

**USO DE LA TINCIÓN DE AUREAMINA O
(TETRAMETILDIAMINADIFENILCETOININA)
EN EL DIAGNÓSTICO DE LA PARATUBERCULOSIS OVINA
Y CAPRINA**

GERMÁN VALERO ELIZONDO¹
CAROLINA RAMÍREZ CASILLAS²
VÍCTOR MADRIGAL SÁNCHEZ¹

Existen numerosas pruebas en la literatura para identificar las micobacterias recuperadas de especímenes clínicos. Es obvio que la mayoría de los laboratorios clínicos no tienen suficiente tiempo, personal o recursos para usar esta gran cantidad de pruebas; por esta razón se investiga buscando métodos simplificados y rápidos; por fortuna las micobacterias patógenas pueden ser identificadas en forma adecuada utilizando un número relativamente pequeño de pruebas (Graber, 1970). En los últimos años se ha establecido que la tinción fluorescente de *Mycobacterium tuberculosis* con tetrametildiaminadifenilcetoína (aureamina O) da una proporción mayor de hallazgos positivos que cuando se tiñe con carbol fucsina, esto es verdad tratándose de bacilos en muestras de esputo, como en secciones histológicas, Mc. Manus, 1964; Schuhardt, 1978). Barksdale y Kim (1977) describen un experimento en donde se inocularon cuyes con *M. tuberculosis*, se sacrificaron y se hicieron cortes histológicos de diferentes órganos que se tiñeron con aureamina O y Ziehl-Neelsen y cultivos bacterianos de los mismos órganos, encontrando que los resultados obtenidos en el cultivo bacteriano de los tejidos y en los cortes histológicos teñidos con aureamina fueron casi iguales; este mismo autor concluye que la aureamina O penetra muy bien en los tejidos orgánicos. Muchos laborato-

rios la prefieren sobre la tinción ácido-resistente de Ziehl-Neelsen porque las bacterias teñidas pueden observarse más fácilmente, por destacar con una coloración amarilla verdosa sobre fondo oscuro; además debe recordarse que mientras que la tinción de Ziehl-Neelsen sólo colorea a las micobacterias que estaban estructuralmente íntegras al momento de ser fijadas, la tinción de aureamina colorea también bacterias en degeneración (Haas, 1981). La técnica descrita por Truan *et al.* (1962) de la tinción de aureamina-rodamina ha demostrado ser altamente satisfactoria en muchos laboratorios, y los autores mencionan que con esta tinción es posible encontrar hasta tres veces mayor cantidad de casos positivos de tuberculosis que con la tinción de Ziehl-Neelsen tradicional; Haas (1981) sugiere el uso de la tinción de aureamina O cuando hay pocos bacilos en los tejidos y para diferenciar tuberculosis de brucelosis y mal de Crohn. Conn (1957) hace una mención especial sobre esta tinción para el diagnóstico de micobacterias, en donde destaca como ventajas de su uso que puede usarse con un objetivo de poco aumento y que la gran cantidad de campos que pueden ser examinados asegura diagnósticos positivos en los casos en que el número de bacilos tuberculosos son pocos. Lennette (1980) apoya las ventajas mencionadas por Conn (1957) y añade además que el uso de un lente 20x o 25x, además de permitir la inspección de un área amplia en poco tiempo, presenta mejor contraste y disminuye el cansancio visual del microscopista.

En el caso de paratuberculosis, el diagnóstico es un tanto difícil en ganado bovino

¹ Depto. de Fisiopatología, Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, Km. 15.5 Carretera México-Toluca, C.P. 05110.

² Depto. de Bacteriología y Micología, Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, Km. 15.5 Carretera México-Toluca. C.P. 05110.

(Trigo, 1979) y en ganado ovino y caprino (Ramírez, C.; González, S. y De Lucas T., 1983) debido a que las pruebas serológicas son poco específicas, y a que el cultivo del agente demora varias semanas (Lenghaus, *et al.*, 1977; Sherman y Gezon, 1980).

Motivados por los buenos resultados obtenidos por otros autores con esta tinción, en el curso de una investigación sobre paratuberculosis en un grupo de borregos y cabras, se utilizó la tinción de aureamina 0 siguiendo la técnica recomendada por Haas (1981), modificada para tejidos fijados en formol amortiguado e incluidos en parafina de la siguiente manera:

Preparar una solución al 0.3% de aureamina 0 con 0.3 g de aureamina 0 finamente molida, 3 g de fenol en cristales en 100 ml de agua destilada, agitando sin calentar para disolver el colorante.

Preparar una solución de colorante con 0.5 ml de ácido clorhídrico, 0.5 g de cloruro de sodio en 75 ml de alcohol metílico.

Preparar una solución al 0.1% de permanganato de potasio en agua destilada.

Los cortes incluidos en parafina se cortan a 5 micras de grosor y se desparafinan e hidratan. Las improntas se fijan en alcohol absoluto y después se hidratan. A las laminillas por teñir se les sumerge 10 veces en agua destilada y se tiñen por inmersión en la solución de aureamina por 10 minutos en un horno a 60 C.

Se lavan 2 minutos en agua y se sumergen por dos minutos en dos baños repetidos con la solución decolorante. Se lavan en agua 2 minutos. Se sumergen 1 minuto en la solución de permanganato de potasio.

Los cortes se enjuagan 10 veces en agua, se deshidratan en alcoholes, se aclaran en xilol y se montan en glicerina tamponada u otro medio no fluorescente. La diferencia principal de esta versión con la técnica recomendada por Haas (1981) es el tiempo del baño de permanganato, que Haas (1981) recomienda sea de 2 minutos.

Paralelamente se colorearon cortes con hematoxilina-eosina y Ziehl-Neelsen según recomienda Culling (1974).

Se revisaron 32 laminillas de intestino delgado y ganglios linfáticos mesentéricos

pertenecientes a nueve animales (3 ovinos y 6 caprinos), procedentes de tres diferentes explotaciones. A partir de estos mismos animales fue aislado e identificado *Mycobacterium paratuberculosis* (Ramírez, P. y cols., 1983).

En todos los casos, una vez que se hubo ajustado el microscopio de fluorescencia en campo oscuro, resultó más fácil la observación de micobacterias intra y extracelulares en las laminillas teñidas con aureamina 0, que en las laminillas teñidas con Ziehl-Neelsen. En la repetición de las tinciones se presentaron algunas laminillas que no transmitían la luz ultravioleta, debido quizás a los portaobjetos usados. Conviene recordar lo mencionado por Schurhardt (1978), que recomienda el uso de portaobjetos nuevos y libres de grasa, debido a que los portaobjetos usados pueden estar rayados y por lo tanto retener el colorante durante la decoloración, dando resultados positivos falsos. Este defecto se corrigió cuando se utilizaron laminillas nuevas y desengrasadas en alcohol. Otras laminillas presentaron una extraña fluorescencia de los tejidos; esto fue debido a que los alcoholes usados en la deshidratación de los cortes histológicos estaban contaminados con eosina amarillenta; cuando se reemplazaron por alcoholes nuevos este defecto no se presentó.

El uso de la tinción de aureamina 0 resultó un buen recurso para identificar *M. paratuberculosis* en cortes histológicos, debido a que la observación del microorganismo fue clara y definida; también se consideró como una gran ventaja el uso de un objetivo de poco aumento que permitió la inspección de un área amplia en menos tiempo y con menos cansancio visual para el microscopista.

Los autores agradecen al Sr. Guillermo Barreto su ayuda en el montaje de los cortes histológicos.

Summary

The advantages of the auramine 0 fluorescent stain for the diagnosis of paratuberculosis in sheep and goats are discussed.

Thirty two histological slides of paraffin embedded tissues from three sheep and six goats naturally infected were examined. Once the fluorescence microscope was ad-

justed, the mycobacteria were more easily discerned with the fluorescent stain than with the Ziehl-Neelsen stain. Some common problems of the technique are discussed.

Literatura citada

- BARKSDALE, L. and K.S. KIM, 1977, Mycobacterium. Bacteriological Reviews, 41:217-372.
- CONN, H.J., 1957, Manual of Microbiological Methods, Society of American Bacteriologists, Mc Graw-Hill, New York, p. 10-36.
- CULLING, C.F.A., 1974, Handbook of Histopathological and Histochemical Techniques, Butterworths, London.
- GRABER, C.D., 1970, Rapid Diagnostic Methods in Medical Microbiology, Williams and Wilkins, Baltimore, p. 118-132.
- HAAS, E., 1981, 50 Diagnostic Special Stains for Surgical Pathology, J.B. Lippincott, Philadelphia, p. 14-15.
- LENCHAUS, C., R.T. BADMAN and J.C. GILL-K, 1977, Johne's Disease in goats, Aust. Vet. J., 53:460.
- LENNETTE, E.H., 1980, Manual of Clinical Microbiology, 3ed., Ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C., p. 150-170.
- McMANUS, J.F., 1964, Staining Methods, Histologic and Histochemical, Harper and Row, New York, p. 361-371.
- RAMÍREZ, P.C., C.C. RAMÍREZ, G.E. VALERO y E.T. TRIGO, 1983, Paratuberculosis en cabras en México, Téc. Pec. Méx., 45:104-106.
- RAMÍREZ, I.C., R. GONZÁLEZ y J. DE LUCAS, 1983, Evaluación de tres métodos de diagnóstico para la detección de paratuberculosis en cabras, Resúmenes de la Reunión de Investigación Pecuaria en México, Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, México, D.F.
- SCHUHARDT, V.T., 1978, Pathogenic Microbiology, J.B. Lippincott Company, 1rst. ed., New York, p. 107-116.
- SHERMAN, D.M. and M.H. GEZON, 1980, Comparison of agar gel immunodiffusion and faecal culture for identification of goats with Paratuberculosis, J. Am. Vet. Med. Ass., 177:1208-1211.
- TRIGO, F.J., 1979, Diagnóstico de la paratuberculosis (enfermedad de Johne), Estudio recapitulativo, Vet. Méx., 10:41-45.
- TRUANT, J.P., W.A. BRETT and JR. W. THOMAS, 1962, Fluorescence Microscopy of Tubercle bacillus stained with aureamine and rhodamine, Henry Ford Hosp. Med. Bull., 10:287-296.