

COMPARACION ENTRE TINCIONES ESPECIALES PARA BACTERIAS ACIDO-RESISTENTES EN CORTES HISTOLOGICOS ^a

Dante González Salazar ^b
Germán Valero Elizondo ^{b,c}
Juan I. Monroy Basilio ^b
Dionicio Córdova López ^b

RESUMEN

González S D, Valero E G, Monroy B J I, Córdova L D. *Téc. Pecu. Méx.* Vol 36 No 1 1998. 89-94. El objetivo del presente estudio fue determinar entre las tinciones comúnmente utilizadas para el diagnóstico de tuberculosis y la técnica de inmunohistoquímica, con cuál es más fácil detectar escasas micobacterias en cortes histológicos. Se procesaron nódulos linfáticos con lesiones sugestivas a tuberculosis por el método rutinario de inclusión en parafina y tinción con hematoxilina-eosina. A partir de los bloques con reacción granulomatosa característica se realizaron cortes para ser teñidos con una tinción de referencia (Ziehl Neelsen), seleccionando los que presentaron menos de tres micobacterias. De éstos bloques se realizaron cortes en blanco (sin teñir), los cuales se distribuyeron al azar para las tinciones de ZN en caliente, Kinyou y nueva fuscina (en frío), auramina y la técnica de inmunohistoquímica indirecta con avidina-biotina-peroxidasa. Las laminillas fueron interpretadas por tres patólogos con experiencia en el diagnóstico de tuberculosis, registrando su diagnóstico, el tiempo empleado en segundos y la facilidad de interpretación. Los resultados fueron analizados estadísticamente. La tinción fluorescente con auramina resultó ser una técnica muy confiable, ya que las micobacterias se observaron con facilidad dentro del centro de necrosis, así como en la periferia del granuloma. Con la técnica de inmunohistoquímica no se obtuvieron los resultados esperados. Se concluye que todas las tinciones utilizadas fueron eficientes. Sin embargo, cuando se sospeche de un caso positivo en el cual no se observan micobacterias, se recomienda utilizar una tinción fluorescente.

PALABRAS CLAVE: Histopatología, Tuberculosis, Tinciones, Inmunohistoquímica.

La tuberculosis bovina (TB) es una enfermedad que afecta de manera importante al ganado productor de leche del país, causando grandes pérdidas económicas a la ganadería nacional (1), además de la enorme importancia que tiene en salud pública (2). El método más práctico y económico para el control y

erradicación de la tuberculosis, es el seguimiento y la inspección *posmortem* de animales sospechosos o positivos a la prueba de intradermoreacción, que han sido enviados al rastro (3,4). Aunque el aislamiento bacteriano es la prueba confirmatoria de la enfermedad, presenta el inconveniente de que la micobacteria tarda mucho tiempo en crecer y el proceso es muy laborioso (5). Un diagnóstico rápido y eficiente de tuberculosis es un factor determinante para la toma de decisiones, sobre todo en regiones que se encuentran libres de la enfermedad o en fase de erradicación.

a Recibido para su publicación el 20 de agosto de 1997

b Laboratorio de Diagnóstico. Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología Veterinaria. INIFAP-SAGAR. Km 15.5 carr. México-Toluca, Col. Palo Alto, Cuajimalpa, México, D.F. CP 05110

c Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, Cd. Universitaria, México, D. F.

El diagnóstico histopatológico es un procedimiento rápido y confiable, que en muchas ocasiones con la tinción de hematoxilina-eosina se puede inferir un diagnóstico presuntivo de TB por la simple reacción inflamatoria granulomatosa, mientras se trabajan simultáneamente muestras pareadas con cualquier tinción para bacterias ácido alcohol resistentes (BAAR).

La Norma Oficial Mexicana de Tuberculosis Bovina (NOM-031-ZOO-1995) establece que para el diagnóstico histológico, los cortes de tejidos sugestivos de tuberculosis deben de ser teñidos con una tinción de Ziehl-Neelsen (ZN) o con una tinción fluorescente de auramina (6). Sin embargo, en tuberculosis bovina es frecuente que casos con lesiones extensivas severas o incipientes, presenten escasas BAAR, las que podrían pasar desapercibidas a la inspección histológica (7).

Desde que Roberto Koch en 1882 logró demostrar con éxito a la micobacteria y luego de que Ziehl desarrolló una solución de fenol-fucsina, la cual luego Neelsen modificó, logrando la demostración de los organismos ácido-resistentes (8), se ha seguido buscando mejorar los métodos de diagnóstico en cuanto a los procedimientos de tinción, disminuyendo los tiempos de procesamiento, mejorando la diferenciación entre los bacilos tuberculosos y el tejido circundante para facilitar la búsqueda de las micobacterias, y que no resulten demasiados costosos.

Actualmente existe una variedad de tinciones para el diagnóstico de la tuberculosis, con ventajas y desventajas

unas sobre otras. Entre las técnicas más utilizadas se encuentran: ZN en caliente, ZN en frío (Kinyou y nueva fucsina) y la tinción fluorescente de auramina combinada con rhodamina o naranja de acridina, para diferenciar a las lesiones granulomatosas causadas por hongos.

La técnica de ZN tradicional requiere del calentamiento de la muestra en platina o estufa, a una temperatura de 60 C, durante 30 min., lo que la hace más laboriosa y costosa por el elevado consumo de reactivos durante el proceso de calentamiento, por lo cual esta técnica ha ido cayendo en desuso.

Las tinciones conocidas como de Kinyou y Nueva fucsina son técnicas modificadas de la ZN en caliente, las cuales no requieren de calentamiento, por lo que son más aceptadas por algunos laboratorios.

Se menciona que la técnica fluorescente con auramina detecta mayor número de micobacterias por corte, que la de ZN en caliente, al menos en el caso de *Mycobacterium paratuberculosis* (9), aunque tiene el inconveniente de que para la interpretación requiere de un microscopio de fluorescencia.

Al parecer, la inmunohistoquímica (IH), por ser una técnica inmunológica, es muy eficiente, debido a que puede detectar micobacterias enteras y sus fracciones en cortes de tejidos incluidos en parafina, lo cual facilita el diagnóstico (10, 11, 12, 13).

El objetivo del presente estudio fue determinar entre la técnica de inmunohistoquímica indirecta con avidina-biotina-peroxidasa y las tinciones utilizadas

TINCIONES PARA BACTERIAS ACIDO-RESISTENTES

en un laboratorio de diagnóstico de TB, con cual es más fácil detectar escasas micobacterias en cortes histológicos de nódulos linfáticos y determinar la concordancia entre observadores.

Se obtuvieron 25 nódulos linfáticos (NL) de bovinos lecheros sacrificados en rastro, que a la inspección macroscópica presentaban lesiones granulomatosas compatibles a tuberculosis. Además, se obtuvo un NL negativo a TB que fue utilizado como control. Los tejidos linfoides fueron procesados por el método rutinario de inclusión en parafina y teñidos con hematoxilina y eosina (HE), realizando cortes de 6 micras de grosor (14,15).

Mediante la tinción de HE se seleccionaron al azar 5 bloques de parafina que presentaban la reacción granulomatosa característica de tuberculosis. Para verificar la presencia de micobacterias, con éstos bloques se realizaron cortes que fueron teñidos con una tinción de referencia, que en este caso fue la de ZN, utilizando como control positivo una laminilla con tejido de intestino de bovino infectado en forma natural de paratuberculosis.

Las cinco técnicas que se compararon y la metodología empleada para el desarrollo e implementación fueron las siguientes: la tinción de nueva fuscina y la tinción fluorescente de auramina - naranja de acridina, utilizadas en el Laboratorio Central de Referencia para el Diagnóstico de la Tuberculosis Bovina de EUA (16), la tinción de ZN en caliente (14), la tinción de Kinyou, de uso común en laboratorios de patología humana (14,17) y una técnica de inmunohistoquímica indirecta con avidina-biotina-peroxidasa, empleando un antisuero primario policlonal anti-BCG

elaborado en conejo y diluido 1:100, de acuerdo a las instrucciones del fabricante¹ (18).

A partir de los bloques que presentaban menos de tres micobacterias con la tinción de referencia, se realizaron cinco cortes seriados en blanco (sin teñir), los cuales se distribuyeron aleatoriamente en cinco grupos, quedando en cada tinción: un testigo de paratuberculosis, nueve casos problema y cuatro testigos negativos, dando un total de 14 laminillas para cada tinción. En todos los grupos, excepto en la tinción fluorescente, se utilizó el azul de metileno a una misma concentración, como fondo de contraste.

Todas las laminillas fueron analizadas por tres patólogos con más de tres años de experiencia en el diagnóstico histológico de tuberculosis. Se les pidió que anotaran su diagnóstico (positivo-negativo), el tiempo empleado en segundos y el grado de facilidad para su interpretación (fácil, regular, difícil). Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante la prueba de Kappa (19, 20) para determinar la concordancia entre observadores y comparación de medias entre tiempos de interpretación.

La concordancia general entre patólogos para las 5 pruebas varió en el intervalo de 0.79 a 0.85 de valor de Kappa. En cuanto a prueba específica, la concordancia para las pruebas NF, Kinyou y auramina fue excelente, encontrándose un valor de Kappa de 1.0. Por lo que respecta a ZN caliente e IH, las concordancias variaron en el intervalo de 0.23 a 0.83, y de 0.55 a 0.83 respectivamente (Cuadro 1).

¹ Dakko, Carpinteria, California, EUA.

Cuadro 1. Concordancia interobservadores en diagnóstico general y por prueba diagnóstica.

Concordancia	General	Pruebas				
		1	2	3	4	5
Patol. 1-2	0.7910 (0.000)	1.0 (0.0002)	0.2352 (0.0940)	1.0 (0.0002)	0.6977 (0.0042)	1.0 (0.0002)
Patol. 1-3	0.8514 (0.000)	1.0 (0.0002)	0.3158 (0.0592)	1.0 (0.0002)	0.8312 (0.0012)	1.0 (0.0002)
Patol. 2-3	0.8632 (0.000)	1.0 (0.0002)	0.8312 (0.0012)	1.0 (0.0002)	0.5517 (0.0130)	1.0 (0.0002)

Valor de kappa 0 - 1 (p); 0 = nula 1 = excelente

Pruebas:

- 1 Nueva fucsina
- 2 Zn caliente
- 3 Kinyou
- 4 Histoquímica
- 5 Auramina

Los tres observadores experimentaron diferentes grados de dificultad para las técnicas ($p < 0.01$), especialmente la de ZN en caliente ($p < 0.01$) y la inmunohistoquímica ($p < 0.001$). Para el caso de regular dificultad no hubo diferencias entre patólogos (0.0435). En el caso de la tinción de ZN en caliente la elevada dificultad podría deberse a las muy escasas BAAR presentes en las laminillas; mientras que en la inmunohistoquímica, podría ser atribuible a la falta de familiaridad con la realización de la técnica e interpretación de los resultados.

El tiempo empleado en revisar los casos fue proporcional al grado de dificultad ($p < 0.05$) en la mayoría de los casos. Un hallazgo interesante fue el de las laminillas positivas, donde el patólogo más lento

demoró en promedio casi el doble que el más rápido (65 contra 35 segundos; $p < 0.01$) para dar el resultado.

Los resultados indican que hubo mayor cantidad de falsos positivos y falsos negativos en la técnica de IH. El tiempo promedio para evaluar un caso positivo fue diferente en todas las técnicas, variando en el intervalo de 42 a 96 segundos, con una media general de 64, siendo mayor en la tinción de ZN caliente. El tiempo promedio para evaluar un caso negativo fue superior a los casos positivos, resultando diferente en todas las técnicas, variando en el intervalo de 187 a 228 segundos, con un promedio general de 209.52 segundos.

En todas las tinciones que utilizaron azul de metileno como medio de contraste, las

TINCIONES PARA BACTERIAS ACIDO-RESISTENTES

micobacterias se observaron de un color similar, no presentandose diferencias de contraste entre el fondo azul y las micobacterias teñidas de color rojo. La tinción fluorescente con auramina, resultó ser una técnica muy confiable y fácil de interpretar, por lo que las micobacterias completas o fracciones de ellas, fueron identificadas claramente dentro del centro de necrosis y en la periferia del granuloma, dentro de los macrófagos.

Cuando se utilizaba un objetivo de mayor aumento era más laborioso localizar el área con reacción granulomatosa, ya que con ésta tinción se pierde el detalle celular, pero cuando se utilizaba un objetivo panorámico se reducía el tiempo de búsqueda, y fácilmente se podía localizar el área granulomatosa. Es importante mencionar que durante la implementación de las técnicas, se descartó la posibilidad de interpretar las laminillas fluorescentes utilizando lámpara de tungsteno, debido a la escasa fluorescencia, por lo que la evaluación fue hecha con lámpara de mercurio.

Cabe resaltar que al realizar los cortes seriados durante la implementación de las técnicas, algunos cortes de casos positivos no presentaban micobacterias, por lo cual, se recomienda para un diagnóstico confiable obtener diferentes porciones del NL afectado, para ser incluidas en parafina. Se concluye que los laboratorios dedicados al diagnóstico de TB pueden utilizar cualquiera de las tinciones de ZN, en caliente o en frío, dependiendo de la economía y la infraestructura del laboratorio; sin embargo, cuando se sospeche de un caso positivo, en el cual no

se observen bacterias ácido-resistentes, se recomienda utilizar la tinción fluorescente con auramina, empleando lámpara de mercurio. Los resultados inesperados obtenidos con la técnica de IH pueden deberse a una falta de familiaridad tanto en el desarrollo de la técnica, así como para la interpretación microscópica de la misma.

COMPARISON OF STAINS FOR ACID-FAST BACTERIA LOCATED IN HISTOLOGICAL SECTIONS

SUMMARY

González S D, Valero E G, Monroy B J I, Córdova I. D. *Téc. Pec. Méx.* Vol 36 No 1 1998. 89-94. The aim of this work was to determine the most useful staining technique for detecting the scant acid-fast organisms (AFOs) present in tissue sections. The samples were routinely processed for paraffin embedding, sectioning, HE and Ziehl Neelsen (ZN) staining. The tissue blocks with characteristic granulomatous lesions and very few acid-fast organisms were serially sectioned and randomly distributed for hot ZN, Kinyou (cold ZN), new fuchsin, auramin and immunohistochemistry (IH) processing. The slides were assessed by three veterinary pathologists experienced in TB diagnosis, who scored diagnosis, time spent and ease of diagnosis. Results were statistically analyzed. The IH technique gave unexpected results, possibly due to lack of familiarity with the technique and laboratory equipment deficiencies. The fluorescent stain resulted a very reliable technique, as AFOs were easily seen in the inner and outer parts of the granulomas. It was concluded that all stains were useful, but when no AFOs are seen in a suspect case, the fluorescent auramin stain should be used.

KEY WORDS: Histopathology, Tuberculosis, Stains, Immunohistochemistry.

REFERENCIAS

1. Garza Treviño E. Introducción general y situación actual de la tuberculosis y brucelosis en México. En: memorias del curso de capacitación de coordinadores estatales y supervisores distritales en tuberculosis bovina y brucelosis. Facultad de Medicina Veterinaria y zootecnia, UNAM, 1994.

2. Acha P N, Szyfres. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y los animales. Publicación científica OPS, 1977; 98-110.
3. Mateos P A. Patología macroscópica de la tuberculosis. En: Memorias del curso de capacitación de coordinadores estatales y supervisores distritales en tuberculosis bovina y brucelosis. Facultad de Medicina Veterinaria Y Zootecnia, UNAM, 1994.
4. Corner L A, Melville L, Mccubbin K, Small K J, Mc Cormick B S, Wood P R, Rothel J S. Efficiency of inspection procedures for the detection of tuberculous lesions in cattle. *Aust. Vet. J.*, 1990 ; 67, No 11,.
5. Carter G R. Bacteriología y Micología Veterinarias. Aspectos esenciales. Ed. México: el manual moderno, 1985, 239-235.
6. Norma Oficial Mexicana para el control y erradicación de la tuberculosis bovina y brucelosis en México. Diario Oficial, 8 de marzo de 1995.
7. Jubb K V, Kennedy P C , Palmer N. Pathology of Domestic Animals, 3a. Ed. New York , vol. 1, Academic Press. 1985.
8. Seastrunk J W, Stinson J C. A rapid methylene blue stain for tubercle bacilli. *Stain Techn.* 1962; 37: 251-253.
9. Valero E G, Ramírez C C, Madrigal S V. Uso de la tinción de auramina (tetrametil. diaminadifenilcetonina) en el diagnóstico de la paratuberculosis ovina y caprina. *Tec. Pecu. Mex.* 1984; 47: 147.
10. Harboe M, Mshana R N, Coss O, Kronvall G, Axelsen N H. Cross-reactions between micobacteria, identification and quantification of antigens, characterization of antimycobacterial antibodies and for the sensitive detection of mycobacteria in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. 1982, *Scand. J. Immunol.* 14: 333.
11. Closs O, Harboe M, Axelsen N H, Bunch-Creistensen K, Magnusson M. The antigens of *Mycobacterium bovis*, strain BCG, studied by crossed immunoelectrophoresis: a reference system. *Scand. J. Immunol.* 1980, 12: 249.
12. Wiley E L, Mulhollan T J, Beck B, Tyndall J A, Freeman R G. Polyclonal antibodies raised against *Bacillus Calmette-Guérin*, *Mycobacterium duvali* and *Mycobacterium paratuberculosis*; use of immunohistochemical techniques. *Am. J. Clin. Path.*, 1990, 94: 307.
13. Haines D M, Chelack B J. Technical considerations for developing enzyme immunohistochemical staining procedures on formalin-fixed paraffin-embedded tissues for diagnostic pathology. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 1991, 3: 101.
14. Luna L G. Manual of histologic Staining of the Armed Forces Institute of Pathology. Ed. , New York, U.S.A, McGraw-Hill, 1960.
15. Valero E G, Valero E G, Morales A F. Técnica de histopatología. En: Valero E G. (ed): Diagnóstico Veterinario. Sociedad Mexicana de Patólogos Veterinarios México. 1993; 18-29.
16. Donald A, Willigan V, Garric A, Beverly K, Trosko K. New fuchsin-hematoxilin-eosin; a stain for acid-fast bacilli and surrounding tissue,. *Stain. Techn.* 1961; 36:319.
17. Hass E. 50 Diagnostic Special Stains for Surgical Pathology. Philadelphia, U.S.A. J.B. Lippincott, 1990,
18. Boenisch T. Staining Methods. In: Sally J N (ed): *Immunochemical Staining Methods.* , California U.S.A, DAKO Corporation. 1989.
19. Kelsey L J. Methods in observational epidemiology. Thompson N.D, Evans A.S. New York. Oxford University Press., 1986; 288-293.
20. Kramer M S, Feinstein A R. Clinical Biostatistics.. LIV. The biostatistics of concordance. *Clin. Pharmacol. Ther.* Jan. 1981. 111-123.