

LA MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA EN LA INVESTIGACION DEL MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS¹

Dra. Nilda Cafure², Dra. Gladis E. Amadío³, Fernando Centeno⁴, Boris Carpio⁵ y Beatriz Leibovich⁶

Este trabajo tiene por objeto establecer las ventajas de la microscopia de fluorescencia sobre la coloración de Ziehl-Neelsen en la investigación del Mycobacterium tuberculosis.

Las micobacteriáceas son difíciles de teñir al emplear las técnicas que se acostumbran para la coloración de otras bacterias. El método empleado habitualmente es la coloración de Ziehl-Neelsen, que se basa en la tinción en caliente con fucsina fenicada, decoloración con alcohol-ácido y una coloración de contraste.

En 1937, Hageman estableció las ventajas de la microscopia fluorescente en la investigación de bacterias ácido-alcohol resistentes.

Por fluorescencia se entiende la propiedad de ciertos materiales que, al ser irradiados con luz ultravioleta de onda corta invisible, absorben parte de esta y al mismo tiempo la emiten en ondas más largas, visibles. El fluorocromado del *Mycobacterium tuberculosis* mediante la auramina presenta ventajas sobre la coloración de Ziehl-Neelsen, pues la luminosidad propia del bacilo sobre un fondo oscuro facilita su observación en menos tiempo y basta para examinar la preparación mediante objetivos de pequeño aumento.

Material y método

Se estudiaron 653 productos patológicos que provenían de pacientes que consultaron en el Dispensario y Hospital T.C. de Allende, Córdoba, República Argentina. Estas muestras se examinaron al microscopio mediante

la técnica de Ziehl-Neelsen y por la de fluorescencia, y a 283 de ellas se les efectuó cultivo en medio sólido de Loewenstein-Jensen.

Coloración de Ziehl-Neelsen

La coloración se practicó según las normas aconsejadas por la Comisión Argentina de Bacteriología de la Tuberculosis.

Microscopia por fluorescencia

Reactivos

Solución de fenol auramina. Auramina "O", 3 g; fenol p.a., 30 g, y agua destilada, 1,000 cc.

El agua destilada se calienta a 40°C y luego se disuelve en ella el fenol y se le agrega lentamente la auramina "O". Luego se filtra por papel y se conserva en un frasco oscuro, lejos de la luz. (Esta solución se puede conservar durante seis semanas.)

Solución decolorante. Acido clorhídrico concentrado, 20 cc; cloruro de sodio p.a. 20 g; agua destilada, 500 cc, y alcohol 95°, 1,500 cc.

Se disuelve el ácido clorhídrico y el cloruro de sodio en el agua destilada y luego se le añaden los 1,500 cc de alcohol.

Solución de contraste. Permanganato de potasio, 0.500 g, agua destilada, 1,000 cc.

Esta solución se conserva en frasco oscuro.

Técnica

1) Se cubre el frotis durante 10 minutos con la solución de fenol-auramina; 2) se lava con agua corriente; 3) se decolora con

¹ Trabajo realizado por personal del Laboratorio Regional de Bacteriología de la Tuberculosis, Córdoba, Argentina.

² Subjefa del Laboratorio.

³ Jefa del Laboratorio.

^{4, 5, 6} Auxiliares técnicos.

la solución de alcohol-ácido durante cuatro minutos; 4) se lava con agua corriente; 5) se cubre con la solución de contraste, durante 30 segundos, y 6) se lava con agua corriente y se seca al aire (no se use papel de filtro).

Observación microscópica

Los frotis se observan con la luz ultravioleta (filtros B G 12 y U G 1), aumento de 400x y condensador de campo oscuro.

Resultados

Se analizaron los resultados obtenidos con microscopia por fluorescencia y se tomó como método de referencia la coloración de Ziehl-Neelsen y los resultados obtenidos con ambas técnicas de observación microscópica con relación al cultivo.

El cuadro 1 pone de manifiesto que el 87.6% resultó negativo por ambas técnicas y el 7.8% positivo. En otras palabras, en el 95.4% de los casos coincidieron los resultados obtenidos por ambas técnicas, mientras que en los casos en que el resultado fue positivo por una sola de las técnicas empleadas, la microscopia por fluorescencia resultó ligeramente superior.

CUADRO 1—Resultados del examen microscópico por la técnica de Ziehl-Neelsen y por fluorescencia en 635 muestras.

Fluorescencia	Técnica de Ziehl-Neelsen		Total
	(+)	(-)	
(+)	51(7.8) ^a	17(2.6)	68(10.4)
(-)	13(2.0)	572(87.6)	585(89.6)
Total	64(9.8)	589(90.2)	653(100.0)

^a Las cifras entre paréntesis son porcentajes referidos al total general, 653.

CUADRO 2—Resultados del examen microscópico por la técnica de Ziehl-Neelsen y por fluorescencia, y del cultivo en 283 muestras.

Fluorescencia	Cultivo				Total
	(+) (Fluorescencia)		(-) (Fluorescencia)		
	ZN (+)	ZN (-)	ZN (+)	ZN (-)	
(+)	27(9.5) ^a	6(2.1)	1(0.4)	—	34(12.0)
(-)	7(2.5)	34(12.0)	—	208(73.5)	249(88.0)
Total	34(12.0)	40(14.1)	1(0.4)	208	283(100.0)

^a Las cifras entre paréntesis son porcentajes referidos al total general, 283.

El cuadro 2 expresa los resultados obtenidos en las 283 muestras estudiadas por microscopia con Ziehl-Neelsen y fluorescencia y cultivo en Loewenstein-Jensen.

Las tres investigaciones resultaron negativas en el 73.5% de los casos, y positivas en 9.5%.

En el 12.0% de los casos el diagnóstico se realizó solamente por el cultivo, ya que el examen microscópico fue negativo por las técnicas empleadas.

No hubo diferencia significativa entre los resultados del examen microscópico por Ziehl-Neelsen y por fluorescencia en relación con el cultivo.

En el 0.36% de los casos se puso de manifiesto la presencia de gérmenes no viables.

Conclusiones

1) La microscopia por fluorescencia es un método más rápido, pero más caro que la técnica de Ziehl-Neelsen. Por lo tanto sólo se aconseja su empleo en aquellos laboratorios donde la demanda de exámenes microscópicos es elevada, por lo menos del orden de 40 frotis diarios.

2) El cultivo sigue siendo el método más sensible para poner de manifiesto el *Mycobacterium tuberculosis*, cualquiera sea la técnica que se utilice en el examen microscópico.

Resumen

Se hizo un estudio comparativo de la microscopia por las técnicas de Ziehl-Neelsen y de fluorescencia en 653 muestras. Ambas técnicas dieron los mismos resultados

en el 95.4% de los casos, aunque la microscopia por fluorescencia resultó ligeramente superior en los casos en que el resultado fue positivo por una sola de las técnicas empleadas.

En 283 muestras se practicó, además, cultivo en Loewenstein-Jensen. Las tres investigaciones resultaron negativas en el

73.5% de los casos y positivas en 9.5%. En el 12.0% de los casos el diagnóstico se realizó por cultivo, ya que el examen microscópico fue negativo por las dos técnicas empleadas. No hubo diferencia significativa entre los resultados del examen microscópico por Ziehl-Neelsen y por fluorescencia en relación con el cultivo.

BIBLIOGRAFIA

Augier, J. y R. Parrot. La microscopie ou fluorescence du bacille tuberculeux. *Rev Tuberc* (París) 34(6): 865-884, 1970.

Bozzini, J. P., O. Larghi, H. Lubin, y otros. *Microscopía de fluorescencia en el diagnóstico de enfermedades transmisibles*. Asociación Argentina de Microbiología, Monografía No. 1, 1970.

Ministerio de Bienestar Social. Secretaría de Estado

de Salud Pública. *Normas para los laboratorios de bacteriología de la tuberculosis a nivel intermedio y periféricos. Aconsejadas por la Comisión Argentina de Bacteriología de la Tuberculosis*. Buenos Aires, 1969.

Parrot, R., J. Augier. La microscopie ou fluorescence du bacille tuberculeux. *Rev Tuberc* (París) 34(2): 257-280, 1970.

Fluorescent microscopy in the study of *Mycobacterium tuberculosis* (Summary)

A comparative study of Ziehl-Neelsen and fluorescent microscopy techniques was made using 653 samples. Both techniques gave the same results in 95.4% of the cases, while fluorescent microscopy proved slightly superior in those cases in which only one of the techniques gave positive results.

In addition, Loewenstein-Jensen culture was used in 283 samples. The three studies gave nega-

tive results in 73.5% of the cases and positive results in 9.5%. Diagnosis was made by means of the culture in 12.0% of the cases, since the microscopic examination gave negative results with both techniques. There was no significant difference between the results of the microscopic examination using the Ziehl-Neelsen and the fluorescent techniques in relation to the culture.

A microscopia de fluorescência na pesquisa do *Mycobacterium tuberculosis* (Resumo)

Estudou-se comparativamente em 653 amostras a microscopia pelas técnicas de Ziehl-Neelsen e da fluorescência. Em 95,4% dos casos houve coincidência nos resultados obtidos através das duas técnicas; a microscopia por fluorescência demonstrou-se ligeiramente superior nos casos em que apenas uma das técnicas deu resultado positivo.

Em 283 amostras efetuou-se também a cultura

de Loewenstein-Jensen. As tres pesquisas deram resultado negativo em 73,5% dos casos e positivos em 9,5%. Em 12% dos casos o diagnóstico foi feito por meio de cultura, em vista de ter sido negativo o exame microscópico pelas duas técnicas utilizadas. Não houve diferença significativa entre os resultados do exame microscópico por Ziehl-Neelsen e por fluorescência em relação com a cultura.

La microscopie par fluorescence et l'étude du *Mycobacterium tuberculosis* (Résumé)

Sur 653 échantillons on a procédé à une étude comparative de la microscopie en recourant aux techniques de Ziehl-Neelsen et à la fluorescence. Dans 95,4% des cas, les deux techniques ont donné des résultats identiques tandis que dans les cas où une seule des techniques employées a donné un résultat positif, c'est la microscopie par fluorescence qui l'a emporté de peu.

En outre, on a pratiqué sur 283 échantillons

une culture dans le milieu de Loewenstein-Jensen. Les trois études ont été négatives dans 73,5% des cas et positives dans 9,5%. Dans 12% des cas, le diagnostic a eu lieu par culture, les deux techniques ayant abouti à un examen microscopique négatif. Les résultats de l'examen microscopique effectués à l'aide de la technique de Ziehl-Neelsen et ceux réalisés par fluorescence dans le cadre de la culture n'ont pas révélé de différence significative.