

6 LA MICROSCOPIA FLUORESCENTE EN LEPROLOGIA

VALORACION DEL METODO FLUORESCENTE FRENTE AL
ZIEHL-NEELSEN EN EL DIAGNOSTICO BACTERIOLOGICO

DOCTORES MIGUEL A. GONZALES PRENDES

Hospital "San Lazaro," Habana

Y ALBERTO FORS CARBONELL

Cátedra de Bacteriología, Universidad de la Habana

Con la Colaboración de los

PROFESORES VICENTE PARDO-CASTELLÓ

Y ARTURO CURBELO HERNANDEZ

Cátedras de Dermatología y Sifilografía

y Bacteriología

Universidad de la Habana

En el presente trabajo vamos a tratar de la aplicación del método fluorescente a la búsqueda del bacilo de Hansen, en vista de los buenos resultados que había obtenido uno de nosotros en el diagnóstico de laboratorio de la tuberculosis (2).

Fluorescencia es la propiedad que ciertos cuerpos manifiestan, cuando son irradiados, de emitir luz de una longitud de onda diferente de la que reciben, absorben y transforman. Podemos hacer artificialmente fluorescentes a cuerpos que naturalmente no lo son, tratándolos con una substancia, llamada por eso fluorocromo, que los impregna como lo haría un colorante cualquiera; entendiendo que no usamos de dicha substancia la propiedad de impartir color, aunque son de uso común en la práctica los términos "colorar" y "teñir." La auramina, el fluorocromo que usamos, un difenil-metano, de color amarillo, decimos que "colora" los bacilos ácido-alcohol resistentes, cuando en realidad, y sin que aquello sea del todo falso, los hace fluorescentes que es lo que interesa.

El método se funda en la propiedad que tienen los gérmenes ácido-alcohol resistentes de fijar, de un modo selectivo y firme, el auramina. El bacilo así tratado brilla con luz propia de color amarillo pálido, cuando se le ilumina con luz ultravioleta y se destaca sobre el fondo negro de la preparación.

La literatura leproológica acerca del uso del método fluorescente es muy escasa. Los belgas Radna (4) y Dubois y Swerts (1) con berberina, y los norte-americanos Henderson, Spaulding y Gault (3) con auramina O, son los autores que en fechas más ó menos recientes han publicado los ensayos que con este método

han hecho. Los resultados han sido contradictorios, pues mientras los autores belgas señalan que de los trabajos comparativos entre el método clásico de Ziehl-Neelsen y el fluorescente, los resultados no justifican el empleo de la técnica fluorescente en el diagnóstico de la lepra, los norteamericanos advierten que este último método muestra las "globias" y bacilos mas claramente que el método clásico.

EQUIPO Y TECNICA

El microscopio compuesto monocular es satisfactorio. La lámpara se compone esencialmente de un bombillo de proyección de 300 a 500 watts que genera una cantidad pequeña, pero suficiente, de luz ultravioleta. Un filtro azul se coloca directamente frente a la lámpara y otro amarillo, ópticamente complementario, se coloca sobre el ocular del microscopio.

Ensayando distintas fuentes de luz ultravioleta hemos encontrado que la lámpara de arco voltaico produce imágenes muy claras que no dejan lugar a dudas, siendo definitivamente ventajosa sobre el bombillo de filamento. El uso de lámparas de vapor de mercurio es completamente innecesario. Un espejo de aluminio pulido es conveniente, pero no indispensable.

La auramina se prepara diluyéndola primero en alcohol, de acuerdo con las siguientes fórmulas:

Solución A:

Auramina O	0.10 gm.
Alcohol de 95%	10 ml.

Solución B:

Fenol	3 gm.
Agua destilada	87 ml.

Mezclense las soluciones A y B.

La fórmula del alcohol ácido es la siguiente:

Alcohol 70%	100 ml.
CINa	0.5 gm.
CIH concentrado	0.5 ml.

La técnica para frotis es como sigue:

1. Se fija la extensión al calor como de costumbre.
2. Hacer actuar la solución de auramina, a temperatura ambiente, por 2 minutos.
3. Lavar con agua.
4. Lavar con el alcohol ácido dejándolo actuar 2 minutos; entonces se renueva el alcohol y se deja actuar por otros 2 minutos.
5. Lavar con agua.
6. Se hace actuar de 3 á 5 segundos el azul de Loeffler. Esto tiene por objeto eliminar las fluorescencias primarias de los elementos no bacterianos del frotis.
7. Lavar, secar y examinar.

OBSERVACIONES PERSONALES

El material de estudio procede de enfermos reclusos en el Hospital "San Lazaro" y de algunos casos que son tratados en

el Servicio de Enfermedades de la Piel del Hospital Universitario. Para nuestras observaciones iniciales escogimos 100 casos de lepra lepromatosa, entre los cuales había algunos con mas de tres años de tratamiento por las sulfonas, otros con menos tiempo y otros que nunca habían recibido tratamiento alguno. En todos los casos obtuvimos muestras gemelas, para realizar el método de Ziehl-Neelsen en una y el fluorescente en la otra.¹

Al inicio la labor es árdua debido a la completa oscuridad del campo microscópico, sin un punto de referencia para precisar el foco. Para facilitarla señalamos con un trazo del lapiz de cera una zona cuadrangular que abarca la extensión de la muestra examinada, utilizando el trazo en cada recorrido del campo como marca para conocer nuestra posición. Rápidamente nos habituamos a recorrer la preparación con el objetivo seco de menor aumento (X10), usando el mayor aumento seco (X43) en cuanto un punto luminoso nos muestra la presencia de partículas fluorescentes.

El mayor aumento seco es suficiente para identificar los gránulos, bacilos y globias de las lesiones hansenianas. Reservamos el objetivo de inmersión para ver de un modo mas claro y diáfano las partículas examinadas, sean gránulos o bacilos.

La impresión que recibe quien por vez primera examina una preparación fluorescente es extremadamente favorable. Cuando hay bacilos y gránulos hansenianos, podemos comparar ese campo con el firmamento, cuando de noche elevamos los ojos hacia él y vemos pocas, algunas o muchas estrellas.

La preparación puede recorrerse con rapidez, despues de alguna práctica, dentro del trazo del lapiz de cera, sin que quede parte alguna de la extensión sin examinar, pues en la oscuridad del fondo enseguida se destacará con brillo característico cualquier gránulo o cuerpo bacilar que haya tomado la auramina.

En nuestros estudios hemos encontrado el método fluorescente superior al clásico de Ziehl por las razones siguientes:

1. Técnica de coloración mas rápida y fácil. No es necesario calentar el colorante.
2. No es necesario usar el objetivo de inmersión en aceite.
3. Mayor rapidez en el examen de las muestras.
4. Mayor contraste de las partículas brillantes contra fondo negro.
5. Investigación mas minuciosa. Menos errores de diagnóstico. Cuando la investigación se hace, como es lo corriente, con el objetivo seco de mayor aumento, la sensibilidad del

¹ Las observaciones por el Ziehl fueron hechas en el propio Hospital "San Lázaro" por el jefe de laboratorio de allí, Dr. E. Guilarte, el cual, conecedor de la comparación a que iban a someterse los resultados, las verificó con el mayor empeño y cuidado. Las observaciones por el método fluorescente se hicieron en la Sección Experimental de la Cátedra de Bacteriología de la Universidad de la Habana.

método aumenta en proporción de 6:1, sobre el clásico Ziehl-Neelsen.

6. Se ven mayor número de bacilos en preparaciones gemelas observadas por la misma combinación de lentes.

En la casi totalidad de nuestros casos se obtuvieron tres muestras duplicadas de cada uno. De exudado nasal, linfa auricular y raspado de lesiones cutáneas. De los 100 casos estudiados fueron negativos por el Ziehl 70, mientras solo 25 fueron por la auramina. Los positivos están divididos en débilmente, medianamente e intensamente positivos. Débilmente positivos (1+): al Ziehl, 18 casos; a la auramina, 42. El criterio de positividad se ha apoyado en la presencia de gránulos solamente en 15 casos. Medianamente positivos (2+): al Ziehl, 9 casos; a la auramina, 17 casos. Intensamente positivos (3+): al Ziehl, 3 casos; a la auramina, 16 casos. Los individuos que hemos señalado como débilmente positivos a la auramina corresponden a otros tantos casos de lepra lepromatosa clínicamente, con biopsia positiva y Mitsuda negativo.

	Ziehl-Neelsen	Fluorescencia
Negativos	70	25
Positivos, 1+	18	42 ^a
Positivos, 2+	9	17
Positivos, 3+	3	16

^a Granulos, 15; bacilos, 10; ambos, 17.

En las preparaciones tratadas con auramina, no solo hemos comprobado que se ven los bacilos con mayor claridad, como señalan Henderson y sus colaboradores (3), sino también mayor número de bacilos, en preparaciones gemelas examinadas con la misma combinación de objetivo y ocular. ¿Será-nos preguntamos, que la propiedad bacilar de tomar el colorante de Ziehl-Neelsen se inhibe o se pierde por el uso prolongado de las sulfonas, como ya han señalado algunos autores? (6).

Uno de los problemas que ha sido debatido por muchos leprologos es el valor diagnóstico de los gránulos que a veces se advierten en las preparaciones coloreadas (5). En nuestros casos hubo 15 en los cuales hemos sustentado el criterio de positividad por la presencia de gránulos solamente, sin formas bacilares. Estos han sido clasificados entre los débilmente positivos. Hacemos hincapié sobre este hecho porque conocemos que las opiniones a este respecto se encuentran divididas. Los gránulos en la técnica de Ziehl-Neelsen, por lo general, no son tenidos en cuenta para el diagnóstico de un caso, a pesar de

verse muchas veces con bastante claridad, aunque muchas veces acompañados de bacilos que son los que producen el dictámen.

En las preparaciones hechas por el método fluorescente los gránulos se destacan con tal claridad que son inconfundibles, y no han aparecido jamás en preparaciones de control que hemos estudiado con linfa y exudado de individuos sanos que nunca habían tenido contacto con enfermos de lepra. También estudiamos preparaciones de control hechas con material procedente de contactos sanos, sin que aparecieran gránulos. Estos gránulos, por diversas razones, en el microscopio fluorescente son inconfundibles, no existiendo tipo de artefacto alguno que se les parezca. Es indudable que en un número de preparaciones, cuando el material no se extiende correctamente en capa delgada, aparecen algunos cuerpos brillantes de tamaño y formas distintos lo cual puede deberse a fluorescencia natural o artificial. Ellos no pueden considerarse verdaderos artefactos, porque no dan lugar a confusión ni con bacilos, ni con gránulos, ya que la forma, el tamaño, la intensidad, el tono y el color de la luz emitida por el bacilo o gránulo impregnado por auramina es de una tipicidad inconfundible. No hay duda que un cierto grado de experiencia es necesario, como lo es en cualquier otro método.

CONCLUSIONES

1. Hemos hecho un estudio comparativo del método fluorescente frente al clásico de Ziehl-Neelsen, en el diagnóstico de la lepra.
2. Este trabajo se ha llevado a cabo en 100 casos y en distintos productos patológicos: linfa auricular, exudado nasal y raspado de lesiones cutáneas.
3. Los estudios microscópicos con ambos métodos han sido realizados en lugares distintos, procurando evitar el prejuicio en el dictamen.
4. De la totalidad de los casos hemos obtenido un 75 por ciento positivos por la técnica fluorescente, frente a un 30 por ciento por la técnica clásica de Ziehl-Neelsen.
5. Practicada la técnica fluorescente con la escrupulosidad y cuidado que debe ponerse en todo trabajo de microscopía, carece casi por completo de fuentes de error.

ABSTRACT

The authors report their findings in 100 cases of leprosy, duplicate smears of which were examined after Ziehl-Neelsen staining and by the fluorescence method with auramin O, the technique of which is given in

detail. In total, the latter method gave positive results in 75% of the cases, while the former gave only 30% positives. Among the 42 cases weakly positive (1+) with auramin, there were 15 in which only granules were found, but it is pointed out that—contrary to the case with Ziehl-Neelsen—the appearance of such bodies is characteristic and not to be confused with other things.

BIBLIOGRAFIA

1. DUBOIS, A. y SWERTS, L. L'emploi du microscope a fluorescence dans la diagnostique de la lèpre. *Ann Soc. belge Med. Trop.* **30** (1950) 1473-1476.
2. FORS CARBONELL, A. La microscopía fluorescente. *Rev. cubana Lab. Clín.* **6** (1952) 400-447.
3. HENDERSON, H. J., SPAULDING, E. H. and GAULT, E. S. Demonstration of globi and leprosy bacilli by fluorescence microscopy. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* **50** (1942) 91-92.
4. RADNA, R. La microscopie de fluorescence comme mode de recherche du bacille de la lepre et des trypanosomes. *Ann. Soc. belge Med. Trop.* **28** (1938) 623-628.
5. ROTBERG, A. y BECHELLI, L. M. *Tratado de Leprología y Patología.* Rio de Janeiro: Serviço Nacional de Lepra, 1950, pp. 183 y sigs.
6. WILKINSON, F. F. Modificación a la técnica de Ziehl-Neelsen en las baciloscopías de los enfermos de lepra tratados con sulfonas. *Internat. J. Leprosy* **19** (1951) 195-198.