

CITOLOGIA DIAGNOSTICA: LE INFEZIONI BATTERICHE*

KENNETH D. CLINKENBEARD, PhD, DVM - RICK L. COWELL, DVM, MS
REBECCA J. MORTON, DVM - DANA B. WALKER, DVM - HEATHER L. GOWMAN, DVM
JAMES H. MEINKOTH, DVM, MS, PhD
Oklahoma State University

Riassunto

Le infezioni batteriche sono una causa comune di malattia nei piccoli animali e possono essere diagnosticate con un esame citologico. L'individuazione di batteri negli strisci citologici richiede un microscopio dotato di obiettivo ad immersione con ingrandimento 100×, oltre alla capacità di riconoscere i caratteri delle varie forme batteriche e di distinguerli da quelli di altre strutture simili che spesso si riscontrano nei preparati. I batteri sono riconoscibili in quanto costituiti da una popolazione di formazioni aventi in comune forma, dimensioni e caratteristiche di colorazione. Alcuni miceti, protozoi e altre formazioni comunemente riscontrate negli strisci possono somigliare alle cellule batteriche. Nel presente lavoro vengono forniti i criteri per distinguere i batteri da ogni altra struttura. Le infezioni batteriche generalmente inducono una risposta infiammatoria caratterizzata da un aumento dei neutrofili nello striscio. Vengono quindi anche forniti i criteri per interpretare gli strisci citologici contenenti batteri provenienti da infezioni e quelli dovuti a contaminazione. Verrà discussa la correlazione diagnostica esistente fra caratteri citologici e coltura batterica.

Summary

Bacterial infections are a common cause of disease in small animals and can be diagnosed by using cytology. Detection of bacteria in cytologic smears requires a microscope with a ×100 oil immersion lens as well as the ability of the practitioner to recognize cytologic features of various bacterial forms. Practitioners should also be able to distinguish these features from those of other similar objects often present in cytologic preparations. Bacteria can be recognized in cytologic smears because they comprise a population of objects that exhibit certain distinct features of form, size, and staining characteristics. Some fungi, protozoa, and other objects commonly encountered in cytologic preparations can mimic the appearance of bacteria. Guidelines for distinguishing bacteria from these objects are presented. Bacterial infections typically exhibit an inflammatory response that is characterized by an increased number of neutrophils in smears. Guidelines for interpretation of cytologic smears that contain bacteria as infection versus contamination are provided. The diagnostic correlation between cytologic and bacterial culture is discussed.

Le infezioni batteriche sono cause comuni di malattia nei piccoli animali e possono essere diagnosticate con facilità grazie agli esami citologici.¹⁻⁵ La sensibilità dell'esame citologico per identificare i batteri è paragonabile a quella dell'esame colturale; tuttavia, le informazioni diagnostiche che si ottengono dai due metodi sono diverse. Poiché il riscontro citologico di infezione batterica può avvenire nel corso dell'esame clinico, la diagnosi di infezione batterica può essere formulata direttamente. Ciò permette di iniziare una

terapia antimicrobica provvisoria da confermare in seguito sulla base dei risultati delle colture batteriche e dell'antibiogramma, che servono anche a stabilire la prognosi.

Il riscontro di batteri negli strisci citologici richiede la disponibilità di un microscopio con ingrandimento appropriato (100× con obiettivo ad immersione) e la capacità di riconoscere le caratteristiche delle varie forme batteriche e di distinguerle da quelle di altre strutture simili, spesso presenti nel preparato. In questo lavoro vengono indicati i caratteri citologici utili per riconoscere le cellule batteriche e distinguerle da materiale di scarto, miceti o altre formazioni comunemente riscontrabili. Verranno inoltre discussi i criteri per differenziare le infezioni batteriche dalle contaminazioni di microrganismi saprofiti e le indicazioni diagno-

*Da "The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian" Vol. 17, N. 1, gennaio 1995, 71. Con l'autorizzazione dell'Editore.

stiche per integrare le informazioni ottenute attraverso gli esami citologico e colturale.

INDICAZIONI

La possibile presenza di un'infezione batterica viene segnalata dalle manifestazioni cliniche di infiammazione. La sede anatomica in cui eseguire il prelievo spesso viene individuata grazie a segni infiammatori localizzati (quali eritema, calore, gonfiore e dolore). A volte mancano segni locali evidenti e si osservano unicamente manifestazioni sistemiche (come febbre, malessere e anoressia). La presenza di segni clinici riferibili a compromissione organica (ad es., tosse e segni radiografici, ecografici o endoscopici di raccolte liquide e di ingrossamento degli organi) permette di determinare la sede anatomica in cui prelevare il campione da sottoporre ad esame citologico.

PRELIEVO DEL CAMPIONE, ESECUZIONE E COLORAZIONE DELLO STRISCIO

I campioni per l'esame citologico possono essere prelevati per impronta, con tampone, per scarificazione o mediante aspirazione con ago sottile. La tecnica di prelievo più adatta dipende dalla sede e dalla natura della lesione. Nelle lesioni cutanee essudative si può ottenere l'impronta diretta dell'essudato sul vetrino; invece, dalla lesione sottostante il campione può essere prelevato con un tampone o per scarificazione dopo avere rimosso l'essudato e avere ripulito la parte. Le lesioni più profonde possono richiedere una scarificazione più energica (raschiato) per raccogliere un campione appropriato. Analogamente, dopo avere ripulito la superficie, si possono eseguire prelievi dai tragitti fistolosi inserendovi il tampone e facendolo procedere in profondità. In caso di lesioni sottocutanee o a carico di tessuti più profondi, i campioni più adatti sono quelli ottenuti per aspirazione con ago sottile oppure per impronta di biopsie a core o chirurgiche. L'aspirazione con ago sottile di lesioni sottocutanee è ben tollerata dalla maggior parte dei soggetti senza ricorrere alla sedazione, mentre lo stesso tipo di prelievo eseguito per via percutanea a carico di visceri richiede un'anestesia generale di breve durata. Per assicurarsi di avere prelevato un campione sufficiente, lo striscio deve essere colorato ed esaminato prima di restituire l'animale al proprietario.

Per ridurre al minimo la proliferazione batterica e il deterioramento delle cellule dell'ospite dopo la raccolta, il vetrino deve essere allestito al più presto. L'obiettivo dello striscio è di ottenere uno strato del materiale aspirato dello spessore di una sola cellula (un monostrato). L'esame delle aree in monostrato consente di identificare i batteri oltre a vari tipi di cellule appartenenti all'organismo ospite (ad es. elementi infiammatori, epiteliali e fusiformi) presenti nell'aspirato. Gli strisci di spessore eccessivo limitano il riconoscimento dei caratteri citologici utili per identificare batteri ed elementi cellulari.

Lo striscio dal campione aspirato può essere allestito con diverse tecniche, ma quella più utilizzata è la stessa che si adopera per i campioni di sangue. Se il campione è stato prelevato con un tampone, quest'ultimo deve essere fatto

rotolare con delicatezza e non trascinato sul vetrino per evitare di rompere gli elementi cellulari. Nell'allestire uno striscio per impronta a partire da biopsie a core o chirurgiche occorre rimuovere il sangue e i liquidi organici che sono presenti sulla superficie di taglio fresca del campione. La manovra si esegue asciugando la superficie con carta assorbente pulita e sterile prima di procedere alla realizzazione dell'impronta. L'uso di formalina, alcool, lacca o altri fissatori deve essere evitato poiché queste sostanze possono alterare in modo irreversibile le caratteristiche di colorazione del preparato citologico. In letteratura è possibile trovare descrizioni più dettagliate riguardo il prelievo dei campioni e le tecniche di allestimento degli strisci.⁶

Gli strisci lasciati asciugare all'aria vengono colorati con i metodi per ematologia (tipo Romanowsky) comunemente disponibili in commercio (ad es. colorante di Wright, Wright-Giemsa, Diff-Quick® o altri tipi rapidi). Gli strisci vengono colorati con la tecnica ad immersione come indicato nelle descrizioni fornite dalla ditta produttrice. Per i preparati citologici si possono anche utilizzare le colorazioni per batteriologia (come quella di Gram). Poiché i batteri vengono individuati con facilità utilizzando i coloranti per ematologia, il vantaggio della colorazione di Gram non riguarda questo aspetto, mentre è utile per stabilire se siano coinvolti batteri Gram-negativi o Gram-positivi oppure se sia presente una popolazione mista. La colorazione di Gram non è particolarmente adatta per le cellule dell'ospite. La maggior parte dei tessuti che formano lo sfondo appare rosa e contrasta poco con i batteri Gram negativi. Pertanto, questo metodo dovrebbe essere utilizzato insieme e non in sostituzione a quello per ematologia. La colorazione di Gram dei campioni citologici è sensibile all'interferenza creata da variazioni di pH, componenti cellulari, irregolarità di spessore dello striscio e variabilità delle tecniche di colorazione. Data la discutibile affidabilità degli strisci citologici colorati con il metodo Gram, non è consigliabile basarsi unicamente sull'interpretazione di questi ultimi.

RICONOSCIMENTO DEI BATTERI

Negli strisci citologici, i batteri sono riconoscibili in quanto costituiti da una popolazione di strutture dotate di particolare forma, dimensione e affinità per i coloranti (Fig. 1). Le forme batteriche riscontrate con maggiore frequenza sono quelle cocciche, bastoncellari e filamentose, mentre fra quelle meno comuni vi sono i bastoncelli bipolari (simili a spille da balia), le forme spirillari (a cavaturaccioli) e le spirochete (filiformi). Indipendentemente dalla forma, è importante osservarne un numero sufficientemente elevato nello striscio potendo in tale modo distinguere le forme batteriche sospette da altri microrganismi, elementi cellulari o materiali estranei presenti nello striscio.

Nel preparato, i batteri appaiono come strutture di piccole dimensioni che richiedono l'uso di un obiettivo ad immersione con ingrandimento 100× per potere essere osservate adeguatamente. Il diametro dei cocci batterici e la lunghezza dei bastoncelli nella maggior parte delle specie è compreso fra 0,3 e 2,5 μ.⁷ I batteri filamentosi e le catene di cocci o bastoncelli possono essere più lunghi della lunghezza della maggior parte delle cellule osservate nello striscio (fra 20 e 50 micrometri) (Fig. 2). Le dimensioni batteri-

che possono essere stimate utilizzando come paragone gli eritrociti che, nel gatto e nel cane, raggiungono rispettivamente circa 5 e 7 μ . Anche eventuali formazioni sospette nello striscio possono essere paragonate agli eritrociti, per stabilire se le loro dimensioni corrispondano o meno a quelle delle cellule batteriche (Fig. 3).

I batteri si colorano tipicamente in blu scuro con le tecniche per ematologia, mentre alcuni possono apparire rossi o rosa a seconda della composizione e del tempo di azione del colorante. A differenza del metodo di Gram, i coloranti per ematologia non consentono di differenziare le specie batteriche e non possono essere utilizzati per identificare particolari gruppi di microrganismi. È necessario ricorrere alle colture batteriche per identificare in modo specifico determinate specie coinvolte. Tuttavia, esistono aspetti citologici che permettono di riconoscere provvisoriamente alcuni generi o gruppi batterici in attesa dei risultati dell'esame colturale e dell'antibiogramma.

In generale, i batteri Gram positivi hanno dimensioni maggiori di quelli Gram negativi. I grossi bastoncini

Gram+ appartenenti alle specie *Bacillus* e *Clostridium* hanno lunghezza compresa fra 1,5 e 2,5 μ (Fig. 3), mentre in quelli Gram- questa misura è pari o inferiore a 1,5 μ .^{1,8,9} Le endospore, che vengono prodotte esclusivamente da *Bacillus* e *Clostridium* spp., appaiono come sporgenze traslucide, da tondeggianti a ovalari, all'interno del bastoncino oppure come strutture ovali iperrifrangenti non colorate all'esterno della cellula batterica (Fig. 3). I batteri filamentosi riscontrati con maggiore frequenza negli strisci citologici allestiti in cani e gatti sono *Actinomyces* e *Nocardia* spp. Citologicamente, questi microrganismi formano filamenti sottili, medio-corti (da 5 a 10 micrometri) che non si colorano in modo uniforme e quindi assumono l'aspetto di un filo di perle (Fig. 4). Elementi singoli di una data specie possono assumere particolari configurazioni, come coppie o tetrameri di *Staphylococcus* spp. (Fig. 5) e catene medio-lunghe di cocci del genere *Streptococcus* (Fig. 6).

L'aspetto citologico di alcuni miceti e protozoi può essere confuso con quello dei batteri. Dimensioni, forma e affinità tintoriali solitamente consentono di distinguere i microrga-

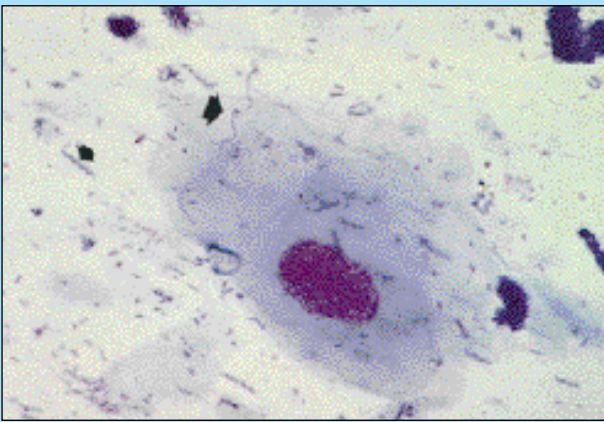


FIGURA 1 - Batteri saprofiti spirillari aventi forma di bastoncini grossi e piccoli (freccia piccola) e spirochete (freccia grande) circondano la superficie di una cellula dell'epitelio squamoso in un raschiato di mucosa orale prelevato in un cane (250 \times) (Gentilmente concesso dal Department of Veterinary Pathology, Oklahoma State University).

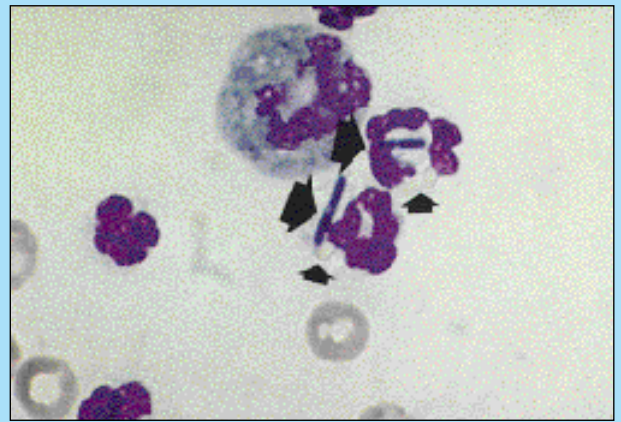


FIGURA 3 - Batteri bastoncellari di grosse dimensioni (frecche grandi) ed endospore libere (frecche piccole) (*Clostridium* spp.) fagocitati da neutrofilo in uno striscio per impronta eseguito da un carcinoma epatico in un cane. (250 \times) (Gentile concessione del Department of Veterinary Pathology, Oklahoma State University).

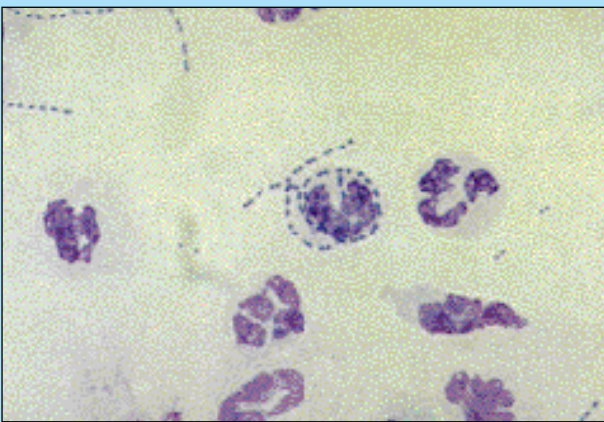


FIGURA 2 - Lunga catena di cocci che circonda un leucocita neutrofilo in uno striscio eseguito dal sedimento del liquido di lavaggio tracheale in un cane. (400 \times) (Gentile concessione dell'Oklahoma Veterinary Diagnostics, Stillwater, Oklahoma).

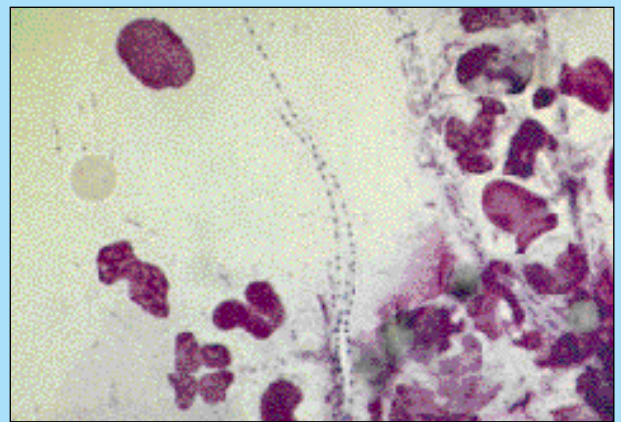


FIGURA 4 - Lunghi batteri filamentosi con aspetto a corona di rosario tipico di *Actinomyces* o *Nocardia* spp. provenienti dal liquido pleurico di un cane. Sono presenti anche neutrofilo degenerati. (250 \times) (Gentile concessione del Department of Veterinary Pathologists, Oklahoma State University).

nismi eucarioti dalla controparte procariota. La forma degli lieviti è tipicamente rotonda, ovalare o oblunga (a sigaro) (Fig. 7). Questi organismi si distinguono dai batteri per le maggiori dimensioni (che variano da 4 a 10 μ , vale a dire da una e mezzo a due volte quella degli eritrociti) e la cui natura può essere confermata dalla presenza di gemme o blastospore⁷ (Fig. 7). Inoltre, nei microrganismi eucarioti è tipica la presenza di un nucleo che assume tinta porpora in un citoplasma che si colora in azzurro. Questo aspetto contrasta con quanto accade nei batteri che si colorano uniformemente in blu scuro.

La localizzazione all'interno dei macrofagi è un altro aspetto che consente di differenziare alcuni lieviti e protozoi (ad es. *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii* e *Leishmania donovani*) dai batteri. Benché questi agenti patogeni eucarioti possano essere riscontrati liberi o all'interno di leucociti neutrofili, solitamente sono contenuti nei macrofagi (Fig. 7). Al contrario, sono pochi i batteri che albergano principalmente in tale sede (ad es. *Mycobacterium*, *Brucella* e *Listeria*).^{1,2} Quando vengono riscontrati in ambito cellulare, solitamente questi microrganismi si trovano nei leucociti neutrofili per un processo di fagocitosi (Fig. 3), mentre è raro osservarli nei macrofagi in seguito a citofagia macrofagica di neutrofili contenenti i microrganismi fagocitati.

Le ife fungine sono più larghe ($\geq 2 \mu$) dei filamenti batterici ($\leq 1 \mu$). Alcuni miceti sono anche dotati di una parete cellulare distinta che risulta visibile lungo la periferia dell'ifa con setti che separano le singole cellule all'interno dell'ifa stessa (Fig. 8). I batteri filamentosi non posseggono queste caratteristiche. Inoltre, nella maggior parte dei miceti si riscontrano ife ramificate. Benché la maggior parte dei batteri filamentosi sia dotata di ramificazioni in coltura, questo aspetto si osserva raramente nei preparati citologici (Fig. 4). Questo può accadere a causa della frammentazione delle ramificazioni batteriche durante la raccolta del campione e l'allestimento dello striscio.

Varie altre strutture comunemente riscontrate nei preparati citologici possono riprodurre le cellule batteriche. I precipitati di colorante sono formazioni granulari color porpora scuro oppure aggregati cristallini o piccoli cilindri e sfere (Fig. 9). I precipitati di colorante si rilevano in sede

extracellulare oppure sembrano inclusi nel citoplasma poiché sovrapposti alla cellula e spesso vengono identificati come tali poiché li si riscontra in zone del vetrino in cui non è presente materiale strisciato. La formazione di questi precipitati può essere limitata filtrando il colorante attraverso una carta assorbente e rinnovandolo ad intervalli regolari.

I frammenti cellulari e le particelle contaminanti vengono confusi facilmente con i batteri; infatti appaiono come gruppi di strutture di dimensione e forma irregolare situati all'esterno delle cellule o sulla loro superficie. I granuli liberi di melanina e di mucina, analogamente a quelli provenienti da mastcellule o eosinofili sono di dimensioni piccole e uniformi e assomigliano a batteri. I granuli di melanina appaiono come bastoncelli extracellulari di colore nero, marrone o verde ed è possibile osservarli anche nei macrofagi e nei melanociti (Fig. 10). I granuli di mucina sono strutture arrotondate, rosse e di dimensioni medie (pari a circa la metà degli eritrociti) che si riscontrano liberi o all'interno di cellule caliciformi negli strisci allestiti da

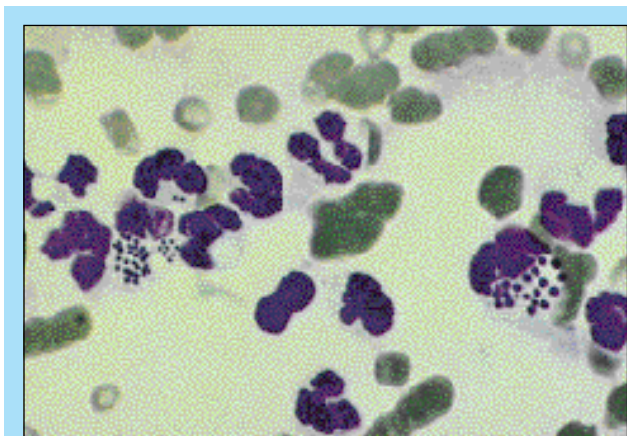


FIGURA 5 - Cocchi fagocitati (*Staphylococcus* spp.) da neutrofili in un tampone auricolare prelevato nel gatto. (400 \times) (Gentile concessione dell'Oklahoma Veterinary Diagnostics, Stillwater, Oklahoma).

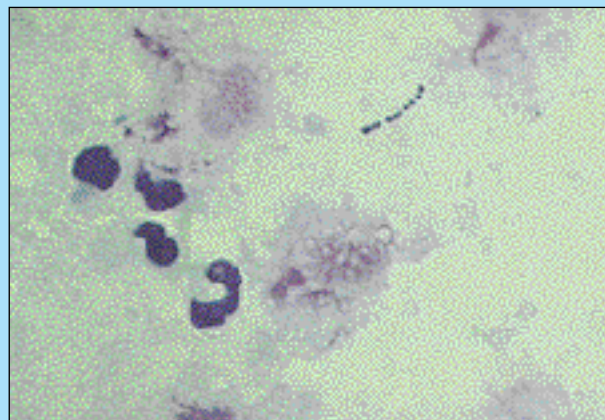


FIGURA 6 - Corta catena di cocchi (*Streptococcus* spp.) contenuta nel liquido di lavaggio tracheale prelevato da un cane. (250 \times) (Gentile concessione del Department of Veterinary Pathology, Oklahoma State University).

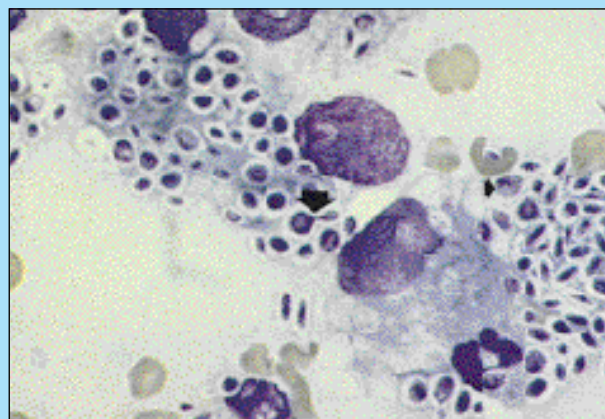


FIGURA 7 - Lieviti ovalari o a forma di sigaro (*Sporothrix schenckii*) all'interno di macrofagi in uno striscio per impronta eseguito da un traghetto fistoloso presente sul muso di un gatto. La localizzazione intracellulare nei macrofagi, la gemmazione (freccia grande) e la presenza di nuclei (freccia piccola) consentono di distinguere questi microrganismi dai batteri (250 \times) (Gentile concessione del Department of Veterinary Pathology, Oklahoma state University).

superfici mucose (Fig. 11). I granuli provenienti da *mast-cell* e da eosinofili si colorano in rosso porpora (i primi) e in arancio (i secondi). Si tratta di granuli di piccole dimensioni (diametro pari a circa 1 μ) e rotondi, eccetto quelli degli eosinofili di gatto che hanno forma bastoncellare. I granuli liberi provenienti da queste cellule solitamente vengono identificati come tali confrontandoli con quelli di *mast-cell* intatte o di eosinofili presenti nello striscio (Fig. 12). Le ciglia libere, distaccatesi dalla superficie dell'epitelio respiratorio, assomigliano a spirochete; tuttavia nello stesso striscio spesso sono presenti elementi cellulari con le ciglia integre che indicando la reale origine di questi pseudobatteri.

I versamenti talora contengono proteine coagulate o precipitate che possono essere confuse con batteri. Si tratta di filamenti di piccole dimensioni e di forma irregolare che si colorano male o che si aggregano sullo sfondo dello striscio. La forma irregolare e la scarsa colorabilità di queste proteine coagulate consente di differenziarle dai batteri.

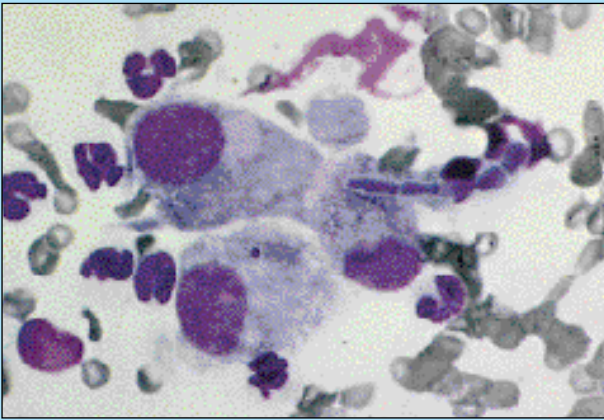


FIGURA 8 - Ife settate in un tampone nasale prelevato in un gatto. Le ife sono più larghe dei batteri filamentosi. Gli eritrociti visibili possono essere utilizzati per stabilire le dimensioni relative dei microrganismi presenti nello striscio. (100 \times) (Gentile concessione del Department of Veterinary Pathology, Oklahoma State University).

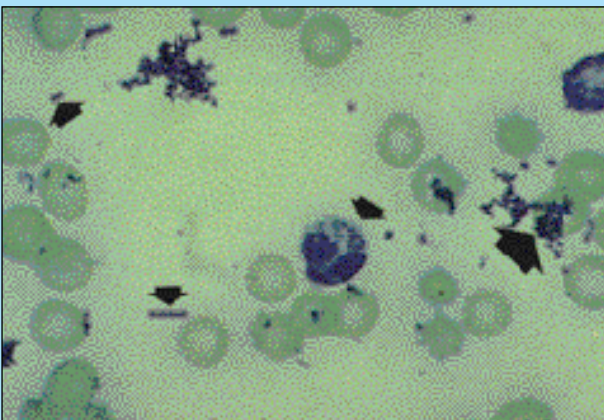


FIGURA 9 - Precipitati di colorante sovrapposti ad eritrociti (freccia grande), cocchi fagocitati e batteri bastoncellari in sede extracellulare (freccia piccola) in un aspirato prelevato da una massa retrofaringea in un cane. (330 \times) (Gentile concessione del Department of Veterinary Pathology, Oklahoma State University).

INTERPRETAZIONE CITOLOGICA

Le infezioni batteriche sono quasi sempre accompagnate da una risposta infiammatoria dell'ospite.^{1,2} Solitamente, in caso di infezione batterica si osserva un numero molto elevato di leucociti neutrofili negli strisci allestiti dal tessuto colpito¹ ($\geq 85\%$ della popolazione cellulare oppure >3 neutrofili per campo microscopico a 40 \times) (Fig. 13). Quando si rileva un aumento dei leucociti neutrofili, bisogna sempre sospettare la possibilità di un'infezione batterica. Il riscontro di questi microrganismi in uno striscio contenente molti neutrofili depone a favore dell'infezione, ma non ne costituisce la prova conclusiva. L'individuazione di batteri in sedi normalmente sterili (come la cavità pleurica o quella peritoneale) è un chiaro indice di infezione, mentre il reperto degli stessi in una sede dove comunemente albergano microrganismi saprofiti (cute, mucosa orofaringea) non implica necessariamente la diagnosi di infezione batterica anche in presenza di un processo infiammatorio.

L'osservazione di batteri fagocitati dai leucociti neutrofili è un'indicazione certa di infezione batterica. In questi casi si rileva la presenza di una o più cellule batteriche contenute nel citoplasma leucocitario (Figg. 3 e 5) e occorre molta attenzione per non confondere questo quadro con la sovrapposizione di batteri ai neutrofili. Solitamente, la percentuale di batteri fagocitati in uno striscio è pari o inferiore al 10%.

Talvolta, i campioni citologici prelevati in sedi infettate da batteri contengono un numero elevato di leucociti neutrofili, mentre all'osservazione microscopica non è possibile individuarvi alcuna cellula batterica. Questo fenomeno può essere attribuito al fatto che i batteri presenti siano in numero molto limitato oppure che siano difficili da visualizzare in quanto poco colorabili o di dimensioni tanto esigue (ad esempio micoplasmi, forme L, alcune spirochete e rickettsie) da essere al limite della risoluzione del microscopio ottico.

È raro non rilevare leucociti neutrofili negli strisci eseguiti da zone infette. Nei soggetti con gravi forme di neutropenia, il numero di neutrofili può essere insufficiente a

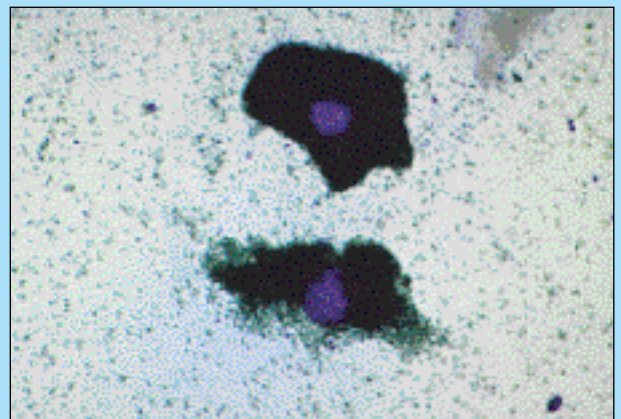


FIGURA 10 - I granuli di melanina sono strutture uniformi, tondeggianti, di piccole dimensioni che si colorano in nero, osservate in sede extracellulare e nei melanoblasti originanti da melanomi maligni nel cane. (250 \times) (Gentile concessione del Department of Veterinary Pathology, Oklahoma State University).

produrre una neutrofilia tissutale, in particolare nelle infezioni che coinvolgono le grandi cavità corporee (come lo spazio peritoneale). Inoltre, alcuni batteri producono tossine in grado di lisare i neutrofili in ambito tissutale, con conseguente calo di questi ultimi nei tessuti infetti.

Più comunemente, le tossine batteriche inducono modificazioni morfologiche dei leucociti neutrofili, che rappresentano indici indiretti di infezione batterica. L'intossicazione degli elementi leucocitari si verifica in ambito midollare (alterazioni tossiche) oppure tissutale (alterazioni degenerative).¹⁰ Le prime derivano da difetti di maturazione dei leucociti neutrofili (ad es. corpi di Dohle, basofilia e vacuolizzazione citoplasmatiche diffuse, granulazioni tossiche e comparsa di neutrofili giganti) e vengono osservate durante la valutazione degli strisci di sangue. Le modificazioni tossiche derivano più comunemente dal passaggio nel circolo ematico di tossine batteriche provenienti da una sede infetta

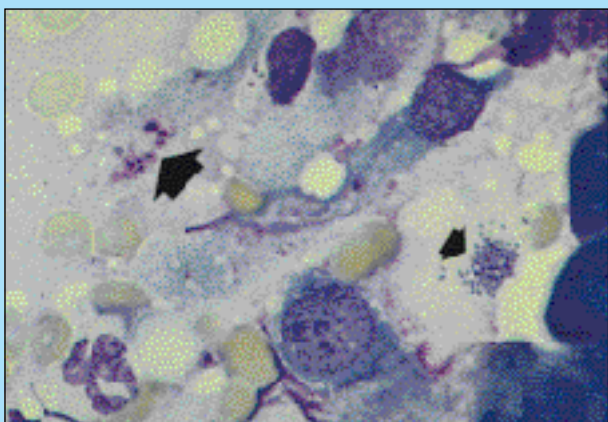


FIGURA 11 - I granuli di mucina (frecche grandi) in una cellula caliciforme sono strutture di dimensioni da piccole a medie, tondeggianti e di colore rosa che differenziano dai cocci di aspetto uniforme, tondeggianti e che assumono colorazione scura, presenti in forma singola o in coppie (freccia piccola) nel liquido di lavaggio tracheale prelevato in un cane. (400×) (Gentile concessione del Oklahoma Veterinary Diagnostics, Stillwater, Oklahoma).

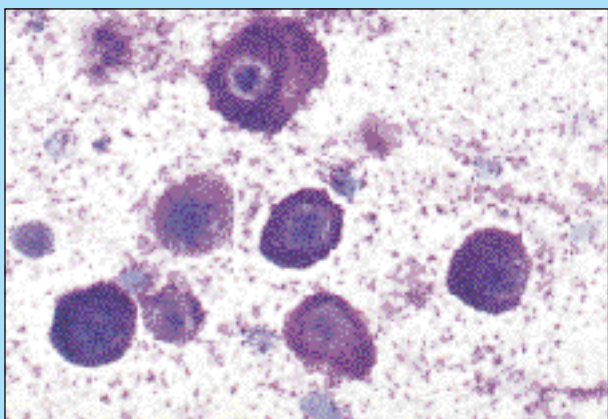


FIGURA 12 - Numerosi granuli di mast cell, sotto forma di strutture di piccole dimensioni, rotondeggianti e di colore porpora, si osservano liberi o contenuti nelle mast cell in uno striscio eseguito con un aspirato prelevato da un mastocitoma in un cane. Le numerose mast cell presenti nello striscio indicano che quella è l'origine dei granuli liberi. (250×) (Gentile concessione del Department of Veterinary Pathology, Oklahoma State University).

distante dal midollo osseo. Pertanto, rilevando queste alterazioni tossiche, la presenza di un'infezione deve essere sospettata anche quando non se ne rilevi la sede d'origine.

Le alterazioni degenerative solitamente riguardano i leucociti neutrofili che sono migrati verso la sede di infezione e che sono stati esposti a tossine batteriche elaborate. Tali cellule andranno incontro a degenerazione idropica con conseguente rigonfiamento cellulare e quindi appariranno di dimensioni maggiori rispetto a quelle normali contenute nello striscio e presenteranno nuclei gonfi con profilo meno segmentato e cromatina meno addensata (che si colora in rosa anziché in porpora) (Figg. 4 e 14). Il riscontro di leucociti neutrofili degenerati è un indice di probabile infezione batterica, anche quando non si rilevi alcun microorganismo.

L'infiammazione neutrofila tissutale associata a contaminazione del campione da parte di batteri saprofiti può produrre aspetti citologici simili a quelli di un'infezione batterica. Questo problema è particolarmente comune nei campioni prelevati mediante lavaggio tracheale. La contaminazione da parte di batteri saprofiti è confermata dall'identificazione di cellule epiteliali squamose (spesso rivestite di microrganismi) e dall'osservazione citologica o colturale di particolari specie saprofiti (*Simonsiella* species, Fig. 15) nel campione.

Il riscontro di batteri in assenza di una risposta infiammatoria deve essere interpretato con cautela. L'osservazione di microrganismi all'esame citologico non accompagnata da un incremento dei leucociti neutrofili può significare che il campione è stato contaminato da specie saprofiti. Queste ultime colonizzano numerose superfici corporee senza suscitare alcuna risposta infiammatoria (Fig. 1). Si può verificare una proliferazione di batteri saprofiti o contaminanti quando non si esegua lo striscio immediatamente dopo la raccolta del campione. I lavaggi di superfici mucose eseguiti al momento della necropsia sono particolarmente favorevoli alla proliferazione di batteri dopo la raccolta (Fig. 16).

Il riscontro citologico di infezione batterica non indica che quest'ultima sia l'agente eziologico primario. I tamponi

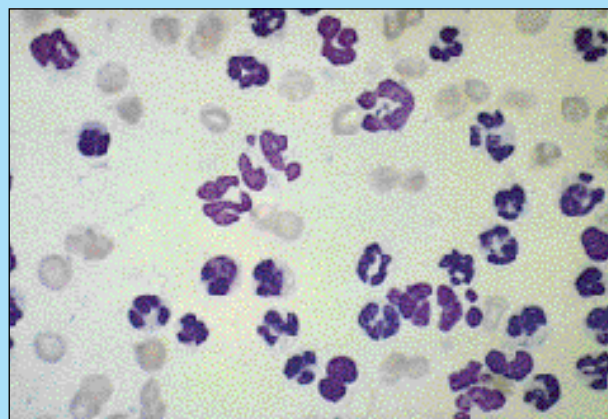


FIGURA 13 - L'elevato numero di neutrofili contenuti in questo striscio allestito con liquido pleurico prelevato in un cane è indice di processo infiammatorio. Alcuni neutrofili con nuclei gonfi, colorati in rosa chiaro e scarsamente segmentati sono forme degenerative. Si osservano anche brevi forme batteriche filamentose fagocitate e spirochete libere. (250×) (Gentile concessione dell'Oklahoma Veterinary Diagnostics, Stillwater, Oklahoma).

o i raschiati di lesioni cutanee ulcerative spesso contengono quantità elevate di leucociti neutrofili e di batteri fagocitati dovuti a infezioni batteriche conseguenti a dermatiti primarie. Analogamente, lesioni primarie di natura neoplastica o traumatica oppure di altra origine del tessuto sottocutaneo o degli organi interni possono presentare segni citologici riferibili a infezioni batteriche anche quando queste non rappresentino la causa primaria (Fig. 17). Poiché le infezioni batteriche spesso costituiscono una condizione secondaria, bisogna orientare gli sforzi diagnostici alla ricerca dell'eziologia primaria.

CORRELAZIONE FRA ESAME CITOLOGICO E COLTURA BATTERICA

L'individuazione di infezioni batteriche attraverso l'esame citologico non esclude l'utilità delle indagini colturali e dell'antibiogramma. La ricerca citologica dei microrganismi è importante trattandosi di un metodo veloce e sensibile che consente di valutare la situazione clinica e istituire una terapia antimicrobica provvisoria in attesa degli esiti delle colture e degli antibiogrammi. Tuttavia, questo tipo di esame non permette di identificare le specie coinvolte o di definire la sensibilità agli antimicrobici.

Benché molte specie batteriche non possano essere identificate citologicamente, quest'ultimo spesso viene utilizzato per stabilire se siano coinvolte una singola specie batterica (popolazione batterica monomorfa) (Figg. da 2 a 6) oppure molteplici specie (popolazione batterica multimorfa) (Figg. 13, 14 e 18). Questa informazione è utile per la scelta della terapia antibiotica provvisoria. Inoltre, i campioni in cui viene identificata una popolazione batterica multipla attraverso l'esame colturale ma che all'esame citologico presentano una popolazione monomorfológica oppure quelli che in coltura indicano l'esistenza di una singola specie batterica mentre all'esame citologico ne sono state individuate diverse, dovranno essere esaminati con attenzione per risolvere tale discrepanza.

Nella maggior parte dei casi, i risultati dell'esame citologico e di quello colturale si confermano a vicenda, mentre

talvolta ciò non accade. Il mancato riscontro di batteri in un campione citologico risultato positivo all'esame colturale è attribuibile a situazioni quali prelievo del campione in modo scorretto, presenza di un numero di batteri troppo esiguo per una valutazione accurata, presenza di batteri scarsamente colorabili o troppo piccoli per poter essere osservati adeguatamente al microscopio ottico oppure identificazione di specie saprofiti all'esame colturale. L'allestimento di una coltura batterica può essere difficile se il campione contiene quantità elevate di leucociti neutrofili (essudato purulento) oppure se è stato prelevato o trattato in modo scorretto. L'applicazione di procedure colturali inappropriate o la mancanza di condizioni anaerobiche può produrre risultati negativi da campioni di tessuti infetti.

Quando fra i risultati dell'esame citologico e quelli dell'esame colturale vi sia discrepanza, è bene ricercarne le origini piuttosto che decidere a priori che una delle due tecniche sia errata. Esistono molti laboratori privati e i laboratori diagnostici dell'Università a cui è possibile rivolgersi per consulti e per l'esecuzione di esami citologici e colturali.

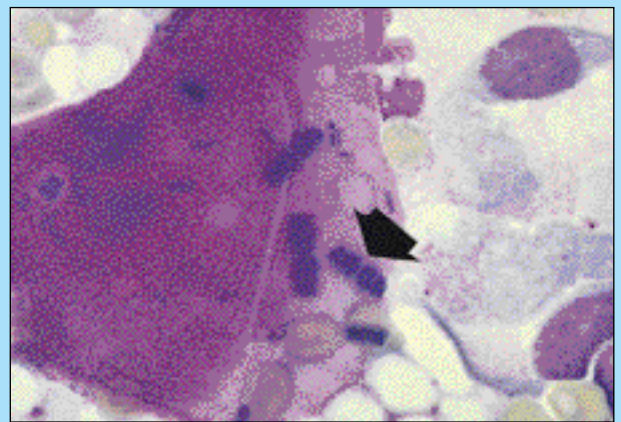


FIGURA 15 - I batteri appartenenti al genere *Simonsiella* sono microrganismi snelli le cui estremità si dividono dando origine a grosse strutture striate di forma bastoncellare (freccia) che nello striscio eseguito con il liquido di lavaggio tracheale di un cane aderiscono alla superficie di una cellula epiteliale. (400×) (Gentile concessione dell'Oklahoma Veterinary Diagnostics, Stillwater, Oklahoma).

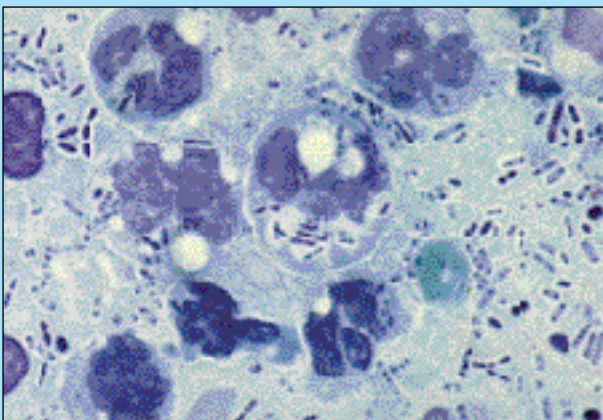


FIGURA 14 - Si evidenziano piccoli batteri bastoncellari contenuti nei vacuoli lisosomiali del citoplasma di un neutrofilo degenerato presente nello striscio eseguito con l'aspirato prelevato da una massa sottocutanea in un cane. (400×) (Gentile concessione dell'Oklahoma Veterinary Diagnostics, Stillwater, Oklahoma).

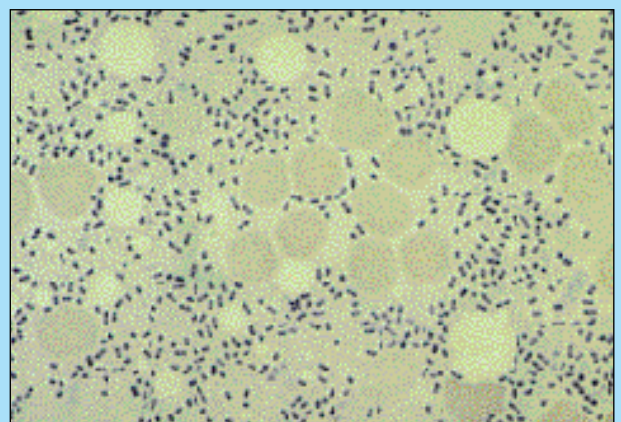


FIGURA 16 - Una popolazione batterica monomorfa dovuta a proliferazione microbica avvenuta durante il transito di un tampone vaginale spedito ad un centro diagnostico veterinario. (500×) (Gentile concessione dell'Oklahoma Veterinary Diagnostics, Stillwater, Oklahoma).

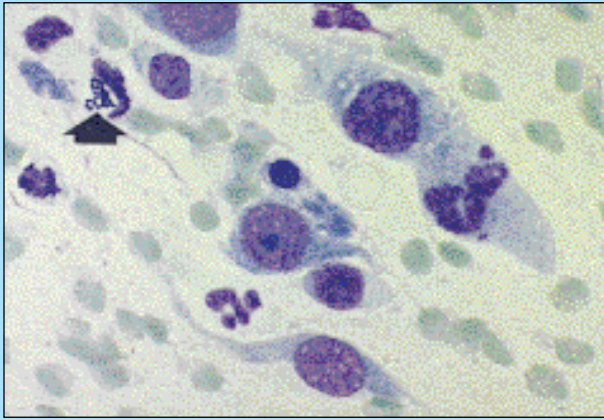


FIGURA 17 - Un leucocita neutrofilo contenente cocchi fagocitati (freccia) evidenziato nello striscio di un aspirato prelevato da un condrosarcoma di gatto. (250×) (Gentile concessione del Department of Veterinary Pathology, Oklahoma State University).

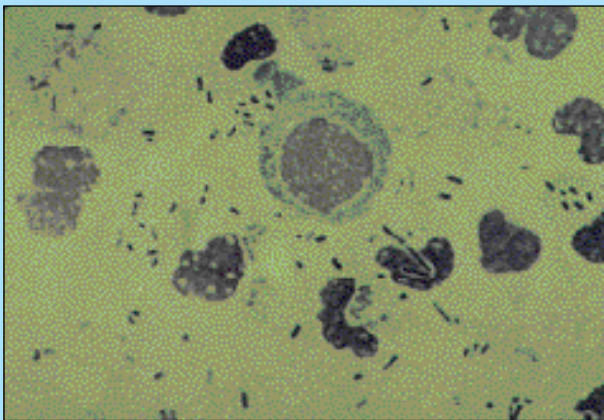


FIGURA 18 - Popolazione batterica multimorfica in uno striscio allestito dal sedimento urinario di un cane. Si evidenziano batteri bastoncellari di piccole dimensioni (probabilmente Gram-negativi) e di grosse dimensioni (probabilmente Gram-positivi) oltre che bastoncelli bipolari insieme a cellule dell'epitelio urinario e diversi leucociti neutrofili (400×) (Gentile concessione dell'Oklahoma Veterinary Diagnostics, Stillwater, Oklahoma).

Questi ultimi associati all'antibiogramma forniscono al professionista strumenti utili per la diagnosi delle infezioni batteriche.

Note sugli autori

I Dr. Clinkenbeard, Cowell, Walker, Gowan e Meinkoth sono affiliati al Department of Veterinary Pathology, College of Veterinary Medicine, Oklahoma State University, Stillwater, Oklahoma. I Dr. Cowell, Walker e Meinkoth sono Diplomates of the American College of Veterinary Pathologists. Il Dr. Morton, che è Diplomate of the American College of Veterinary Microbiology, è affiliato al Department of Veterinary Parasitology, College of Veterinary Medicine, Oklahoma State University, Stillwater, Oklahoma.

Bibliografia

1. Tyler RD, Cowell RL, Meinkoth JH: Cutaneous and subcutaneous lesions Masses, cysts, ulcers, and fistulous tracts, in Cowell RL, Tyler RD (eds): Diagnostic Cytology of the Dog and Cat. Goleta, CA, American Veterinary Publications, Inc, 1989, pp 21-46.
2. Perman V, Alsaker RD, Riis RC: Cytology of the Dog and Cat. South Bend, IN, American Hospital Association, 1979, pp 8-9, 30-35.
3. Ihrke PJ: Integumentary infections, in Greene CE (ed): Infectious Diseases of the Dog and Cat. Philadelphia, WB Saunders Co, 1990, pp 72-79.
4. Roudebush P: Bacterial infections of the respiratory system, in Greene CE (ed): Infectious Diseases of the Dog and Cat. Philadelphia, WB Saunders Co, 1990, pp 114-124.
5. Greene CE: Gastrointestinal and intra-abdominal infections, in Greene CE (ed): Infectious Diseases of the Dog and Cat. Philadelphia, WB Saunders Co, 1990, pp 125-145.
6. Tyler RD, Cowell RL, Baldwin CJ: Introduction, in Cowell RL, Tyler RD (eds): Diagnostic Cytology of the Dog and Cat. Goleta, CA, American Veterinary Publications, Inc, 1989, pp 1-19.
7. Skerman VBD: A Guide to the Identification of the Genera of Bacteria, ed 2. Baltimore, MD, Williams & Wilkins Co, 1967, p 18.
8. Sneath PH: Endospore-forming gram-positive rods and cocci, in Sneath PA (ed): Bergey's Manual of Systemic Bacteriology, vol 2. Baltimore, MD, Williams & Wilkins Co, 1986, pp 1104-1207.
9. Kreig NR: Facultatively anaerobic gram-negative rods, in Kreig NR (ed): Bergey's Manual of Systemic Bacteriology, vol 1. Baltimore, MD, Williams & Wilkins Co, 1986, p 408.
10. Cowell RL, Tyler RD, Meinkoth JH: Abdominal and thoracic fluid, in Cowell RL, Tyler RD (eds): Diagnostic Cytology of the Dog and Cat. Goleta, CA, American Veterinary Publications, Inc., 1989, pp 151-166.