

## ACTUALIZACIONES

# LA COLORACION DE ZIEHL-NEELSEN EN HISTOPATOLOGIA

PATRICIA J. DE NARANJO\*, GERZAIN RODRIGUEZ T.\*\*, JAIME RODRIGUEZ A.\*\*\*, MARIA LEONOR CALDAS\*\*\*\*

## INTRODUCCION

El diagnóstico definitivo de las enfermedades infecciosas causadas por micobacterias se basa en la demostración de su agente etiológico. Esto se consigue, entre otras formas, por histopatología, mediante la tinción de los bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) en los tejidos obtenidos in vivo o en la autopsia.

Las técnicas de coloración para micobacterias son conocidas desde hace más de un siglo y han sido ampliamente difundidas (1). Varios laboratorios de patología del país tienen dificultad para demostrar en los tejidos estos BAAR, principalmente el *M. leprae*.

El Grupo de Patología del Instituto Nacional de Salud, desde su creación en 1933, ha reunido considerable experiencia en el estudio de enfermedades por estos agentes. Esta publicación suministra aspectos generales de la coloración de Ziehl-Neelsen (Z.N.), en tejidos humanos y de animales, obtenidos por biopsia o durante la autopsia; se analiza su origen, fundamento y formas de realización, con el objeto de que este procedimiento se constituya en un método de diagnóstico sencillo, confiable, rápido, eficaz, reproducible en cualquier laboratorio del país. El método de Z.N. para esputos y otras secreciones se describe en otra publicación del INS (2).

## HISTORIA

Armauer Hansen demostró el bacilo que lleva su nombre en 1871 impregnando con ácido ósmico extendido de lepromas. Dentro de las "Leprazellen" o células de Virchow y libres en el extendido, se veían filamentos de color pardo (3), (Fig. 1)

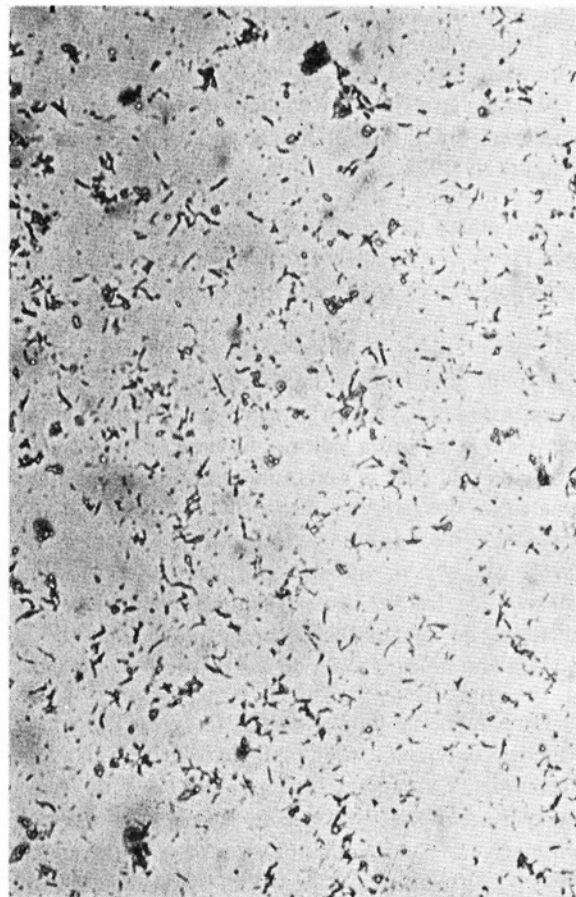


Figura 1. Macerado de leproma humano mantenido durante varios años en fenol al 5%. La tinción con OsO<sub>4</sub> al 1% durante una hora demuestra muy bien los bacilos de Hansen. 1000 X.

\* Bacterióloga, Grupo de Patología, INS.

\*\* Jefe del Grupo de Patología, INS.

Profesor Asociado de Cátedra, de los Departamentos de Morfología y Patología - Facultad de Medicina - Universidad Nacional.

\*\*\* Auxiliar Técnico del Grupo de Patología, INS.

\*\*\*\* Bióloga, Grupo de Patología, INS.

Roberto Koch anunció su descubrimiento del bacilo de la tuberculosis el 24 de marzo de 1882. Logró teñir el bacilo con solución alcohólica concentrada de azul de metileno alcalino y decoloración o diferenciación con Vesuvina (pardo de Bismarck). El bacilo de la tuberculosis y el de la lepra tomaban color azul intenso; el tejido y otras bacterias aparecían de color pardo (4).

Paul Ehrlich, basándose en los hallazgos de Koch, comunicó mes y medio más tarde, el 1° de mayo de 1882 su método de teñir el bacilo, que era más reproducible: introdujo como colorante la solución alcohólica saturada de fucsina, utilizó como mordiente aceite de anilina y continuó decolorando con el pardo de Bismarck o con ácido nítrico (4).

Franz Ziehl, en comunicación de agosto 12 de 1882, cambió el mordiente de Ehrlich, aceite de anilina, por otra sustancia semejante pero de composición más precisa. Usó ácido carbólico, con lo cual dio un paso práctico tan reproducible, que continúa usándose en nuestros días.

Friedrich Neelsen comunicó en julio 14 de 1883 que obtenía resultados excelentes con la fucsina en ácido carbólico al 5%, es decir determinó la concentración óptima del mordiente. Asimismo mostró que en sus manos la decoloración con ácido sulfúrico al 25% le daba excelentes resultados (4).

Existe una profusión enorme de artículos que modifican estos procedimientos básicos (5-7). Se varían tiempos, temperatura y decolorantes. La fucsina sigue siendo el colorante básico; el ácido carbólico al 5% es el mordiente ideal y junto con el alcohol absoluto son esenciales para obtener resultados satisfactorios.

La mayoría de las coloraciones iniciales se practicaron en extendidos. En los cortes de tejidos los resultados eran menos reproducibles. Fite revisó los aspectos técnicos generales en 1938 (5), el mismo año en el cual el histotecnólogo brasileño José Faraco publicó sus observaciones, demostrando que el uso de xilol para deparafinar los cortes, impedía la tinción ácido-alcohol resistente del bacilo de Hansen y que ésta se conservaba si las preparaciones se trataban con diferentes aceites y grasas tales como aceite Singer para máquinas de coser, aceite de olivas, enjundia de gallina, aceite para motores, aceite de capibara y aceite de hígado de bacalao (6). Los demás pasos de la

técnica seguían las indicaciones clásicas de Ziehl Neelsen. Esta observación esencial constituye la base del método de Fite-Faraco para demostrar el bacilo de Hansen, frecuentemente citado, quizá más como esterotipo que como consulta de las fuentes originales (7).

FUNDAMENTO DE LA COLORACION

La ácido-alcohol resistencia (AAR) es la capacidad que tiene un material biológico de formar complejos ácido-estables con colorantes arilméticos (8, 9) (Fig. 2). Las estructuras o bacterias así teñidas no son decoloradas al exponerlas a mezclas de alcohol-ácido o a determinadas concentraciones de ácidos minerales. Muchas estructuras y bacterias son AAR (9). Aquí interesan especialmente las micobacterias, la queratina, los gránulos secretorios de las glándulas sudoríparas (Fig. 3), los gránulos de los mastocitos (Fig. 4) y los espermatozoides. Las cuatro últimas estructuras mencionadas pueden originar interpretaciones erróneas de la coloración de Z.N.

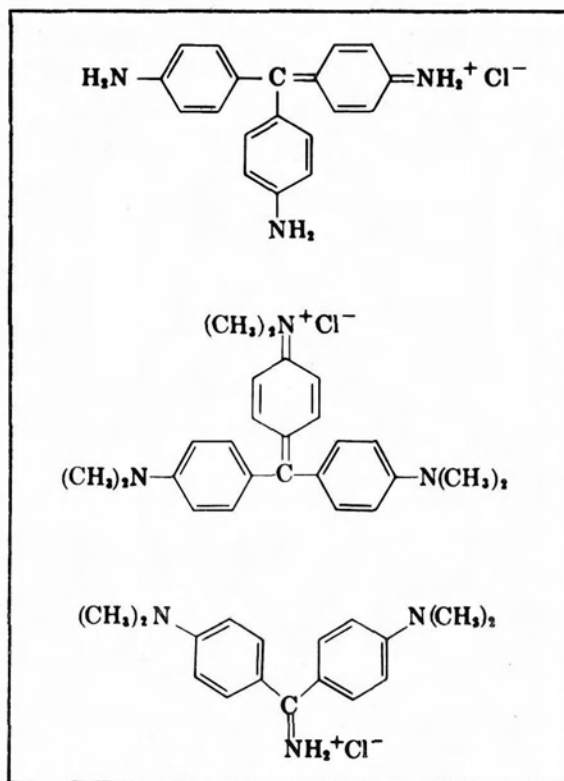


Figura 2. Fórmula estructural de tres colorantes arilméticos: fucsina, cristal violeta y auramina O.

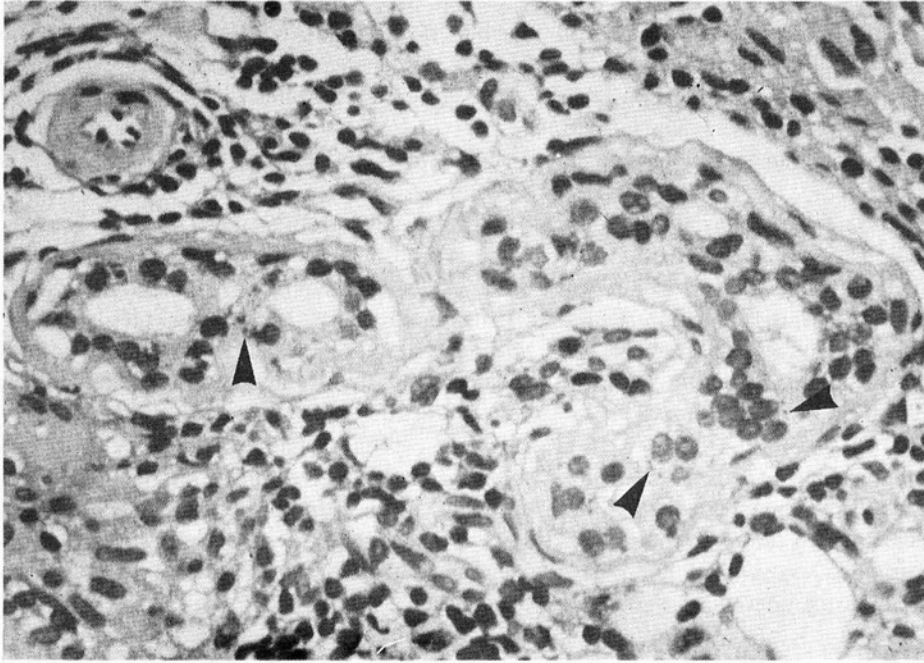
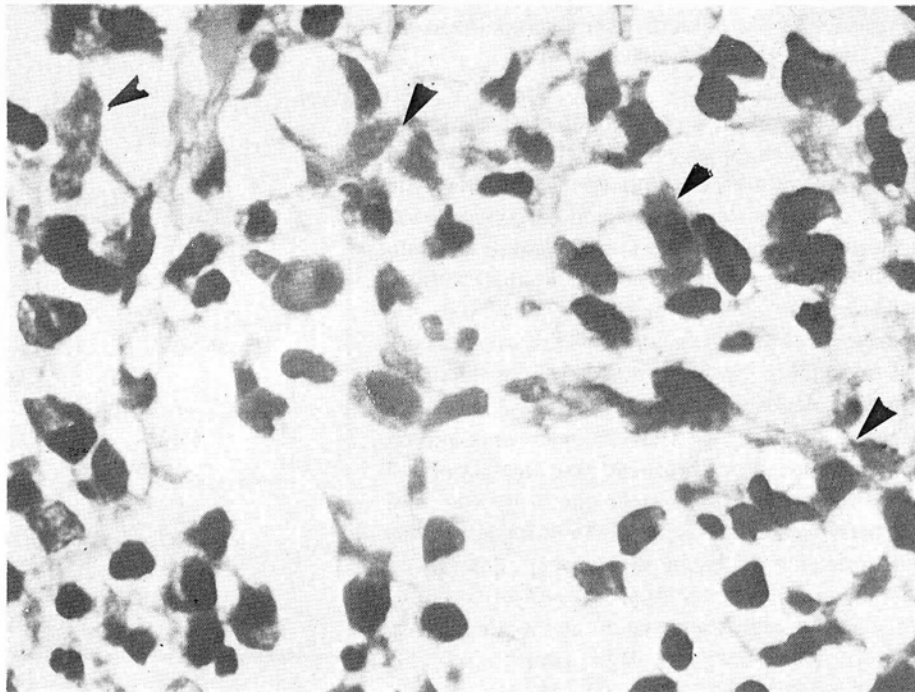


Figura 3. Gránulos A.A.R. de glándulas sudoríparas ecrinas (flechas). ZN 400 X.

Figura 4. Citoplasma granular AAR de mastocitos (flechas). ZN 1000 X.



Los colorantes usados para la demostración de la AAR son compuestos aniónicos, cuya fórmula estructural se ilustra en la figura 2. Los tres se usan en soluciones fenoladas (ácido carbólico). Los gérmenes se ven como bacilos rojos cuando se usa la fucsina, violeta púrpura con el cristal violeta, y con fluorescencia amarillo-verdosa cuando se usa Auramina O. La mejor AAR se obtiene con el cristal violeta pero la falta de un contraste de fondo adecuado para este colorante hace que se use más la fucsina; no se ha demostrado que la Auramina O sea más sensible y específica que la fucsina (9); además requiere del uso de microscopio de fluorescencia.

El mecanismo de la AAR es un fenómeno doble que requiere la penetración de la fucsina al citoplasma bacilar, así como su interacción química con los ácidos micólicos de los péptidos glucolípidos presentes en la pared celular de las micobacterias (8, 9) (Fig. 5-6). Esta reacción impide la salida de la fucsina atrapada en el citoplasma bacilar. Se aseguran así la brillantez y el color rojo intenso de los gérmenes que resisten la decoloración con alcohol y ácidos (8-9). La AAR se pierde cuando se remueve la pared externa de las micobacterias con alcohol alcalino (9).

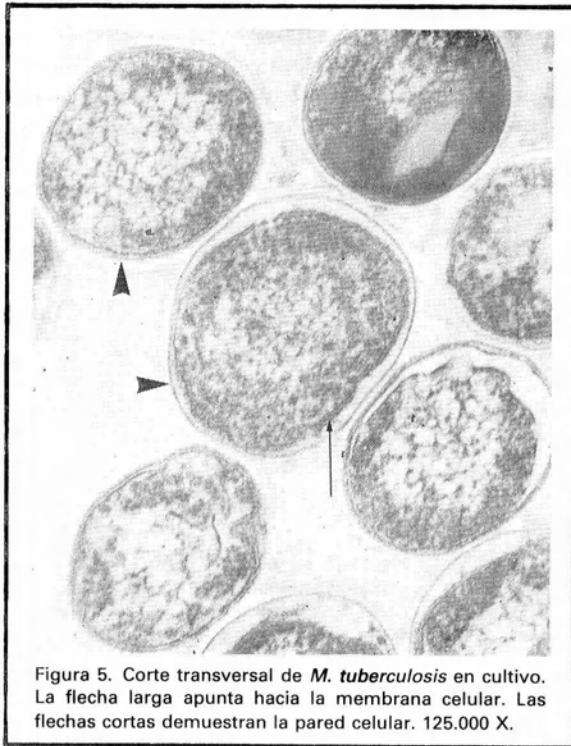


Figura 5. Corte transversal de *M. tuberculosis* en cultivo. La flecha larga apunta hacia la membrana celular. Las flechas cortas demuestran la pared celular. 125.000 X.

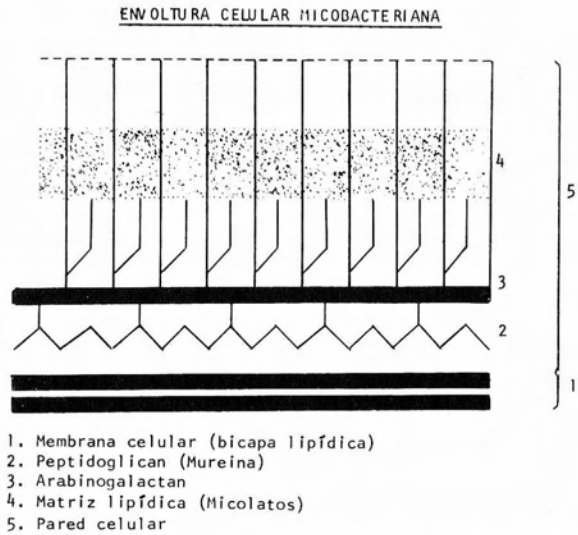


Figura 6. Esquema de la envoltura celular micobacteriana. Basado en Ref. 8 y 9.

El papel del ácido carbólico como mordiente es definitivo porque fomenta la penetración de la fucsina en los péptidos-glucolípidos bacilares; la hace más liposoluble y menos hidrosoluble (9). El alcohol en que se disuelve la fucsina también es esencial para obtener la AAR pero su forma de actuar es menos conocida.

## MATERIAL Y METODOS

### 1. Especímenes

- a. Hígados obtenidos por viscerotomía (10) con TBC miliar.
- b. Ganglios linfáticos humanos con TBC.
- c. Biopsias cutáneas de pacientes con enfermedad de Hansen.
- d. Autopsia de humano con infección generalizada por *M. avium-intracelulare*.
- e. Biopsias de piel con infección por *M. chelonae*.
- f. Autopsias de ratones y hámsteres con inflamación granulomatosa experimental por *M. tuberculosis*, *M. lepremurium* o mezclas de lepromas humanos *M. lepremurium* (11).

## 2. Fijadores

La mayoría de estos especímenes se han fijado en formol-salina al 4% o en formol al 10%. También se han utilizado fijadores de Bouin y de Zenker, formol neutro y glutaraldehído al 3% en solución tampón de fosfatos. Algunos especímenes han llegado al laboratorio en alcohol o formol puro (al 40%).

## 3. Desparafinización

Se compararon los siguientes procedimientos:

- Xilol puro durante 15 minutos.
- En el horno a 60°C durante 12 horas, seguida de aceite de parafina, flameando por 3 minutos.
- Mezcla xilol (2 partes) - Petrolato (aceite de parafina: 1 parte), durante 15 minutos.
- Mezcla de aceite comercial comestible y xilol 1:1 durante 15 minutos.

## 4. Coloración con Fucsina

Se utilizaron las siguientes, a temperatura ambiente:

Fucsina Básica	Tiempos
Fenicada al 1%	10', 15', 20', 30'
Fenicada al 4%	10', 15', 20', 30'

## 5. Decoloración

HCl al 1% en alcohol de 95%	45'', 1', 2', y 5',
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 5% en alcohol de 95%	1', 2', 5' y 10'
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 5% en H <sub>2</sub> O destilada	2', 3' y 4'

## 6. Contraste de Fondo

Azul de metileno al 0.5 y 1%	1' y 2'
Verde claro al 1%	1' y 2'
Hematoxilina de Harris	1' y 2'

## RESULTADOS Y CONCLUSIONES

1. Cualquiera de las técnicas de fijación usadas permite demostrar los BAAR. Preferimos y recomendamos el formol tamponado neutro por la preservación del detalle citológico.

2. Los BAAR se pueden demostrar en el material incluido en resinas epóxicas, luego de desplastificar con hidróxido de sodio concentrado disuelto en metanol (Fig. 7).

3. La desparafinización con xilol sólo no modifica la AAR de las micobacterias diferentes del *M. leprae*. En la enfermedad de Hansen este tipo de desparafinización es catastrófico; produce resultados negativos aun en los casos más ricos en bacilos (Fig. 8-10). Los

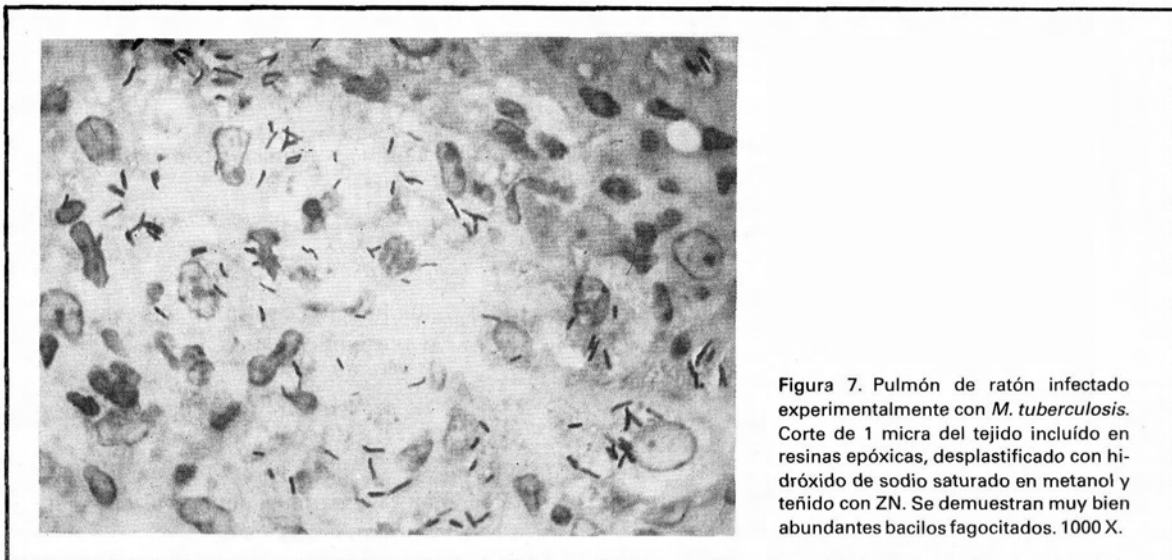
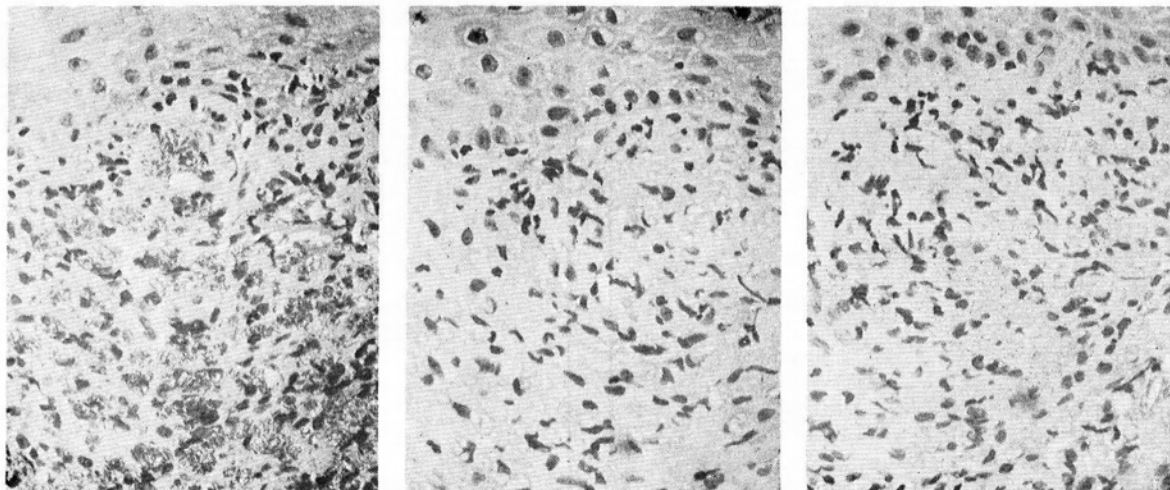


Figura 7. Pulmón de ratón infectado experimentalmente con *M. tuberculosis*. Corte de 1 micra del tejido incluido en resinas epóxicas, desplastificado con hidróxido de sodio saturado en metanol y teñido con ZN. Se demuestran muy bien abundantes bacilos fagocitados. 1000 X.



Figuras 8-10. Cortes seriados de la misma área de un leproma. Coloración de ZN. 400 X: Fig. 8: desparafinización con xilol-petrolato y decoloración con  $H_2SO_4$  5% en agua destilada. Fig. 9: desparafinización con xilol y decoloración con  $H_2SO_4$  5% en agua destilada. Fig. 10: desparafinización con xilol y decoloración con alcohol-ácido clorhídrico al 1%. Solo la primera técnica demuestra los bacilos.

mejores resultados se obtienen desparafinando con la mezcla xilol-petrolato. Con la mezcla xilol-aceite comercial se obtienen resultados intermedios útiles.

La negatividad del Z.N. en las biopsias de lepra desparafinadas con xilol, se debe al desprendimiento de los bacilos de los cortes y no a la solubilización de los lípidos de su pared celular por el reactivo. Esto se demuestra con el siguiente experimento: en frotos de lepromas tratados con xilol durante tiempos variables entre diez minutos y una hora no se observó diferencia significativa con el Z.N. de un frote control.

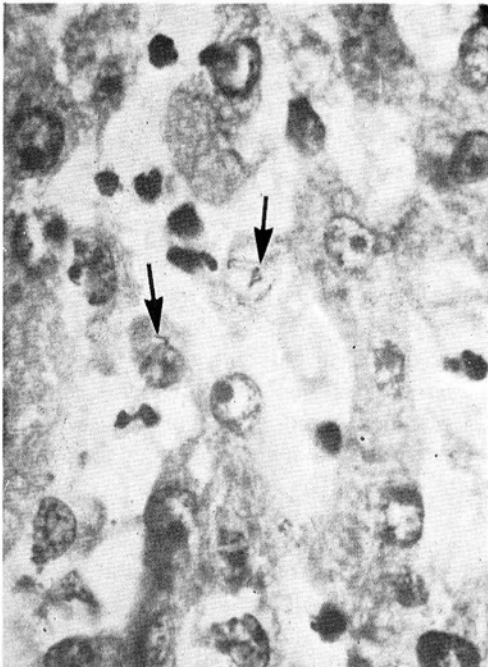
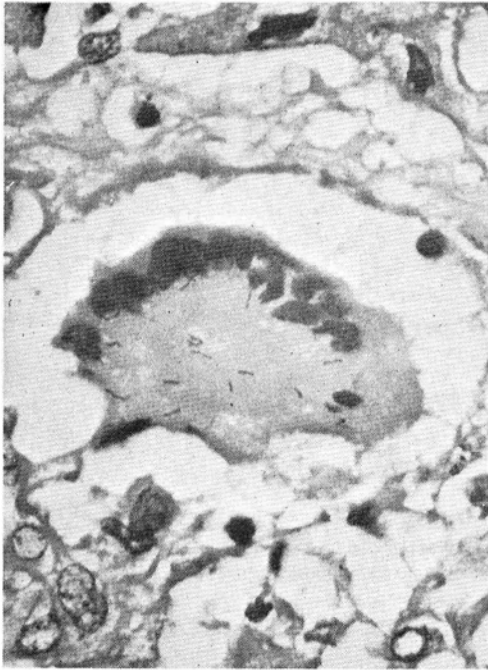
No se conoce el mecanismo por el cual el petrolato y otras sustancias oleosas facilitan la demostración del bacilo de Hansen. Quizás "estabiliza" los gérmenes evitando su desprendimiento, al impedir la disolución de los lípidos de la vacuola fagocítica del macrófago en la que están contenidos los bacilos.

4. La fucsina fenicada al 1% durante 20' da resultados satisfactorios. Se debe almacenar en frasco ámbar hermético; debe prepararse cada mes, aunque en condiciones ideales tal vez se preserva indefinidamente; debe filtrarse antes de usarse pues la evaporación del alcohol en que se disuelve, produce con frecuencia precipitados. La coloración no se debe hacer en jarras de Copplin porque el desprendimiento de los bacilos,

que siempre ocurre, puede contaminar otras preparaciones, especialmente cuando se mezclan con biopsias de enfermedad de Hansen lepromatosa.

5. La decoloración con ácido sulfúrico al 5% en agua destilada produce los mejores resultados. La decoloración con  $H_2SO_4$  al 5% en alcohol de 95° es útil pero disminuye notoriamente la cantidad de BAAR demostrados, especialmente en los casos de lepra. El alcohol ácido-clorhídrico es un decolorante más drástico que exige una precisión mayor en la decoloración. En tuberculosis hepática, las dos primeras formas de decoloración nos permitieron ver muy bien los bacilos en los granulomas y en las células de Kupffer (Fig. 11-12), mientras que con el alcohol-HCL se disminuyó considerablemente la demostración de los bacilos fagocitados por aquellas células.

6. El excelente contraste dado por la hematoxilina de Harris y en menor grado por el azul de metileno; permite observar núcleos, infiltrados, granulomas y demás componentes del tejido estudiado. (Fig. 8-10, 11-12). Se puede decir con certeza donde está localizado el bacilo, por ejemplo en macrófagos, polimorfonucleares, nervios, pelos, endotelio y otros sitios, mientras que con el verde claro como coloración de fondo, sólo es posible decir si se demostraron o no bacilos. (Fig. 13).



Figuras 11-12. Hígado. TBC miliar. Bacilos de Koch fagocitados por células gigantes y por células de Kupffer (flechas). ZN 1000 X.

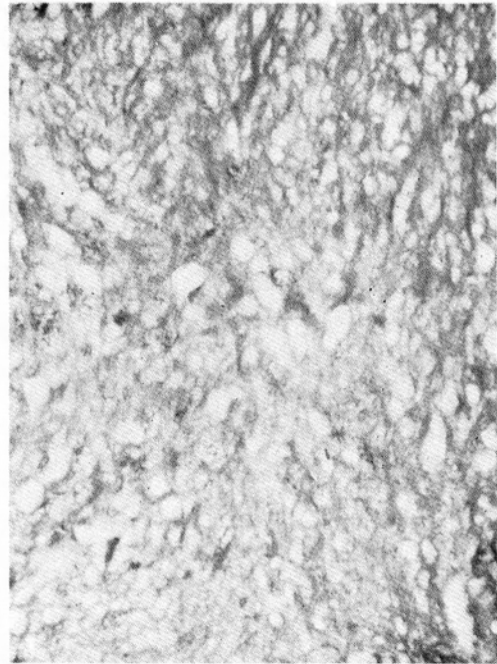


Figura 13. ZN. Contraste de fondo con verde claro. La localización de los bacilos es imprecisa. ZN. 400 X.

7. **CONTROLES:** Cada coloración de Z.N. debe llevar un control adecuado. Según lo expuesto, no es conveniente utilizar un control de bacilos de la tuberculosis ni de infecciones por micobacterias atípicas para los casos de lepra, aunque la situación inversa es posible. Tampoco se deben usar como controles casos de infecciones masivas por micobacterias, con enorme número de bacilos (Fig. 14) porque allí, a pesar de alguna eventual falla técnica, se pueden teñir algunos microorganismos. El control ideal es aquél que concuerda con el mismo tipo de infección que se pretende demostrar y que tiene una cantidad moderada de bacilos.

Durante el proceso de coloración no deben tocarse las láminas entre sí, ni con los controles. Es frecuente que se desprendan bacilos de los casos muy positivos y que flotando en el colorante común a varias láminas, se pasen a áreas de otro lámina, produciendo así una falsa impresión de positividad. Esta es otra razón para utilizar como contraste de fondo la hematoxilina de Harris o el azul de metileno que, al permitir el análisis tisular y citológico, ayudan a deducir por ejemplo que

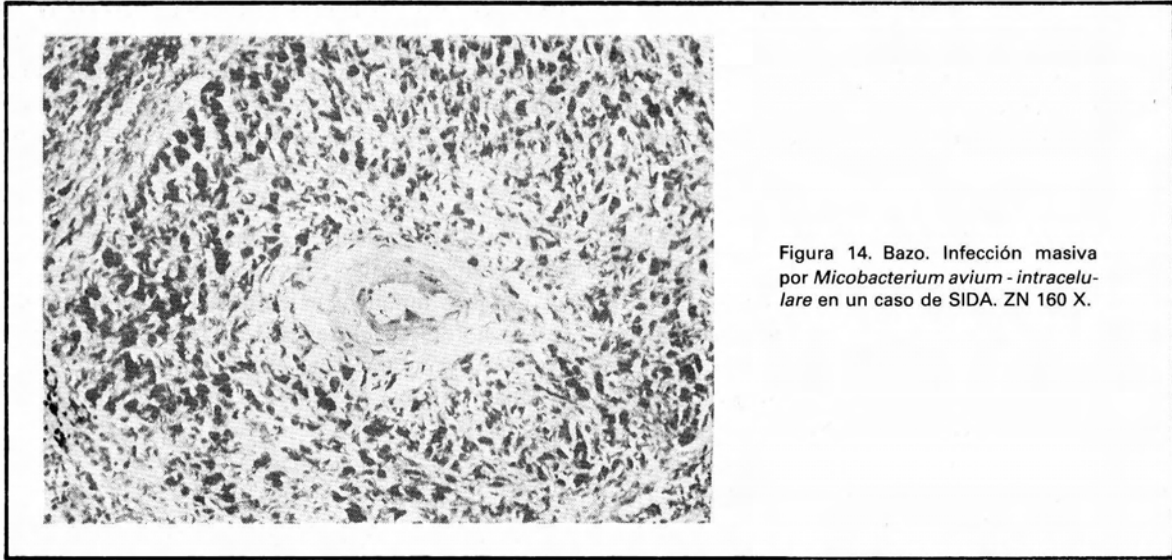


Figura 14. Bazo. Infección masiva por *Mycobacterium avium - intracelulare* en un caso de SIDA. ZN 160 X.

la presencia de bacilos libres entre el colágeno, en las células adiposas, o superpuestos, es un artificio y no una situación tisular real.

TECNICA RECOMENDADA

I. REACTIVOS

1. Fucsina carbólica:

Fucsina básica	1 gramo
Alcohol absoluto	10 ml
Fenol al 5% en agua destilada	100 ml

Disuelva la fucsina básica en los 10 ml de alcohol absoluto; luego mezcle con la solución de fenol al 5%.

2. Acido sulfúrico al 5% acuoso:

Acido sulfúrico concentrado	5 ml
Agua destilada	95 ml

Agregue al ácido lentamente sobre el agua destilada.

3. Hematoxilina de Harris:

Solución 1.

Hematoxilina en cristales	4 gramos
Alcohol absoluto	10 ml

Solución 2.

Alumbre de potasio o amonio	80 gramos
Agua destilada	800 ml

Disuelva en agua caliente el alumbre de potasio; cuando esté disuelto agregue la solución 1 y caliente rápidamente hasta ebullición; deje hervir por 2-3 minutos y agregue 2 gramos de óxido rojo de mercurio. Deje enfriar y agregue 32 ml de ácido acético glacial. Filtre antes de usar.

4. Mezcla xilol-petrolato:

Xilol	2 partes
Petrolato*	1 parte

II. PROCEDIMIENTO

1. Cortes de 5 micras.
2. Llevar los cortes al horno, a 60°C durante 30 minutos.
3. Remover la parafina en mezcla xilol-petrolato durante 15 minutos, a temperatura ambiente.

\*El petrolato (Parafina líquida fluida<sup>R</sup> Merck) es parafina líquida a temperatura ambiente. Es una mezcla aceitosa de hidrocarburos líquidos del petróleo, insoluble en agua y alcohol, soluble en benceno, éter, cloroformo y xilol. Se conoce también como aceite mineral blanco, aceite de parafina, aceite mineral (12).



4. Dejar escurrir y secar con papel secante.
5. Colocar los cortes en un bastidor de coloración y filtrar la fucsina carbólica sobre el tejido, inundando la laminilla entera. La fucsina bien preparada da un brillo metálico característico.
6. Calentar la lámina con un mechero hasta que la solución comience a emitir vapores y desaparezca al mismo tiempo su brillo metálico. Evitar la ebullición puesto que el colorante se precipita.
7. Dejar actuar la solución de fucsina carbólica por 20 minutos a temperatura ambiente.
8. Lavar con agua corriente por 5 minutos.
9. Decolorar con ácido sulfúrico al 5% en agua destilada por 4 minutos.
10. Lavar con agua corriente por 5 minutos.
11. Agregar hematoxilina de Harris como colorante de contraste, por 2 minutos.
12. Lavar con agua corriente.
13. Diferenciar con agua amoniacal por 5 segundos.
14. Lavar con agua corriente.
15. Dejar secar a temperatura ambiente y aclarar con dos cambios en xilol.
16. Montar en Permount.

### III. RESULTADOS

B.A.A.R.	Rojos
Células y tejidos	Azules

### SITIOS EN DONDE BUSCAR LOS BACILOS

Los bacilos de Koch y de Hansen son gérmenes intracelulares. Los macrófagos son sus células blanco. No obstante, los bacilos de Hansen deben buscarse en los nervios, en las células Schwann, en los músculos

lisos erectores del pelo, en las células endoteliales, en las células epiteliales del pelo y de las glándulas sudoríparas. Las formas tuberculoides y dimorfas tuberculoides, con alta hipersensibilidad y resistencia del huésped, son paucibacilares y excepcionalmente muestran bacilos en los cortes.

En la TBC pueden verse macrófagos con bacilos en la periferia de las zonas de necrosis caseosa. En los ganglios linfáticos es en donde más difícilmente se demuestran. No debe olvidarse la búsqueda prolongada y paciente con objetivo de inmersión cuando la histopatología así lo sugiere.

### ERRORES MAS FRECUENTES

1. Desparafinar únicamente con xilol las biopsias de paciente con enfermedad de Hansen.
2. Usar fucsinas viejas, mantenidas en jarras de Coplin, que pierden rápidamente su actividad y producen precipitados. Usar fucsinas ácidas para preparar la solución colorante.
3. Usar concentraciones bajas de fenol.
4. Dejar evaporar el alcohol de la solución de fucsina por cierre inadecuado del recipiente.
5. Interpretar como positivos los bacilos que, habiéndose desprendido de lepromas, contaminan otras biopsias.
6. Interpretar como formas granulosas bacilares los gránulos AAR de las glándulas sudoríparas.
7. Disminuir el número de BAAR de las biopsias de lepra por el uso de la mezcla ácido sulfúrico-alcohol absoluto.
8. "Negativizar" las preparaciones por el uso de tiempos prolongados en el alcohol-ácido clorhídrico o por dejar los cortes mucho tiempo en alcohol, antes del montaje.
9. Usar controles de infecciones masivas tuberculosas o por micobacterias atípicas para casos de enfermedad de Hansen.

La técnica histológica es un arte y como tal no todos la pueden realizar con igual habilidad. La coloración de ZN tiene innumerables variantes y la mejor es aquella que dé los resultados satisfactorios para cada laboratorio. Estos resultados se deben juzgar con los casos paucibacilares y no con las infecciones masivas. Para efectos de la Red Nacional de Laboratorios y para comparar resultados, el uso de una técnica estándar por los laboratorios es una situación ideal y que debe propiciarse.

## BIBLIOGRAFIA

1. Luna LG. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. Third Edition. London, McGraw-Hill Book Company, 1960; pp 250.
2. Orozco LC, Ramos O, Moreno I, Blanco E, León C, Naranjo N, Bernal M. Tuberculosis. Manual de Procedimientos. Serie de Publicaciones Científicas No. 1. Bogotá, Instituto Nacional de Salud. 1985.
3. De Goes-Siqueira LF, de Almeida R, Belda W. Comportamiento Tintorial de *Mycobacterium leprae*. Revisao histórica. Rev Saúde Públ, Sao Paulo, 1983; 17: 297.
4. Bishop PJ, Newmann G. The history of the Ziehl-Neelsen Stain. Tubercle (London), 1970; 51: 196.
5. Fite GL. The staining of acid-fast bacilli in paraffin sections. Am J Path. 1938; 14: 491.
6. Faraco J. Bacillus de Hansen e cortes de parafina. Revista Brasileira de Leprologia. 1938; 6: 177.
7. Reyes PA. Modificación a la Técnica de Fite-Faraco para la coloración de bacilos ácido-alcohol-resistentes en cortes de tejidos. Dermatol Rev Mex. 1963; 7: 138.
8. Youmans GP. Tuberculosis. Philadelphia, W B. Saunders Company. 1979; pp 325.
9. Barksdale L, Kim K. Mycobacterium. Bact Rev 1977; 41: 225.
10. Rodríguez G, Martínez M, Morales A, Toro G, Buitrago B. Fiebre amarilla. Manual de Visceratomía. Serie de Notas e Informes Técnicos, No. 10. Instituto Nacional de Salud, Bogotá, 1986.
11. Muñoz-Rivas G. Posibles fenómenos de transformación en Mícobacterias. Rev Invest Salud Pública (México). 1970; 30: 205
12. Stecher P. The Merck Index of Chemicals and Drugs. Seventh Edition Merck and Co., INC., 1960; pp 788.