjetos empujando el portaobjetos hacia delante de forma enérgica y uniforme. Para evaluar los fluidos pobres en células, las preparaciones de mayor calidad se obtienen por citocentrifugación. Existen acoples especiales para determinadas centrifugas con este fin, pero su compra sólo es rentable si se utilizan con frecuencia. También es posible construir una "cámara de sedimentación" casera (Fig. 2): se coloca una jeringa de 2 ml por su cono sobre un portaobjetos con un papel de filtro que tiene un agujero del mismo tamaño que la apertura de la jeringa. La muestra se vierte a través del cono de la jeringa y el papel de filtro absorbe lentamente el líquido y las células se enriquecen en la zona del agujero del papel de filtro sobre el portaobjetos. Para evitar la multiplicación in vitro de bacterias, la cámara debe mantenerse en el



Fig. 2: Cámara de sedimentación casera construida con un portaobjetos, un papel de filtro perforado, una jeringa y dos pinzas de presión fuertes.

Fuente: Laboklin

frigorífico durante la sedimentación.

Para una **buena conservación** de las células, es importante secar las preparaciones lo más rápido posible. El secado puede acelerarse colocando las preparaciones en una incubadora o sobre una superficie caliente, especialmente si el material es viscoso. También es posible secarlas delicadamente con aire tibio. Los portaobjetos con la extensión seca y sin teñir se envían al laboratorio en cajas especiales **de transporte** y alícuotas representativas de las muestras recogidas se introducen en tubos de ensayo sin recubrimiento y bien cerrados. El material de la muestra líquida debe llegar al laboratorio lo antes posible en frío (puede ser necesario utilizar petacas de frío).

Las **preparaciones se pueden teñir con tinciones rápidas** comerciales del tipo Romanowsky, pero al menos un frotis debe teñirse con tinción específica para los gránulos de mastocitos, como el azul de toluidina. Estos gránulos son fáciles de pasar por alto en las muestras del tracto respiratorio,

siendo muy significativos desde el punto de vista diagnóstico (**Fig. 4**). El **patrón celular fisiológico** de la TBS y el BAL refleja la estructura anatómica de las respectivas secciones del tracto respiratorio. En los animales sanos, las preparaciones citológicas son pobres en células, con escasas células tisulares (epitelio ciliado y células caliciformes, **fig. 3**) y un pequeño número de células inflamatorias (principalmente macrófagos y linfocitos, y un menor número de neutrófilos, eosinófilos y mastocitos, **fig. 4**). En la **tabla 1** se muestra un resumen del componente celular de la TBS y del BAL de caballos asintomáticos.

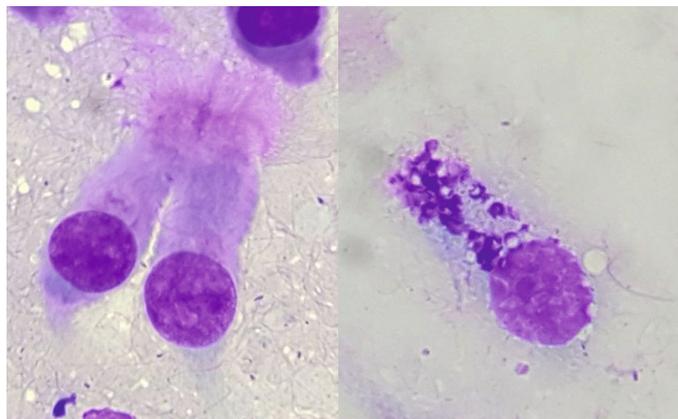


Fig. 3: Tinción rápida de Romanowsky. A la izquierda: células de epitelio ciliado. A la derecha una célula caliciforme. Fuente: Laboklin

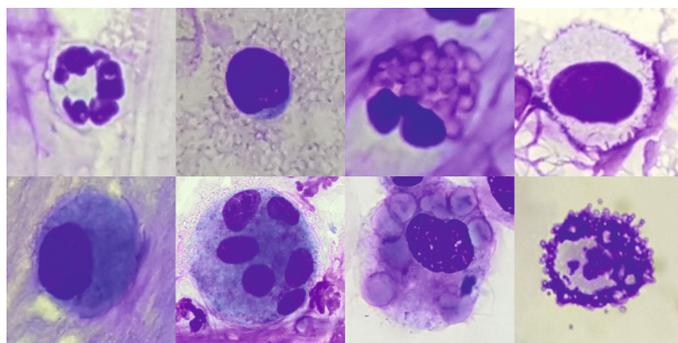


Fig. 4: Células inflamatorias; arriba de izquierda a derecha: neutrófilo, linfocito, eosinófilo, mastocito (tinción rápida de Romanowsky); abajo de izquierda a derecha: macrófago inactivado, macrófago multinucleado, eritrofago, mastocito (azul de toluidina).

Fuente: Laboklin

Apenas existen **valores de referencia** de la composición celular de las TBS en la literatura. La afirmación a menudo citada de que un porcentaje superior al 20% de neutrófilos es indicativa de un proceso inflamatorio debe considerarse con cautela. Diversos estudios han demostrado que bajo determinadas condiciones, incluso caballos clínicamente sanos pueden tener una proporción significativamente mayor de neutrófilos en el TBS. Entre las causas discutidas se encuentran la alimentación con heno en forma de pacas redondas, estar al aire libre en tiempo frío y el entrenamiento intenso. La composición celular del BAL es mucho menos dependiente de los factores ambientales y, por lo tanto, es más adecuada para el diagnóstico de enfermedades difusas, especialmente de las vías respiratorias más profundas. Por supuesto, los resultados más significativos se obtienen examinando el TBS y el BAL simultáneamente.



Fig. 5: Hifa fúngica alargada de doble pared y 4 granos de polen. Tinción rápida de tipo romanowsky

Fuente: Laboklin

Tipo celular	TBS fisiológico	BAL fisiológico
Epitelio ciliado	rico	pobre
Macrófagos	79.6 +/- 8.2%	50 - 70 %
Linfocitos	9.3 +/- 5.8%	30 - 50 %
Neutrófilos	9.3 +/- 4.9%	< 5%
Eosinófilos	0.2 +/- 0.6%	< 0.1%
Mastocitos	0%	< 2%

Tab. 1: Composición celular fisiológica de TBS y BAL

según Cian et al. 2015

Tipo celular de BAL	Asma equina leve/moderada (IAD)	Asma equina grave (RAO)
Neutrófilos	5 – 20 %	> 25
Eosinófilos	> 0.1%	< 0.1%
Mastocitos	> 2%	< 2%

Tab. 2: Composición celular BAL en el asma equina

según Cian et al. 2015

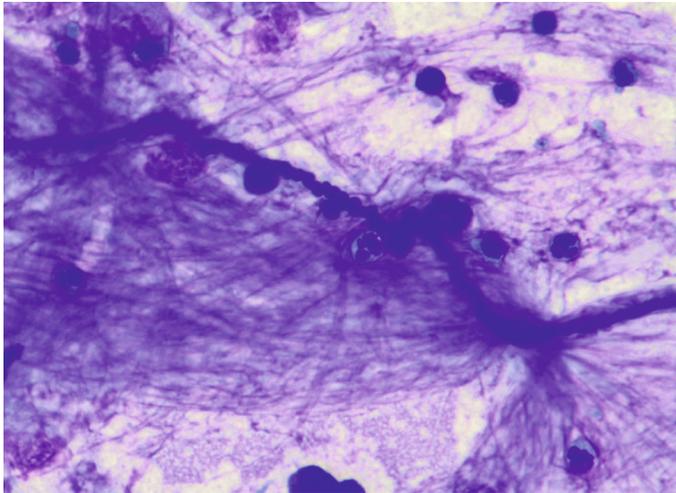


Fig. 6: Espiral de Curschmann. Tinción rápida tipo romanowsky

Fuente: Laboklin

En las enfermedades del tracto respiratorio, se producen cambios tanto en el contenido celular, como en la proporción de los diferentes tipos de celulares. Además, en el examen citológico se busca la presencia de estructuras como elementos fúngicos inhalados (fig. 5), partículas vegetales y polen (fig. 5) o agentes infecciosos como bacterias. Las espirales de Curschmann (fig. 6) son secreciones con moco espeso de las vías aéreas pequeñas e indican una mala depuración mucociliar.

Para la diferenciación de las inflamaciones respiratorias estériles, como el asma equina de leve a moderada (anteriormente IAD) y el asma equina de alto grado (anteriormente: obstrucción recurrente de las vías respiratorias (COPD)), es útil la determinación del patrón celular del BAL (Tab. 2). Ambas formas de asma producen un incremento de neutrófilos en la muestra. En el asma equina de leve a moderada, el aumento es leve (5-20% de neutrófilos), pudiéndose encontrar también un aumento de mastocitos (> 2%) y eosinófilos (> 0,1%). El asma equina de alto grado se asocia con un marcado aumento de neutrófilos (> 25%), encontrándose en muchos casos casi exclusivamente neutrófilos. La **inflamación séptica** suele provocar recuentos celulares muy elevados con una proporción muy alta de neutrófilos. Por lo que, sin la detección de bacterias fagocitadas, el cuadro celular es exactamente similar al de una **inflamación estéril** de alto grado. Es importante interpretar siempre los hallazgos citológicos en conjunto con la historia y el cuadro clínico.

Si se sospecha clínicamente de una enfermedad bacteriana, debe realizarse siempre un examen bacteriológico de la TBS. Los macrófagos que han fagocitado eritrocitos (Fig. 4) o que contienen sus productos de degradación (hemosiderina o hematoïdina) indican la presencia de hemorragia pulmonar. Las hemorragias leves pueden existir en el curso de diversas enfermedades y pueden ser causadas, por ejemplo, por ataques intensos de tos. Sin embargo, las inclusiones sanguíneas prominentes pueden indicar la presencia de una hemorragia pulmonar inducida **por esfuerzo (EIPH)**. Por supuesto, hay que distinguir una hemorragia de un coágulo de sangre relacionado con la toma de muestras. Esto se puede constatar evaluando las extensiones de muestras recién obtenidas, si en ellas hay también evidencia de degradación eritrocitaria, hay hemorragia.

En algunas **enfermedades pulmonares raras**, como la fibrosis pulmonar multinodular equina (EMPF), es necesario realizar un examen histopatológico del tejido pulmonar para su diagnóstico, ya que los hallazgos citológicos del BAL no son específicos. Sin embargo, el BAL puede ser analizado por PCR para el EHV-5, que está asociado a la EMPF. La citología de la TBS y BAL no solo contribuye de forma valiosa al diagnóstico de las enfermedades respiratorias, sino que también proporciona información sobre la gravedad de la enfermedad y los enfoques terapéuticos. La selección del material de muestra apropiado y la realización de preparaciones citológicas de buena calidad son cruciales para obtener resultados significativos.

Literatura

Schwarz B, Kühn H. Durchführung und Probenaufbereitung von Tracheobronchialsekret und Bronchoalveolarlavage in der Pferde praxis und die häufigsten Fehlerquellen. TU Pferd & Nutztier 2020; 75 (4): 6 – 12

Cian F, Monti P, Durham A. Cytology of the lower respiratory tract in horses: An updated review. Equine Vet Educ 2015; 27 (10): 544 – 553