



Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID-19. The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect, the company's public news and information website.

Elsevier hereby grants permission to make all its COVID-19-related research that is available on the COVID-19 resource centre - including this research content - immediately available in PubMed Central and other publicly funded repositories, such as the WHO COVID database with rights for unrestricted research re-use and analyses in any form or by any means with acknowledgement of the original source. These permissions are granted for free by Elsevier for as long as the COVID-19 resource centre remains active.



PIEL

FORMACION CONTINUADA EN DERMATOLOGIA

www.elsevier.es/piel



Historia de la dermatología

Aportaciones de la anatomía patológica en el diagnóstico de las infecciones cutáneas: una perspectiva histórica



Contribution of histopathology to the diagnosis of cutaneous infections: A historical perspective

Angel Fernandez-Flores

Servicio de Anatomía Patológica, Hospital El Bierzo, Ponferrada, España

El auge de las etiologías infecciosas en el siglo XIX

Todas las áreas de la medicina han experimentado un espectacular cambio en las últimas décadas, y la anatomía patológica no es ajena a ellas. En concreto, en el área a la que se refiere este artículo –las enfermedades infecciosas– se ha confirmado la naturaleza infecciosa de muchos cuadros que en siglos pasados eran de etiología desconocida, así como se ha consolidado el diagnóstico certero de los mismos.

Recapitulando sobre las contribuciones de la anatomía patológica en las infecciones desde sus orígenes, habría que retrotraerse al conocimiento sobre el carácter contagioso de las mismas, que era conocido ya desde los tiempos de la medicina clásica, y que, por ejemplo, fue reflejado en los textos bíblicos sobre la naturaleza de la lepra. Aunque las enfermedades fueron conocidas en sus aspectos epidemiológicos, clínicos, e incluso higiénicos, terapéuticos, y preventivos, los etiológicos se resistieron en gran medida hasta el siglo XIX.

La sífilis es un buen ejemplo de ello. Desde muy temprano en la historia de la medicina se reconocieron la enfermedad y sus manifestaciones, ejemplificadas de modo extremo en el caso de sífilis terciaria mostrado en el libro VIII de la copia *De Recóndita Abscessuum Natura* de Marco Aurelio Severino (1632) (fig. 1). En 1754, Jean Astruc realizó un magnífico estudio histórico sobre la sífilis en su trabajo sobre las enfermedades venéreas (*De Morbis Venereis*)¹, siguiendo la pista de la

enfermedad hasta el continente americano. Más importante todavía, realizó una excelente exposición sobre la contagiosidad de la enfermedad y atribuyó muchos de los síntomas sífilíticos a la presencia de un virus en el organismo.

La sífilis –junto con la tuberculosis– llegaron a ocupar gran parte de los tratados de Medicina Interna del Siglo XIX, llevando al gran Sir William Osler a escribir sus famosas palabras: «He who knows syphilis knows medicine» (el que sabe de sífilis sabe de medicina)². Sin embargo, no fue hasta 1905 cuando Fritz Chaudin y Erich Hoffmann descubrieron el *Treponema pallidum* en un frotis de un condiloma plano¹.

Esta fue una de las grandes aportaciones al diagnóstico y comprensión de las enfermedades infecciosas en el siglo XIX: los microorganismos podían verse.

Louis Paster había demostrado en 1857 que la fermentación dependía de microorganismos³ y en 1876 Robert Koch logró transmitir el carbunco a ratones⁴. En las tres últimas décadas del siglo XIX se descubrieron, entre otros, los agentes causantes de la lepra, la malaria tifoidea, el tétanos, la tuberculosis, la erisipela, la difteria, la fiebre de Malta, la gangrena gaseosa, la peste, el botulismo o la disentería⁵. También se identificaron los estafilococos y los estreptococos, la *Escherichia coli*, el *Pneumococcus* o el *Haemophilus influenzae*⁵. La actinomicosis, considerada durante mucho tiempo un tumor maligno, fue correctamente identificada como enfermedad infecciosa por Emil Ponfick (un discípulo de Recklinghausen y Virchow)⁶. También las fases del ciclo del paludismo se habían identificado

Correo electrónico: dermatopathonline@gmail.com

<http://dx.doi.org/10.1016/j.piel.2015.08.007>

0213-9251/© 2015 Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

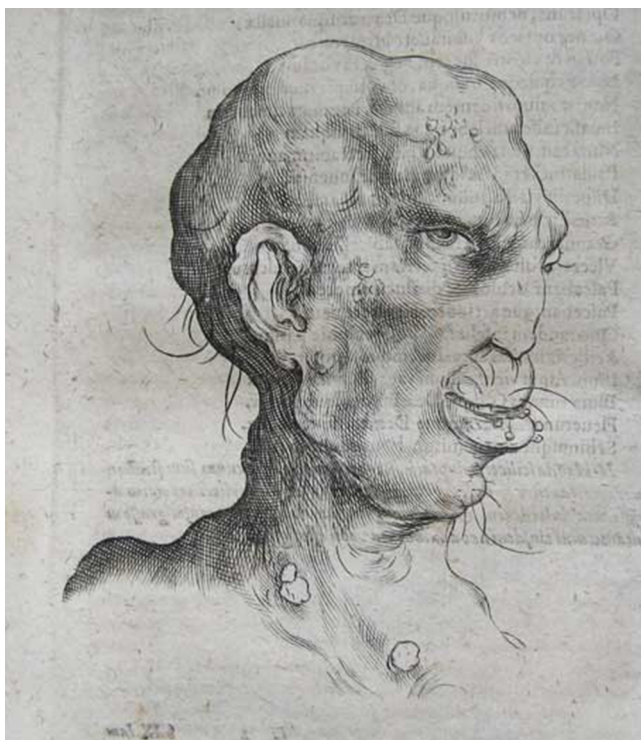


Figura 1 – Ejemplo extremo de sífilis terciaria, tal y como aparece en el libro VIII de la copia *De Recóndita Abscessuum Natura* de Marco Aurelio Severino (1632).

y reconocido al microscopio desde que en 1880, Alphonse Laveran descubriese el *Plasmodium falciparum* en la sangre de un soldado, en forma de «filamentos transparentes que se movían muy activamente y que más allá de toda cuestión, estaban vivos»⁷. Fueron los italianos Amico Bignami, Giovanni Battista Grassi y Giuseppe Bastianelli quienes confirmaron que el ciclo del parásito era el mismo en los humanos que en las aves, continuando así los trabajos iniciados por Ronald Ross y Patrick Masson⁵.

La pasión por esta área en expansión de la medicina llevó a algunos investigadores a posturas inaceptables a todas luces: la experimentación con su propio cuerpo. Arthur Loss ingirió larvas de *Strongyloides stercoralis*, y Daniel Carrión (fig. 2) se inyectó material procedente de una verruga peruana para demostrar que el organismo causante también producía la fiebre de Oroya, consiguiendo su objetivo, pero falleciendo víctima de la enfermedad^{8,9}.

Sin embargo, aunque en las enfermedades transmitidas por bacterias y parásitos, se describían el vector y el cuadro clínico, los virus –que por supuesto no se sabía todavía lo que eran– no podían ser observados directamente en el siglo XIX. Para ver los virus, quedaban por venir al menos dos desarrollos clave en esta historia: la histoquímica y la microscopía.

La histoquímica y los nuevos microscopios

En efecto, el siglo XIX trajo el progreso notable de la histoquímica, cuyo despegue muchos achacan a la



Figura 2 – Daniel Alcides Carrión, peruano, que siendo estudiante de medicina, se inyectó material procedente de una verruga peruana para demostrar que el organismo causante también producía la fiebre de Oroya. Aunque Carrión consiguió su objetivo, falleció víctima de la enfermedad.

introducción en la década de 1860 y 1870 de los colorantes de anilina¹⁰. Tan es así que algunos fijan en esta «histoquímica diagnóstica aplicada» el origen de la histopatología¹⁰.

Parte de estas nuevas técnicas histoquímicas fueron utilizadas en la identificación de distintos microorganismos directamente en los tejidos. En 1882, por ejemplo, Franz Ziehl y Friedrich Neelsen describieron la tinción de ácido rápido, que permitió la visualización de las micobacterias en los cortes tisulares¹¹. En 1884, fue introducida la tinción de Gram por el patólogo holandés Christian Gram, y en 1890 Loeffler identificó flagelos bacterianos por impregnación argéntica. Las técnicas de Romanovsky fueron introducidas en 1891 con un uso principal en la identificación de parásitos en hematología. El avance en este caso se centró en que los microorganismos podían verse en su contexto tisular.

De este modo, la histopatología ligó los gérmenes causantes a las alteraciones morfológicas que los acompañaban: el granuloma, la necrosis, la respuesta inflamatoria... Se lograron así avances en la interpretación patogénica del daño causado al ser humano por los microorganismos.

En 1872, Hjalmar Heiberg, profesor de patología en Christiania, describió lo que le parecían micelios de *Leptotrix* en las vegetaciones de un caso de endocarditis en una mujer después del parto⁶. Friedrich Albert von Zenker, profesor de Dresden y Erlangen, presentó su –luego famosa– monografía sobre la degeneración cerúlea en músculos de pacientes con fiebre tifoidea⁶.

Además, aunque los virus en sí seguían sin verse, las enfermedades virales iban asociadas a signos histológicos reconocibles que permitían su diagnóstico indirecto. El *Die Pocken-Effloreszenzen* de Weigert en 1874, por ejemplo, incluyó magníficos dibujos histológicos de pústulas de viruela⁶, y a finales del siglo XIX, Paul Unna realizó sus descripciones sobre el diagnóstico diferencial entre el herpes genital y la sífilis. En 1893 Guarneri describió los cuerpos de inclusión de la viruela y de la viruela de vaca¹² y en 1904, Mallory describió los de la fiebre escarlata en autopsias¹³, mientras que tan solo un año más tarde, Field W. Cyrus los aisló directamente de ampollas, ilustrando su artículo con bellos dibujos a color¹⁴. Es decir: se describieron claves morfológicas para el reconocimiento de las enfermedades infecciosas, incluso si no se observaba el microorganismo en sí.

Con la entrada del siglo XX, el interés de la histoquímica se centró en nuevas técnicas para mejorar la identificación de microorganismos o el reconocimiento de aquellos que aún no se podían teñir: se introdujeron las técnicas para espiroquetas (Whartin y Chronister 1920), bacterias Gram-positivas (Brown y Brenn 1931) o algunas variantes del Romanowsky para la identificación de parásitos (Giemsa 1902, Wright 1902, May-Grunwald 1902)¹⁵.

Tras alcanzar un cénit en torno a la tercera década del siglo XX, pocas técnicas histoquímicas fueron ya introducidas a partir de 1940, con alguna excepción aislada en lo que se refiere a las enfermedades infecciosas, tal como el Grocott en 1955 para la identificación de hongos¹⁵.

En ese momento, existía un sentir generalizado de que el avance en el conocimiento patológico solo se conseguiría con el logro de mayores aumentos microscópicos. Sin embargo, el límite de resolución estaba marcado por la longitud de onda de la luz.

Dos intentos de introducción de nuevos microscopios de fuentes distintas a la luz habían en parte fracasado: con el microscopio de luz ultravioleta, la imagen solo podía observarse en fotografía. Con el microscopio de rayos X, los tiempos de exposición eran tediosos e impracticablemente prolongados. A pesar de ello, se produjeron algunos logros importantes aislados, como por ejemplo, la primera visualización de un virus con el microscopio de luz ultravioleta a manos del inglés Barnard en 1925.

En 1934, Ernst Ruska presentó el primer microscopio electrónico, en donde un haz de electrones sustituía al haz de luz del microscopio óptico, y había lentes magnéticas en vez de lentes de cristal. Se desarrollaron fundamentalmente dos sistemas de microscopía electrónica: el de transmisión de electrones y el de barrido¹⁶⁻¹⁸. En este último, los electrones detectados provenían de la superficie de la muestra, y se obtenían así, imágenes en relieve. Un modelo funcional de este último fue presentado en 1953 y en 1965 se lanzó al mercado el primer modelo¹⁹.

Gracias a ello, en 1950 se realizaron las primeras observaciones de un virus al microscopio electrónico mediante sombreado de los viriones, pero fue en 1960 cuando se difundió el uso del microscopio electrónico en virología²⁰ para enfermedades que hasta ese momento se diagnosticaban con cultivo, a veces no concluyente. Se describió, por ejemplo, la morfología característica del virus de la viruela (fig. 3), así como la naturaleza viral de la hepatitis B²¹, los rotavirus^{22,23}, los astrovirus, los coronavirus, los calicivirus...²⁴, pero también fue descrita la ultraestructura de microorganismos no virales, como *Cryptosporidium*, *Ciclospora*²⁵ o *Angiostrongylus*²⁶.

Las técnicas modernas

Durante la década de 1970, se introdujo en histopatología uno de los avances que más hizo progresar la especialidad y por extensión, el conocimiento en todas las áreas de la dermatopatología: la inmunohistoquímica. Con el uso de anticuerpos marcados enzimáticamente, el reconocimiento de antígenos localizados en el tejido permitió la identificación y clasificación de gran cantidad de tumores y entidades²⁷⁻²⁹. La inmunohistoquímica supuso tal contribución al desarrollo de la histopatología, que el propio Juan Rosai dijo de ella que «no hay probablemente otra técnica que ha revolucionado tanto el campo durante los pasados cincuenta años, como la técnica de la inmunohistoquímica».³⁰

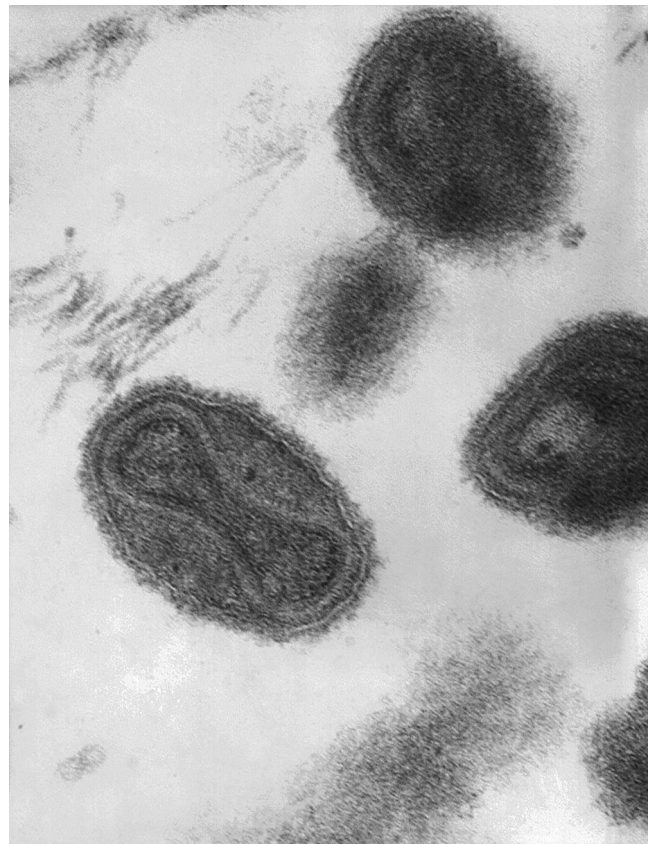


Figura 3 – Gracias al microscopio electrónico, en los años 1960 se describió la morfología característica del virus de la viruela.

Sin embargo, el uso de la inmunohistoquímica en patología infecciosa fue muy limitado en un principio. Los microorganismos se seguían identificando mediante cultivo o mediante técnicas tradicionales histoquímicas, tales como las tinciones de Ziehl-Neelsen, Grocott, PAS...

Por el contrario, el nuevo avance en el diagnóstico de enfermedades infecciosas llegó de la mano de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permitía diagnósticos certeros del germen causante, incluso con estudios sobre susceptibilidades a antibióticos.

Así, en la década de 1990, la PCR abrió, por ejemplo, una puerta al diagnóstico de la neurosífilis. Hasta ese momento, la demostración de la presencia de *Treponema pallidum* (*T. pallidum*) en el líquido cefalorraquídeo era imposible, dada la imposibilidad de cultivo. Además los métodos serológicos no eran suficientes para establecer un diagnóstico definitivo³¹. La PCR permitió detectar ADN de *T. pallidum* en el líquido cefalorraquídeo de pacientes en todos los estadios de sífilis, demostrando así que los microorganismos invadían el sistema nervioso central desde los estadios tempranos de la enfermedad³¹.

La PCR no fue de uso exclusivo de la histopatología. Los microorganismos se detectaban en todo tipo de muestras: líquidos, secreciones, exudados, raspados... Sin embargo, diagnosticar los patógenos fuera de su contexto tisular nos desproveya de la información sobre la respuesta inflamatoria de los órganos ante la infección o sobre otros cambios celulares inducidos.

Lo anterior, que pudiera parecer trivial, era fundamental en ciertos casos: no era lo mismo diagnosticar la presencia del virus de Epstein-Barr en un linfoma, que demostrar que se trata de un linfoma relacionado con el virus de Epstein-Barr. Para afirmar lo segundo, las células tumorales tenían que expresar marcadores del virus. No bastaba con la presencia de este último en los linfocitos del componente inflamatorio acompañante, cosa que sucedía en un altísimo porcentaje de individuos sanos. En definitiva: se comprobó que la presencia del germen no necesariamente significaba que este fuese el causante de la patología.

Precisamente por esto, la tendencia natural de la histopatología fue la que siempre había sido: priorizar las técnicas que permitían la visualización directa de los microorganismos en los tejidos. Por ello, lenta y paulatinamente se fue imponiendo la inmunohistoquímica, con anticuerpos sensibles y específicos para bacterias y virus: *Treponema*, *Borrelia*, micobacterias, *Bartonella*, *Listeria*...

Un magnífico ejemplo lo representaron los anticuerpos contra el herpesvirus humano 8 (HHV8) y contra el virus del carcinoma de células de Merkel.

Con respecto al HHV8, el virus fue identificado en 1994 en el sarcoma de Kaposi de un paciente con síndrome de inmunodeficiencia adquirida³² y pronto se comprobó que el virus era aislado en todos los casos de sarcoma de Kaposi^{33,34}. Tanto el aislamiento del virus como la detección del mismo se hacían en un principio por PCR. Sin embargo, fruto de ello, se obtuvieron algunos resultados controvertidos que informaban de la presencia de HHV8 en el granuloma piógeno³⁵, en hemangiomas^{36,37}, en el hemangioendotelioma retiforme³⁸, o en el angiosarcoma³⁹.

Este desconcierto fue en parte resuelto con la aparición del anticuerpo anti-LNA-1, una proteína presente en todas las células infectadas por HHV-8⁴⁰. La positividad, pudo no solo ser evaluada en el contexto morfológico, comprobando la expresión en el núcleo de las células tumorales (fig. 4), sino que también se comprobó la presencia de la proteína en todos los casos de sarcoma de Kaposi. No se presentó en la literatura ningún caso positivo convincente que no fuese un sarcoma de Kaposi. Además, el anticuerpo hizo desaparecer todas las dudas morfológicas diagnósticas, simplificando muchísimo el diagnóstico diferencial dermatopatológico de los casos de sarcoma de Kaposi⁴¹.

Algo parecido sucedió con el poliomavirus de células de Merkel, descubierto en 2008 en casos del carcinoma homónimo⁴². La detección del virus se hizo en un principio mediante PCR, centrándose en el gen «large T-antigen»⁴³⁻⁴⁶. Sin embargo, la técnica pronto arrojó datos controvertidos: de un lado, la frecuencia del virus variaba entre 24 y 100% según las series^{42,47-50}. De otro, el virus también fue detectado en tejido no tumoral de pacientes tanto con carcinoma de células de Merkel como sin él⁵¹.

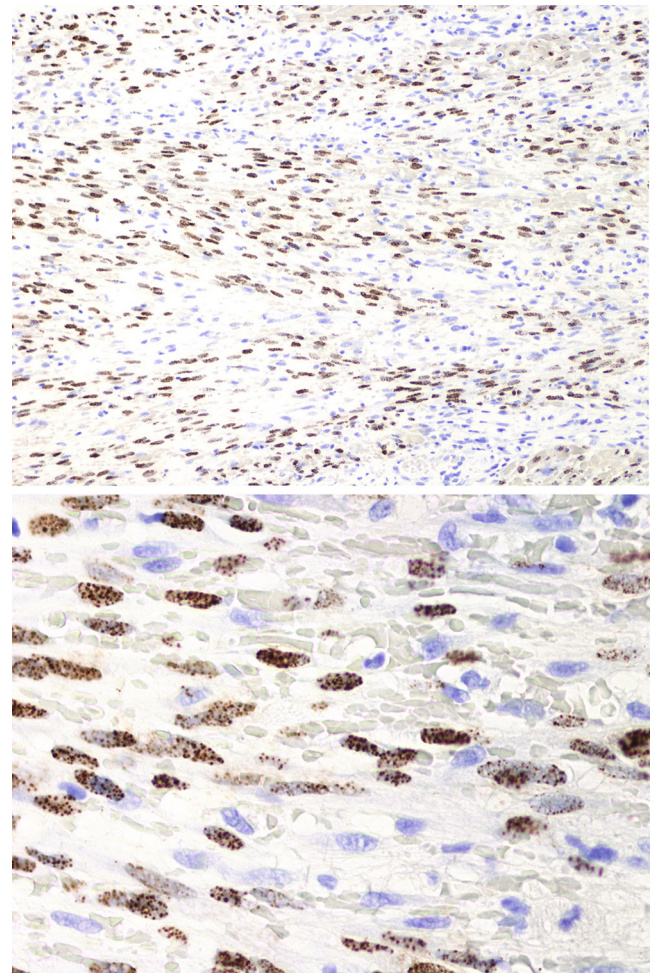


Figura 4 – Positividad para anticuerpo frente a Herpesvirus humano tipo 8 en un estudio inmunohistoquímico de un sarcoma de Kaposi. La positividad es característicamente nuclear y granulada.

En 2009 se presentó un anticuerpo contra el large T-antigen, conocido como CM2B4⁴³ (fig. 5). De nuevo, la ventaja del anticuerpo era evaluar posibles diferencias morfológicas entre los casos negativos y los positivos. Combinando varias técnicas de detección viral, se concluyó que no todos los carcinomas de células de Merkel estaban relacionados con la infección viral. El poliomavirus estaba integrado en aproximadamente un 80% de los casos⁴² y pudo determinarse que la patogenia de ambos grupos (con y sin virus) era distinta^{49,52-54}. Los carcinomas de Merkel que no estaban relacionados con el polio, parecían seguir un mecanismo patogénico ligado a la radiación ultravioleta y eran más frecuentes en el hemisferio sur y Australia. Además, los datos parecían indicar que las formas tumorales positivas para el virus tenían mejor pronóstico que las negativas^{44,55-58}, aunque dicha interpretación no carecía de su controversia⁵⁹.

No solo el carcinoma de células de Merkel se benefició de la comprensión de mecanismos patogénicos aportada por la inmunohistoquímica. También por ejemplo, se demostró la teoría de que los síntomas sistémicos en la infección por *Clostridium* eran fundamentalmente producidos por toxinas, al detectar el microorganismo localizado en la puerta de

entrada⁶⁰. O en el caso del *T. pallidum*, se comprobó una distinta distribución de las espiroquetas en los tejidos en casos de sífilis primaria y secundaria, con predominio de un patrón perivascular en la primaria y epidérmico en la secundaria⁶¹. En definitiva: la visualización de los microorganismos en el tejido proporcionó información patogénica de relevancia.

La inmunohistoquímica supuso además una considerable mejora en la sensibilidad diagnóstica: Goel y Budhwar encontraron que mientras la histoquímica convencional (Ziehl-Neelsen) demostraba microorganismos en los granulomas de 36,1% de los casos de infección por *M. tuberculosis*, la inmunohistoquímica era positiva en el 100%⁶².

También logró la inmunohistoquímica superar la sensibilidad de la PCR en situaciones concretas. Tal era el caso de la infección por *Bacillus anthracis*: cuando los pacientes habían recibido antibióticos, las técnicas de detección del germen (cultivo, Gram, PCR...) eran a menudo insuficientes. Sin embargo, el desarrollo de anticuerpos para uso inmunohistoquímico consiguió salvar tales obstáculos en un porcentaje significativo de casos, siendo la inmunohistoquímica el método diagnóstico de preferencia, por encima incluso de la serología, el cultivo, la PCR o las tinciones histoquímicas^{60,63}.

Algo parecido sucedía en las infecciones por micobacterias, en donde la cantidad de bacilos era no infrecuentemente muy pequeña (de difícil detección por PCR) o estaba oscurecida por una prominente reacción inflamatoria. Ambos obstáculos eran salvados con la inmunohistoquímica: la técnica, con muy poco o nada de fondo, permitía la visualización fácil de los bacilos, incluso en muy pequeña cantidad⁶⁰.

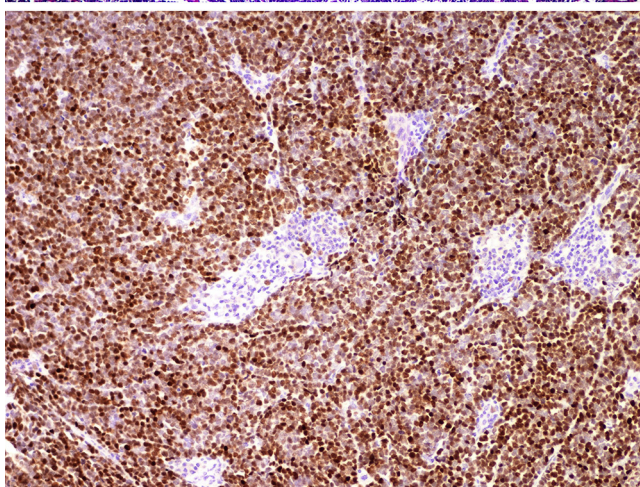
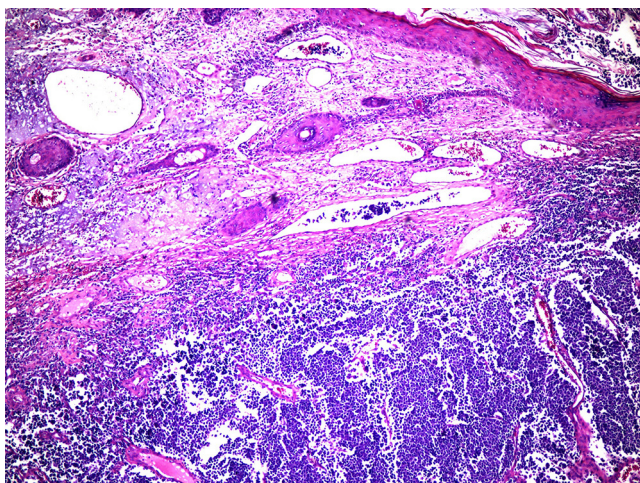


Figura 5 – Ejemplo de un carcinoma de célula de Merkel relacionado con el virus de célula de Merkel. Dicha relación se demuestra mediante la positividad con el anticuerpo CM2B4.

El futuro

Dentro de lo difícil y arriesgado que resulta establecer predicciones de futuro, se puede quizá anticipar dos tendencias con riesgo pequeño de equivocarse.

Una, que se impondrán las técnicas de secuenciación genética masiva de genoma completo, del tipo de la *Next Generation*. Para hacerse una idea conceptual previa de lo que suponen estas nuevas técnicas, baste compararlas con sus predecesoras de secuenciación (como la PCR) en un aspecto: la PCR secuencía segmentos previamente conocidos del material genético. Ello requiere que se haya establecido una hipótesis etiológica previa sobre una enfermedad⁶⁴. Además, las técnicas de PCR no siempre son eficaces en la distinción de genotipos virales, por ejemplo. Aunque para paliar este y otros problemas, se han ideado, entre otras soluciones, los test de PCR multiplexed para detección simultánea de múltiples loci, su actualización con nuevos *primers* y validación del nuevo producto, es siempre laboriosa.

Por el contrario, el avance mayor introducido por las técnicas de secuenciación de genoma completo es que extienden el proceso a millones de reacciones que tienen lugar de modo paralelo, en vez de limitarla a unos pocos fragmentos de ADN. El resultado es la secuenciación rápida de grandes cantidades de material, incluidos genomas enteros. Y todo ello, sin necesidad de generar *primers* previos. Por si fuera poco, desde su introducción en 2007, la *Next Generation* se ha mejorado a un ritmo que supera la ley de Moore, más que

duplicando cada año la capacidad cuantitativa de información obtenida por prueba. Esto se ha unido a un abaratamiento progresivo de los costes. Para que el lector se haga una idea, en el momento de escribir este editorial, la técnica permite la secuenciación de más de cinco genomas humanos en poco más de una semana, por un coste de unos 4.000 €.

Además, la técnica permite la flexibilidad de la obtención de datos, seleccionando la cantidad de los mismos, o centrándose en un área genómica específica, o por el contrario, obteniendo una especie de visión más amplia de los datos (con menos detalles). Adicionalmente, el hecho de que se puedan secuenciar grandes cantidades de ADN, permite obtener información sobre la implicación de las regiones no codificadas en los procesos patológicos.

El paso conceptual dado con la *Next Generation* es que ya no se necesita conocer previamente el agente causante de una enfermedad. Por lo tanto, se pueden descubrir nuevos microorganismos o nuevas especies, y no hace falta variar ningún tipo de *primer* para adaptarlo a posibles mutaciones de los microorganismos conocidos.

Este tipo de técnicas ha permitido, por ejemplo, el estudio rápido de la diversidad de los virus aviares⁶⁵, algo crucial en un mundo en el que la globalización determina la difusión rápida de enfermedades de causa viral en las que el diagnóstico de especificidad viral es necesario para un tratamiento eficaz.

Adolece, eso sí, de lo mismo que han flaqueado siempre las técnicas de detección genética: genes no son proteínas, y la presencia de material genético no se correlaciona con las proteínas efectoras patógenas. Pensemos, por ejemplo en un microorganismo inviable o de capacidad tóxica reducida o ausente por mecanismos epigenéticos, enzimáticos, ambientales u otros. Su genoma será detectable y detectado, pero no nos informará de su capacidad lesiva. Por ello, se puede casi complementar esta predicción con el augurio de que se introducirán técnicas de proteómica aplicadas a la información genética obtenida con la *Next Generation*.

Esta es en definitiva la segunda predicción: que la patología volverá a traer el diagnóstico de los microorganismos al contexto tisular. Es decir, se introducirán técnicas de la misma sensibilidad y ventajas de la *Next Generation*, pero en las que la información será obtenida sobre el tejido, y gracias a las que sabremos dónde se ubica el microorganismo que estamos detectando. Todo ello, con la superación conceptual de las técnicas de secuenciación masiva: que no se irá buscando un germen conocido *a priori*, sino probablemente una etiología desconocida.

En conclusión, volviendo al título de este editorial, la anatomía patológica lleva haciendo contribuciones a las enfermedades infecciosas de modo infatigable desde sus inicios. Para ello, cuenta con una ventaja que no tienen otras especialidades: contextualiza la infección en el tejido y en la respuesta inflamatoria del huésped. Ello posibilita el mejor conocimiento de los mecanismos patogénicos de la enfermedad, así como el diseño de estrategias de defensa más eficaces contra un patógeno concreto.

Conflicto de intereses

El autor declara no tener ningún conflicto de intereses.

BIBLIOGRAFÍA

1. Leitner RMC, Körte C, Edo D, Braga ME. Historia del tratamiento de la sífilis. *Rev Argent Dermatol.* 2007;88:6-19.
2. Rayment M, Sullivan A. "He who knows syphilis knows medicine" -The return of an old friend. *Br J Cardiol.* 2011;18:56-8.
3. Pasteur L. *Scientific papers.* En: Eliot CW, editor. Harvard Classics New York: PF Cloulier and Sons; 1910.
4. Rosen G. *History of Public Health.* Baltimore: Johns Hopkins University Press; 1993.
5. Long ER. The rise of Bacteriology and Immunology. En: Long ER, editor. *A history of Pathology.* London: Constable and Company Limited; 1965. p. 142-55.
6. Long ER. *Pathological Histology and the Last Third of the Nineteenth Century.* En: Long ER, editor. *A History of Pathology.* London: Constable and Company Limited; 1965. p. 127-41.
7. Harrison G. *Mosquito malaria and man: A history of the hostilities since 1880.* New York, NY: EP Dutton; 1978.
8. Altman LK. *Who goes first? The story of self-experimentation in Medicine..* New York, NY: Random House; 1986.
9. Chatterjee P, Chandra S, Biswas T. Daniel Alcides Carrion (1857-1885) and a history of medical martyrdom. *J Med Biogr* 2015. (En prensa).
10. Wick MR. Histochemistry as a tool in morphological analysis: a historical review. *Ann Diagn Pathol.* 2012;16:71-8.
11. Bishop PJ, Neumann G. The history of the Ziehl-Neelsen stain. *Tubercle.* 1970;51:196-206.
12. Cowdry EV. The supravital staining of vaccine bodies. *J Exp Med.* 1922;36:667-84.
13. Mallory FB. On the presence of certain bodies in the skin and blister fluid from scarlet-fever. *J Med Research.* 1904;10:483-90.
14. Field CW. On the presence of certain bodies in the skin and blister fluid from scarlet-fever and measles. *J Exp Med.* 1905;7:343-50.
15. Riva MA, Manzoni M, Isimbaldi G, Cesana G, Pagni F. Histochemistry: historical development and current use in pathology. *Biotech Histochem.* 2014;89:81-90.
16. Ruska E. The early development of electron lenses and electron microscopy. *Microsc Acta Suppl.* 1980;Suppl5:1-140.
17. Freundlich MM. Origin of the electron microscope. *Science.* 1963;142:185-8.
18. Afzelius BA. Half a century of electron microscopy: the early years. *Ultrastruct Pathol.* 1981;2:309-11.
19. Woolfson MM, Zimon JM. *The scanning electron microscope.* Cambridge: Cambridge University Press; 1972.
20. Bayer ME, Blumberg BS, Werner B. Particles associated with Australia antigen in the sera of patients with leukaemia. Down's syndrome and hepatitis. *Nature.* 1968;218:1057-9.
21. Gordon CW, Donnelly JD, Fothergill R, Ker FL, Millar EL, Flewett TH, et al. Variola minor. A preliminary report from he Birmingham Hospital region. *Lancet.* 1966;1: 1311-3.
22. Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet.* 1973;2:1281-3.
23. Flewett TH, Bryden AS, Davies H. Letter: virus particles in gastroenteritis. *Lancet.* 1973;2:1497.
24. Horwitz MS. Adenovirus. En: Fieds BN, Knipe DM, Howley PM, editores. *Virology Philadelphia: Lippincott-Raven;* 1996. p. 2149-71.
25. Keeling PJ, McFadden GI. Origins of microsporidia. *Trends Microbiol.* 1998;6:19-23.

26. Hernández-Chavarría F. Una visión de la biología tropical a través del microscopio electrónico. *Rev Biol Trop.* 2002;50:927-40.
27. Nakane PK, Pierce Jr GB. Enzyme-labeled antibodies: preparation and application for the localization of antigens. *J Histochem Cytochem.* 1966;14:929-31.
28. Nakane PK, Pierce Jr GB. Enzyme-labeled antibodies for the light and electron microscopic localization of tissue antigens. *J Cell Biol.* 1967;33:307-18.
29. Mason DY, Sammons R. Alkaline phosphatase and peroxidase for double immunoenzymatic labelling of cellular constituents. *J Clin Pathol.* 1978;31:454-60.
30. Rosai J. Special techniques in surgical pathology. En: Rosai J, editor. *Ackerman's surgical pathology.* Washington: Mosby; 1989. p. 31-51.
31. Chung KY, Lee MG, Lee JB. Detection of *Treponema pallidum* by polymerase chain reaction in the cerebrospinal fluid of syphilis patients. *Yonsei Med J.* 1994;35:190-7.
32. Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J, Knowles DM, et al. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science.* 1994;266:1865-9.
33. Schalling M, Ekman M, Kaaya EE, Linde A, Biberfeld P. A role for a new herpes virus (KSHV) in different forms of Kaposi's sarcoma. *Nat Med.* 1995;1:707-8.
34. Russo JJ, Bohenzky RA, Chien MC, Chen J, Yan M, Maddalena D, et al. Nucleotide sequence of the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (HHV8). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:14862-7.
35. Hisaoka M, Hashimoto H, Iwamasa T. Diagnostic implication of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus with special reference to the distinction between spindle cell hemangioendothelioma and Kaposi's sarcoma. *Arch Pathol Lab Med.* 1998;122:72-6.
36. McDonagh DP, Liu J, Gaffey MJ, Layfield LJ, Azumi N, Traweek ST. Detection of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequence in angiosarcoma. *Am J Pathol.* 1996;149:1363-8.
37. Herman PS, Shogreen MR, White WL. The evaluation of human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) in cutaneous lesions of Kaposi's sarcoma: a study of formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Am J Dermatopathol.* 1998;20:7-11.
38. Schommer M, Herbst RA, Brodersen JP, Kiehl P, Katenkamp D, Kapp A, et al. Retiform hemangioendothelioma: another tumor associated with human herpesvirus type 8? *J Am Acad Dermatol.* 2000;42:290-2.
39. Gessi M, Cattani P, Maggiano N, Scambia G, Lauriola L, Ranelletti FO, et al. Demonstration of human herpesvirus 8 in a case of primary vaginal epithelioid angiosarcoma by in situ hybridization, electron microscopy, and polymerase chain reaction. *Diagn Mol Pathol.* 2002;11:146-51.
40. Radkov SA, Kellam P, Boshoff C. The latent nuclear antigen of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus targets the retinoblastoma-E2F pathway and with the oncogene Hras transforms primary rat cells. *Nat Med.* 2000;6:1121-7.
41. Cheuk W, Wong KO, Wong CS, Dinkel JE, Ben-Dor D, Chan JK. Immunostaining for human herpesvirus 8 latent nuclear antigen-1 helps distinguish Kaposi sarcoma from its mimickers. *Am J Clin Pathol.* 2004;121:335-42.
42. Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science.* 2008;319:1096-100.
43. Shuda M, Arora R, Kwun HJ, Feng H, Sarid R, Fernandez-Figueras MT, et al. Human Merkel cell polyomavirus infection I. MCV T antigen expression in Merkel cell carcinoma, lymphoid tissues and lymphoid tumors. *Int J Cancer.* 2009;125:1243-9.
44. Sihto H, Kukko H, Koljonen V, Sankila R, Bohling T, Joensuu H. Clinical factors associated with Merkel cell polyomavirus infection in Merkel cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101:938-45.
45. Loyo M, Schussel J, Colantuoni E, Califano J, Brait M, Kang S, et al. Detection of Merkel cell virus and correlation with histologic presence of Merkel cell carcinoma in sentinel lymph nodes. *Br J Cancer.* 2012;106:1314-9.
46. Martel-Jantin C, Filippone C, Cassar O, Peter M, Tomasic G, Vielh P, et al. Genetic variability and integration of Merkel cell polyomavirus in Merkel cell carcinoma. *Virology.* 2012;426:134-42.
47. Garneski KM, Warcola AH, Feng Q, Kiviat NB, Leonard JH, Nghiem P. Merkel cell polyomavirus is more frequently present in North American than Australian Merkel cell carcinoma tumors. *J Invest Dermatol.* 2009;129:246-8.
48. Becker JC, Houben R, Ugurel S, Trefzer U, Pfohler C, Schrama D. MC polyomavirus is frequently present in Merkel cell carcinoma of European patients. *J Invest Dermatol.* 2009;129:248-50.
49. Busam KJ, Jungbluth AA, Rekhman N, Coit D, Pulitzer M, Bini J, et al. Merkel cell polyomavirus expression in merkel cell carcinomas and its absence in combined tumors and pulmonary neuroendocrine carcinomas. *Am J Surg Pathol.* 2009;33:1378-85.
50. Sastre-Garau X, Peter M, Avril MF, Laude H, Couturier J, Rozenberg F, et al. Merkel cell carcinoma of the skin: pathological and molecular evidence for a causative role of MCV in oncogenesis. *J Pathol.* 2009;218:48-56.
51. Leroux-Kozal V, Leveque N, Brodard V, Lesage C, Dudev O, Makeieff M, et al. Merkel cell carcinoma: histopathologic and prognostic features according to the immunohistochemical expression of Merkel cell polyomavirus large T antigen correlated with viral load. *Hum Pathol.* 2015;46:443-53.
52. Kuwamoto S. Recent advances in the biology of Merkel cell carcinoma. *Hum Pathol.* 2011;42:1063-77.
53. Paik JY, Hall G, Clarkson A, Lee L, Toon C, Colebatch A, et al. Immunohistochemistry for Merkel cell polyomavirus is highly specific but not sensitive for the diagnosis of Merkel cell carcinoma in the Australian population. *Hum Pathol.* 2011;42:1385-90.
54. Martin B, Poblet E, Rios JJ, Kazakov D, Kutzner H, Brenn T, et al. Merkel cell carcinoma with divergent differentiation: histopathological and immunohistochemical study of 15 cases with PCR analysis for Merkel cell polyomavirus. *Histopathology.* 2013;62:711-22.
55. Bhatia K, Goedert JJ, Modali R, Preiss L, Ayers LW. Merkel cell carcinoma subgroups by Merkel cell polyomavirus DNA relative abundance and oncogene expression. *Int J Cancer.* 2010;126:2240-6.
56. Bhatia K, Goedert JJ, Modali R, Preiss L, Ayers LW. Immunological detection of viral large T antigen identifies a subset of Merkel cell carcinoma tumors with higher viral abundance and better clinical outcome. *Int J Cancer.* 2010;127:1493-6.
57. Sihto H, Kukko H, Koljonen V, Sankila R, Bohling T, Joensuu H. Merkel cell polyomavirus infection, large T antigen, retinoblastoma protein and outcome in Merkel cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2011;17:4806-13.
58. Higaki-Mori H, Kuwamoto S, Iwasaki T, Kato M, Murakami I, Nagata K, et al. Association of Merkel cell polyomavirus infection with clinicopathological differences in Merkel cell carcinoma. *Hum Pathol.* 2012;43:2282-91.
59. Schrama D, Peitsch WK, Zapatka M, Kneitz H, Houben R, Eib S, et al. Merkel cell polyomavirus status is not associated with clinical course of Merkel cell carcinoma. *J Invest Dermatol.* 2011;131:1631-8.

60. Molina-Ruiz AM, Cerroni L, Kutzner H, Requena L. Immunohistochemistry in the diagnosis of cutaneous bacterial infections. *Am J Dermatopathol*. 2015;37:179-93. quiz 94-6.
61. Martin-Ezquerro G, Fernandez-Casado A, Barco D, Jucgla A, Juanpere-Rodero N, Manresa JM, et al. *Treponema pallidum* distribution patterns in mucocutaneous lesions of primary and secondary syphilis: an immunohistochemical and ultrastructural study. *Hum Pathol*. 2009;40:624-30.
62. Goel MM, Budhwar P. Immunohistochemical localization of *Mycobacterium tuberculosis* complex antigen with antibody to 38 kDa antigen versus Ziehl Neelsen staining in tissue granulomas of extrapulmonary tuberculosis. *Indian J Tuberc*. 2007;54:24-9.
63. Shieh WJ, Guarner J, Paddock C, Greer P, Tatti K, Fischer M, et al. The critical role of pathology in the investigation of bioterrorism-related cutaneous anthrax. *Am J Pathol*. 2003;163:1901-10.
64. Lecuit M, Eloit M. The diagnosis of infectious diseases by whole genome next generation sequencing: a new era is opening. *Front Cell Infect Microbiol*. 2014;4:25.
65. Kaggate SS, Barbuddhe SB, Kumanan K. Next generation sequencing technologies: tool to study avian virus diversity. *Acta Virol*. 2015;59:3-13.