

## **Modificación de la técnica de Ziehl-Neelsen para la detección de micobacterias con la utilización de microondas.**

M.J. ALONSO, M.T. CORCUERA, M. ROLDÁN, A. PICAZO Y F. GÓMEZ.

Servicio de Anatomía Patológica. Centro Nacional de Investigación Clínica y Medicina Preventiva. Instituto de Salud Carlos III. Madrid.

### **SUMMARY.**

*Modified Ziehl-Neelsen method for acid-fast mycobacteria using microwave.*

*Ziehl-Neelsen in Pathology is basically used to detect mycobacteria on biopsy specimens and fine needle aspiration cytologies. With the aim of optimizing the results we have adapted the classical methodology utilized in microbiology making use of microwaves. Fine needle aspiration and biopsy specimens of lymph nodes and a commercial kit for the Ziehl-Neelsen staining in microbiology were used in this study. Acid-alcohol resistant bacilli appear stained in intense red and the remainder structures in blue. This adaptation brings forward simplicity and swiftness, and it can be applied to any laboratory specimen in Pathological Anatomy.*

*Key Words:* Ziehl-Neelsen method. Microwave. Acid-fast mycobacteria.

### **INTRODUCCION**

La tinción de Ziehl-Neelsen para bacilos ácido-alcohol resistentes se basa en la resistencia de estos bacilos a la decoloración con una mezcla de alcohol y ácido clorhídrico previa tinción con fucsina fenicada (1-4). En anatomía patológica, este método se emplea fundamentalmente como tinción diferencial para detectar micobacterias en distintos tejidos y en muestras de punción-aspiración con aguja fina (PAAF). Sin embargo, los resultados obtenidos con distintas modificaciones (5-7) no han sido óptimos. Por esta razón en nuestro laboratorio hemos adaptado la técnica clásica de Ziehl-Neelsen empleada en microbiología, introduciendo la utilización de microondas.

### **MATERIAL Y METODOS**

La técnica se ha puesto a punto sobre frotis de PAAF de ganglio de pacientes VIH positivos y en cortes

de biopsias de ganglio fijadas en formol e incluidas en parafina de pacientes VIH positivos con tuberculosis ganglionar por *Micobacterium avium*.

Se ha empleado un equipo comercial para tinción de Ziehl-Neelsen en microbiología que contiene fucsina fenicada, solución de alcohol-ácido y azul de metileno (Industrias Aulabor, S.A.) y un horno microondas convencional (Balay BAHM 100) con una potencia de 1250 W. El protocolo seguido ha sido el siguiente:

1. Introducir los portaobjetos con las muestras (frotis o cortes de tejido previamente desparafinados y rehidratados) en una cubeta Coplin con 80 ml de fucsina fenicada, de forma que toda la muestra quede inmersa en el colorante.
2. Calentar el horno microondas a máxima potencia durante 40 segundos.
3. Retirar la cubeta Coplin del horno microondas y mantener los portaobjetos en el colorante durante 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Lavar con agua y decolorar los portaobjetos con alcohol-ácido durante 10 segundos.
5. Lavar con agua y contrateñir con azul de metileno durante 1 minuto.
6. Lavar con agua, deshidratar y montar con DPX o similar.

Correspondencia: Dra. María José Alonso. Servicio de Anatomía Patológica. Centro Nacional de Investigación Clínica y Medicina Preventiva. Instituto de Salud Carlos III. c/ Sinesio Delgado, 10. 28029 Madrid.

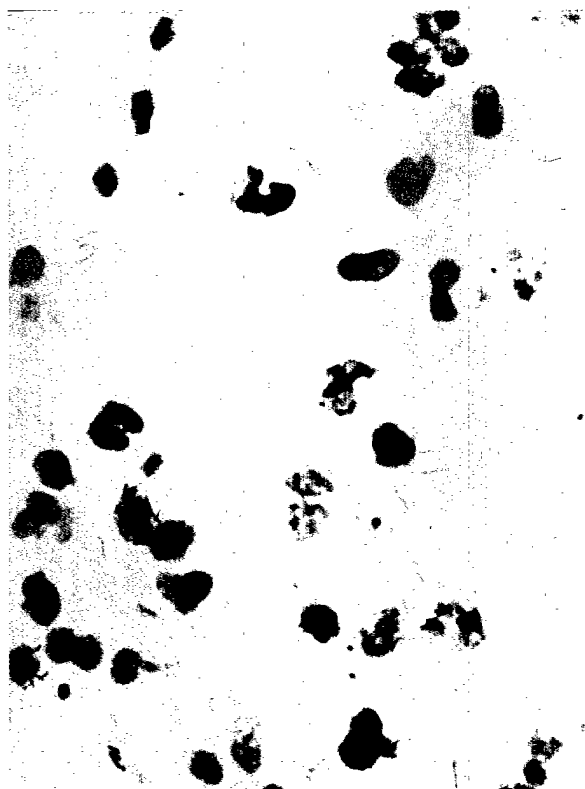


Figura 1.- PAAF de adenopatía cervical con células inflamatorias y abundantes bacilos ácido-alcohol resistentes. Técnica de Ziehl-Neelsen modificada con el empleo de horno microondas.

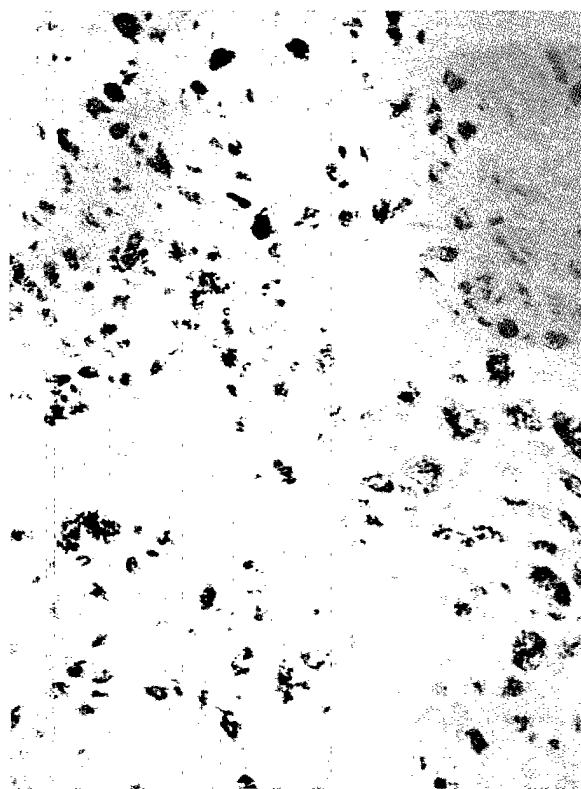


Figura 2. Biopsia de adenopatía abdominal con granulomas histiocitarios. Obsérvese los bacilos en el citoplasma de las células histiocitarias. Técnica de Ziehl-Neelsen modificada con el empleo de microondas.

Paralelamente se han procesado las mismas muestras siguiendo la técnica convencional para Ziehl-Neelsen en anatomía patológica, incubando los portaobjetos con fucsina en estufa a 60 °C durante 30 minutos.

Los bacilos ácido-alcohol resistentes se tiñen de color rojo intenso y el resto de estructuras aparecen de color azul (figs. 1 y 2).

## DISCUSION

Las técnicas de Ziehl-Neelsen utilizadas en microbiología tienen tres variaciones respecto al empleo de la fucsina fenicada (1-4): incubación a temperatura ambiente de 18 a 24 horas, incubación a 90 °C en estufa o baño maría o calentamiento por flameo directo del portaobjetos hasta emisión de vapores. La adaptación de estas técnicas en anatomía patológica (5-7) implican, bien una incubación prolongada a temperatura ambiente, bien calentamiento en estufa a 60 °C durante 30 a 60 minutos. El flameo de los portaobjetos no es aconsejable por la posibilidad de deteriorar las secciones de tejido y provocar alteraciones estructurales en las células. Sin embargo, el empleo de la fucsina fenicada en caliente da mejores resultados, ya que facilita la penetración del colorante en la capa cérea que recubre la pared bacteriana de los bacilos ácido-alcohol resistentes.

En los últimos años se han adaptado varias técnicas en anatomía patológica con empleo de horno microondas, incluyendo tinciones para micobacterias (8), consiguiendo mejorar la calidad de los resultados y un acortamiento en los tiempos de incubación. En este sentido, la modificación de la técnica de Ziehl-Neelsen descrita en este trabajo aporta sencillez y rapidez y permite obtener resultados óptimos, con muy buen contraste entre los bacilos ácido-alcohol resistentes y el resto de las estructuras. Además se mantiene intacta la arquitectura del tejido si se parte de biopsias o de células si se trata de PAAF, por lo que es aplicable a todo tipo de muestras que lleguen al laboratorio de anatomía patológica.

Al comparar los resultados obtenidos con esta técnica y los controles se observa una mayor nitidez en los bacilos y una disminución del fondo en la preparación.

## RESUMEN

La tinción de Ziehl-Neelsen en patología se emplea fundamentalmente para detectar micobacterias en biopsias y muestras de punción aspiración con aguja fina (PAAF). A fin de optimizar los resultados hemos adaptado la técnica clásica empleada en microbiología me-

diante el empleo del horno microondas. Para ello se han utilizado frotis de PAAF y biopsias de ganglio y un equipo comercial para tinción de Ziehl-Neelsen en microbiología. Los bacilos ácido-alcohol resistentes se tiñeron de color rojo intenso y el resto de las estructuras de azul. Esta adaptación aporta sencillez y rapidez y se puede aplicar a cualquier tipo de muestra que llegue al laboratorio de anatomía patológica.

*Palabras clave:* Técnica de Ziehl-Neelsen. Microondas. Bacterias ácido-alcohol resistentes.

## BIBLIOGRAFIA

1. Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. Manual de microbiología médica. México. Manual Moderno S.A. 1965.
2. Burrows W. Tratado de microbiología. Ed 18 Ed. México, Ed Interamericana S.A. 1965.
3. Frobisher M. Microbiología médica. 3ª ed. Barcelona. Salvat Editores S.A. 1964.
4. Balows A, Hausler WJ, Hermann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ. Manual Clinical Microbiology. 5ª ed. Balows A, American Society for Microbiology 1991.
5. Luna LC. Manual histological staining methods of the Armed Forces Institute of pathology. 3ª ed. Blakiston Division McGraw-Hill Book Company 1968.
6. Bancroft JD, Stevens A. Theory and practice of histological techniques. 3ª ed. Churchill Livingstone 1990.
7. García del Moral R. Laboratorio de anatomía patológica. 1ª ed. Editorial Interamericana 1994.
8. Kawatsu K, Izumi S, Yumi M, Butt K, Wang T. Modification of Harada's method for rapid staining of mycobacteria. Nippon-Rai-Gakkai-Zasshi 1992; 61 (3): 175-181.

