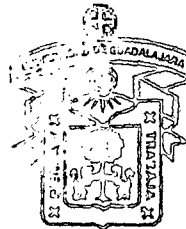


UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

CUCEBA



BIBLIOTECA CENTRAL

" ESTANDARIZACION DE LAS TECNICAS DE COLORACION DE ZIEHL NEELSEN Y FITE FARACO EN EL LABORATORIO DE PATOLOGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, PARA EL DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS."

TESIS PROFESIONAL  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

PRESENTA

ANDRES VIDALES CHAVIRA

ASENSOR:

M.V.Z. RAUL LEONEL DE CERVANTES MIRELES

GUADALAJARA, JALISCO.

1987.

CUCBA

INDICE



BIBLIOTECA CENTRAL

PAG.

INTRODUCCION.....	1
OBJETIVOS.....	11
JUSTIFICACIONES.....	13
MATERIAL Y METODOS.....	15
RESULTADOS.....	28
DISCUSION.....	37
CONCLUSIONES.....	41
SUMARIO O RESUMEN.....	44
BIBLIOGRAFIA.....	45

## ANTECEDENTES HISTORICOS

En el año de 1882 fue identificado microscópicamente mediante coloraciones específicas en lesiones tisulares el mycobacterium tuberculosis, agente que produce dicha enfermedad, de igual manera fue cultivado artificialmente en suero coagulado por el médico bacteriólogo alemán Roberto Koch, creó las bases para la obtención de la vacuna contra la Tuberculosis, esfuerzo que le valieron el otorgamiento del Galardón conocido como Premio Nobel en Medicina y Fisiología en el año de 1905. (4, 6, 12)

## FRECUENCIA DE LA ENFERMEDAD

Todo el ganado de pastoreo es susceptible de padecer la tuberculosis, el hacinamiento favorece la diseminación de la enfermedad estableciéndose en el hato, particularmente cuando hay un manejo inadecuado del ganado para el consumo de carne.

Geográficamente la distribución de la tuberculosis es universal y su erradicación se logra a base de programas sanitarios bien aplicados y controlados. En algunos países --

donde no han sido instituidos este tipo de programa la incidencia de la tuberculosis llega a ser del 18% para todo tipo de ganado. (4, 6, 12)

#### ETIOLOGIA

La tuberculosis bovina es causada casi siempre -- por el mycobacterium tuberculosis de la variedad "Bovis". -- Sin embargo algunas infecciones en el ganado son causados -- por la clase humana y aviar. (4, 6, 7)

#### CARACTERISTICAS GENERALES

Este microorganismo pleomórfico es de forma de -- bastón, delgado y curvo con un tamaño que varia de 1.5 a 4 - micras de longitud y un espesor de 0.2 a 0.6 micras. Es aeróbico, no tiene motilidad y no forma esporas. (4, 6)

#### CARACTERISTICAS DE COLORACION

A la tinción es Gram positivo y es alcohol ácido resistente, es decir que tiene la particularidad de resistir la decoloración ulterior a la coloración que provoca el alco

hol y los ácidos inorgánicos, de donde parte el nombre de -- que los bacilos de la tuberculosis sean alcohol ácido resistentes ( B.A.A.R. ).

Debido a su alto contenido en lípidos no se tiñen con los colorantes bacteriológicos habituales, en cambio sí se tiñen con los colorantes carbolados ( Carbol-Fucsina ) mediante el empleo de calor.

La propiedad de ser ácido resistente o alcohol -- ácido resistente puede depender de la presencia en la bacteria del ácido micólico.

En ocasiones en los cultivos o en lesiones viejas los gérmenes tienen un aspecto punteado o granular, conociéndose como Granulos de Much, generalmente ésto indica un estado de degeneración del microorganismo, puede demostrarse también por Microscopía de Fluorecencia cuando se tiñe con un colorante fluorecente como la Auramina.

Fuera de los tejidos animales este microorganismo tiene una resistencia variable a los agentes bacteriológicos.

Cuando es expuesto a la luz solar es destruido en dos horas. Con los jabones se destruyen. En la leche calentada a 70°C. se mueren en cinco minutos.

En cambio en los medios secos como el polvo, los exudados y las descargas diarreicas no expuestas a la luz solar el microorganismo puede resistir vivo por varios meses.

Abundando en la composición química del mycobacterium tuberculosis se sabe que el alto contenido lipídico que incluye grasas neutras, fosfátidos y ceras de cadenas largas, en particular los ácidos micólicos confieren su poder ácido resistente, su virulencia y particularmente su capacidad de reacción a los colorantes de Carbol Fucsina (Ziehl Neelsen), de tal forma que a mayor contenido lipídico, mayor virulencia y mayor intensidad de coloración. (1, 4, 6, 7)

#### TRANSMISION

El ganado susceptible, usualmente adquiere la infección del medio ambiente, los animales infectados excretan el bacilo tuberculoso en el esputo arrojado por la tos y las mucosas del epitelio bronquial y glándulas salivales, así como el flujo nasal.

El ganado susceptible puede adquirir la enfermedad por inhalación o por la ingestión de comida o agua contaminada por el esputo, la saliva, la leche o la orina del agente infeccioso.

Por otra parte el ganado puede llegar a infectarse ya sea por humanos tuberculosos o bien por la exposición a las excretas o secreciones de la gente o bien por aguas de albañal o negras.

El ganado fetal puede adquirir la tuberculosis a través de la vena umbilical o por infección uterina.

Es raro que la tuberculosis en los genitales sea transferida mecánicamente durante el coito.

Ocasionalmente los instrumentos contaminados con el bacilo tuberculoso pueden de manera inadvertida inocular animales susceptibles al tiempo de la cirugía. (4, 6, 7)

#### PATOGENESIS

Las terneras pueden adquirir la tuberculosis por

consumir leche de vaca afectada de tuberculosis a través de la ubre. En este evento los bacilos tuberculosos son ingeridos con la leche y pasan dentro del intestino, en el iléon y el intestino grueso, el bacilo penetra en la mucosa y entra a los linfáticos, conduciéndose después a los nódulos linfáticos y estos a su vez a los nódulos linfáticos mesentéricos.

Si bien muchos bacilos son retenidos en los ganglios linfáticos algunos pasan dentro del canal linfático -- aferente y por vía del conducto torácico entran a la sangre venosa la cual desemboca dentro de los pulmones pudiendo originar tuberculos tanto en los ganglios linfáticos como en -- los pulmones. Las terneras también pueden infectarse de tuberculosis por la inhalación del bacilo. En algunos casos la infección puede ser adquirida a través del sistema digestivo.

El complejo primario o lesión primaria es la combinación de un tuberculo (Lesión macroscópica que no excede de 1 mm.), y la adenopatía regional, llamado también complejo de Ghon.

Histológicamente los eventos que ocurren una vez que el microorganismo penetra a los espacios tisulares es el



de una acumulación de neutrófilos alrededor del bacilo, después de un corto período los neutrófilos entran en necrosis y los macrófagos o histiocitos se transforman en células gigantes del tipo Langhans para facilitar la fagocitosis de dicho microorganismo rodeándolo a los elementos anteriores aparecen numerosos linfocitos y fibras de tejido conectivo fibroso intentando formar un tabique de contención a la lesión causada, con frecuencia el centro de la lesión contiene focos de necrosis caseosa.

Algunos bacilos tuberculosos escapan de la lesión original y entran al sistema linfático diseminándose a través de los vasos o conductos linfáticos a la subpleura y al subperitoneo formando tuberculos los cuales se proyectan sobre la superficie serosa causando pleuritis crónica tuberculosa o enfermedad de Pearl y peritonitis crónica tuberculosa.

En algunas ocasiones la lesión inicial erosiona dentro de los bronquiolos o bronquios, en este evento los bacilos virulentos entran dentro del lumen de los bronquios.

De aquí ellos pueden ser inhalados dentro de muchos alveolos y producir Neumonía Tuberculosa.

La infección sea primaria o secundaria puede erosionar los vasos sanguíneos especialmente las venas y penetrar al organismo, esto crea una bacteremia y causa una diseminación hematogena del bacilo, por éste medio pueden ser establecidos nuevos focos de infección en cualquier parte del organismo.

El metabolismo del bacilo tuberculoso produce una proteína específica extraña al huésped produciendo sensibilización de los tejidos a esta proteína. (4, 6, 7, 10)

#### SIGNOS CLINICOS Y LESIONES POSTMORTEM

La tuberculosis es a menudo una enfermedad de desarrollo lento y que produce signos clínicos poco manifiestos sin embargo muchos animales infectados pierden peso corporal de manera lenta pero continúa a pesar de tener una adecuada dieta.

La tos profunda es persistente y puede tornarse - dolorosa, originando en algunos casos Neumonía Tuberculosa.

El curso de la enfermedad usualmente se prolonga

por muchos meses y algunas veces por años, en algunos casos - la diseminación hematógica conduce a la muerte en poco tiempo

Es conocido que la tasa de morbilidad por tuberculosis son altos en los países donde no se han instituido -- programas de erradicación, produciendo un alto índice de mortalidad en estos animales. Independientemente de la localización anatómica, la tuberculosis posee muchas características en común, uno de ellos es la formación de tuberculos o la formación de una tuberculosis generalizada o miliar.

Los tubérculos jóvenes pueden medir 1 mm. en cambio los viejos 10 cms. o más, en los tubérculos de crecimiento activo los bacilos ácido resistente son discernibles o identificables mientras que en los tubérculos inactivos o estáticos pueden ser escasos, en éstos últimos es factible encontrar zonas de calcificación distrófica.

Aparte de los pulmones otros órganos pueden ser -- afectados tales como el bazo, el peritoneo, los riñones, el sistema nervioso central incluyendo las meninges, así como órganos genitales como el útero, ovario, testículos, pene, vulva y vagina. Otros sitios de ataque son los músculos, las fa-

cias intermusculares, los huesos y las articulaciones.  
(4, 6, 7)

#### DIAGNOSTICO

La tuberculosis bovina puede ser diagnosticada en animales vivos sobre la base de los signos clínicos de la - - reacción tuberculínica y la demostración de bacilos tuberculosos en las secreciones y/o excreciones.

El diagnóstico en animales muertos está basado en la demostración de bacilos tuberculosos en las lesiones típicas.

Aunque es recomendable que antes del sacrificio de un animal para el consumo humano se diagnostique mediante la reacción de la tuberculina ya sea por vía oftálmica, subcutánea o intradérmica, la tuberculina utilizada se denomina - - P.P.D. (Proteína Purificada Derivada). La reacción positiva - se considera la producción de un exudado inflamatorio dentro de las 4-6 horas siguientes a su aplicación. (4, 6, 7)

OBJETIVOS

- I.- Identificación microscópica del mycobacterium tuberculosis en lesiones tisulares de bovinos mediante la aplicación de las técnicas de coloración de ZIEHL NEELSEN y FITE FARACO.
- II.- Establecer la relación que existe entre la positividad de las reacciones y las manifestaciones anatomopatológicas de los órganos.
- III.- Evaluar comparativamente las ventajas y desventajas de cada una de las técnicas de coloración.
- IV.- Estandarizar las técnicas de coloración de ZIEHL NEELSEN y FITE FARACO para la identificación del mycobacterium tuberculosis, de tal forma que estas representen un acervo en los recursos, diagnóstico del laboratorio de patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de Guadalajara.
- V.- Con las modificaciones hechas a las técnicas de ZIEHL NEELSEN y FITE FARACO, poder realizarlas ordinariamente

en el laboratorio con el mismo tiempo y tan sencillo co  
mo la de Hematoxilina y Eosina.

VI.- Establecer el número de estudios examinados durante la  
estandarización de dichas técnicas, así como las lesio-  
nes granulomatosas.

## JUSTIFICACIONES

- 1.- El único método confiable para el diagnóstico de la tuberculosis es la demostración del bacilo que la produce (*Mycobacterium tuberculosis*), mediante la coloración del mismo en cortes histológicos procedentes de las lesiones sospechosas.

Respecto de la coloración a lo largo del tiempo, se han producido muchas técnicas de diferentes autores, unas que requieren de reactivos difíciles de encontrar en el Mercado Nacional, otras son demasiado largas y elaboradas y por lo tanto se requieren de bastante tiempo para su ejecución, con lo anterior nos referimos al examen de microscopia de fluorescencia en donde obviamente se requiere del microscopio de fluorescencia y de colorantes susceptibles de absorber la luz de cierta longitud de onda y emitir luz de longitud de onda diferente, como el caso del Anaranjado de Acridina, por lo tanto se suplirán este tipo de colorantes fluorescentes por otros que permitan identificar al bacilo de la tuberculosis sin la necesidad del equipo de fluorescencia, que generalmente son de importación. Por lo que a partir de técnicas ya conocidas elimina todos los inconvenientes antes señalados se procu

rará obtener una técnica de fácil y rápida ejecución con los reactivos más económicos y disponibles en la localidad, para que así el laboratorio de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de Guadalajara cuente con este procedimiento técnico como un recurso más para el diagnóstico histopatológico fácil y rápido de la Tuberculosis. (1, 2, 3, 8, 11)

2.- Dada la alta frecuencia de tuberculosis bovina en los países Latinoamericanos que aparece en la literatura extranjera es importante conocer la incidencia de esta enfermedad en nuestro medio, a partir de muestras obtenidas de animales sacrificados para consumo humano en el Rastro Municipal. (5, 9, 12)



## MATERIAL Y METODOS

- 1.- Se procedió a la recolección de muestras tisulares de ganado bovino sacrificado en el rastro, que presentaron alteraciones o lesiones macroscópicas sugestivas de tuberculosis.
- 2.- Se fijaron los especímenes con el objeto de preservar su histoarquitectura y facilitar su preparación histológica posterior. (1, 2, 3, 8, 10)
- 3.- Dentro del laboratorio de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y con los recursos propios de la misma se procedió a la elaboración de cortes histológicos y a la aplicación de las técnicas de coloración de Ziehl Neelsen y Fite Faraco con el objeto de establecer la forma de preparación de los reactivos y los tiempos de coloración óptimos para obtener o lograr los mejores resultados utilizando siempre "Controles Testigos Positivos y Negativos". Todo lo anterior representa la estandarización del método para la identificación del bacilo tuberculoso.
- 4.- Tinción de Ziehl Neelsen.

METODO

Fijador, formol neutro amortiguado.

- 4.1.- Cortes en parafina de 6 micras.
- 4.2.- Desparafinar e hidratar hasta agua destilada.
- 4.3.- Solución "A" (Carbol Fucsina), 30 minutos.
- 4.4.- Lavar bien en agua corriente.
- 4.5.- Decolorar, con una solución de alcohol ácido o solución de ácido sulfúrico, hasta que los cortes tomen un color rosa pálido.
- 4.6.- Lavar en agua corriente durante 8 minutos.
- 4.7.- Sumergir una laminilla a la vez con la solución de trabajo en Azul de Metileno.
- 4.8.- Lavar en agua corriente y después en agua destilada.
- 4.9.- Deshidratar en alcohol de 95 %, alcohol absoluto y --

Xileno, dos cambios en cada uno.

4.10.- Montar en resina sintética.

RESULTADOS:

- BACILOS ACIDOS RESISTENTES - Rojo Brillante.
- ERITROCITOS - Amarillo Anaranjado.
- OTROS ELEMENTOS TISULARES - Azul claro. (8)

5.- Preparación de los reactivos.

CARBOL FUCSINA

Alcohol Absoluto..... 5.0 ml.  
Fucsina Básica..... 0.5 gm.  
Agua Destilada.....50.0 ml.  
Fenol (cristales)..... 2.5 grs.

ALCOHOL ACIDO 1%

Alcohol al 70 %..... 1000.0 ml.  
Acido Clorhídrico Con-  
centrado..... 10.0 ml.

ACIDO SULFURICO 1%

Acido Sulfúrico Concentrado.. 1.0 ml.  
Agua Destilada.....100.0 ml.

. AZUL DE METILENO (Madre).

Azul de Metileno..... 1.4 gm.  
Alcohol 95%.....100.0 ml.

AZUL DE METILENO (Trabajo).

Solución Madre Azul de  
Metileno..... 10.0 ml.  
Agua Destilada..... 90.0 ml. (8)

6.- Modificación de la técnica de Ziehl Neelsen.

TECNICA ESTANDARIZADA

Fijador, formol Neutro Amortiguado.

6.1.- Cortes en parafina de 5 micras.

6.2.- Desparafinar e hidratar.

6.3.- Solución "A" (Carbol Fucsina), 10 minutos a 80°C.

6.4.- Lavar en agua corriente durante dos minutos.

6.5.- Decolorar en solución "B" (Alcohol ácido), 30 segundos.

6.6.- Lavar en agua corriente durante dos minutos.

6.7.- Contrastar con Azul de Metileno o Verde Luz durante 15-  
30 segundos.

6.8.- Lavar en agua corriente durante dos minutos.

6.9.- Deshidratar en alcohol de 95%, Alcohol Absoluto y Xile-  
no, dos cambios en cada uno.

6.10.- Montar en resina sintética.

RESULTADOS:

- BACILOS ACIDOS RESISTENTES - Rojo brillante.

- ERITROCITOS - Amarillo Anaranjado.

OTROS ELEMENTOS TISULARES - Azul Claro o Verde. según el contraste utilizado.

7.- Preparación de los reactivos.

SOLUCION "A" CARBOL FUCSINA

Alcohol absoluto.....	5.0 ml.
Fucsina Básica.....	0.5 grs.
Agua destilada.....	50.0 ml.
Fenol (cristales).....	250.0 mgs.

SOLUCION "B" ALCOHOL ACIDO AL 3%

Alcohol al 70%.....	97.0 ml.
Acido Clorhídrico concentrado.....	3.0 ml.

SOLUCION "C" COLORANTE DE CONTRASTE

Verde Luz.....	0.5 gm.
Agua destilada.....	100.0 ml.
Acido acético.....	0.2 ml.

AZUL DE METILENO (MADRE)

Azul de Metileno.....	1.4 mg.
Alcohol de 96 %.....	100.0 ml.

AZUL DE METILENO (TRABAJO)

Solución Madre, Azul de Metileno.....	10.0 ml.
Agua destilada.....	90.0 ml.

8.- Tinción de Fite Faraco.

M E T O D O

- 8.1.- Se quita la parafina de los cortes con una mezcla de 2 volúmenes de trementina refinada y 1 volumen de aceite de parafina viscoso, 2 baños cada uno de dos y medio minutos.
- 8.2.- Se ocurre, se quita la parafina de los bordes y se seca con papel hasta aspecto opaco; se deja en agua algunos minutos.
- 8.3.- Se tiñe de 6 a 24 horas (o más tiempo, por ejemplo de 18-24 horas para bacilos viejos mal preservados), a temperatura ambiente en Carbol Fucsina nueva.  
(0.5 gr. de Fucsina nueva disuelto en 10 ml. de alcohol y mezclados con una solución de 5 grs. de cristales de fenol fundidos en 100 ml. de agua destilada).
- 8.4.- Se lava con agua, luego se coloca durante 5 minutos en formol de 37-40 % grado reactivo. Esto permite que los bacilos tomen un color azul permanente debido a la reacción Fucsina-Aldehído.
- 8.5.- Se lava con agua.
- 8.6.- Se decolora, un minuto en  $H_2SO_4$  al 5 por 100 en agua.
- 8.7.- Se lava con agua de la llave durante 5 minutos.



- 8.8.- Se deja 3 minutos en  $KMNO_4$  al uno por 100.
- 8.9.- Se lava con agua de la llave.
- 8.10.- Se blanquea durante 30 segundos a un minuto en ácido Oxálico al 2%.
- 8.11.- Se lava de 5-10 minutos con agua de la llave corriente.
- 8.12.- Se tiñe durante 3 minutos con Van Gienson diluido - -  
(Fucsina ácida, 0.01 gr. más 1 gr. de ácido picrico en  
100 ml. de agua destilada).
- 8.13.- Sin lavar, se deshidrata rápidamente con alcohol al --  
95% y alcohol absoluto; se aclara en Xileno y se monta

RESULTADOS:

- BACILOS ACIDOS RESISTENTES - Azul intenso a azul negro.
- COLAGENAS - Rojas.
- OTROS ELEMENTOS - Amarillos. (8, 10)

9.- Modificación de la Técnica de Fite Faraco.

M E T O D O

9.1.- Desparafinar los cortes con 2 volúmenes de trementina - refinada y un volumen de aceite de parafina, 2 baños en diferentes recipientes de 3 minutos en cada uno.

9.2.- Se escurre, se elimina la parafina de los bordes y se seca con papel filtro, se deja en agua algunos minutos.

9.3.- Se tiñe con la solución "A" de Carbol Fucsina de 6-24 horas (éste método es útil para bacilos mal preservados o viejos).

NOTA: El tiempo en este paso se acorta si se emplea calor (37 - 40°C.). (Misma forma de preparar que en Ziehl Neelsen).

9.4.- Se lava en agua corriente y se coloca en formol concentrado por 5 minutos. (Este paso permite que los bacilos tomen un color azul permanente debido a la reacción Fucsina - Aldehído).

9.5.- Se lava con agua corriente durante 3 minutos.

9.6.- Se decolora, un minuto en agua ácida al 1% (Acido Clorhídrico).

9.7.- Se lava con agua corriente durante 5 minutos.

- 9.8.- Se deja en manganeso de potasio al 1% durante 3 minutos.
- 9.9.- Se lava en agua corriente durante 3 minutos.
- 9.10.- Se blanquea con ácido oxálico al 2% durante 30 segundos.
- 9.11.- Se lava en agua corriente durante 5 minutos.
- 9.12.- Se tiñe o se contrasta en Van Gieson diluido (Fucsina Ácida 0.01 más 1 gr. de ácido picrico en 100 ml. de agua destilada).
- 9.13.- Sin lavar se deshidrata, se aclara y se monta.

RESULTADOS:

- BACILOS ACIDOS RESISTENTES - Azul intenso o azul negro.
- COLAGENA - Roja.
- OTROS ELEMENTOS TISULARES - Amarillos.

10.- Técnica Estandarizada de Fite Faraco.

M E T O D O

10.1.- Desparafinizar los cortes en una mezcla de xilol y - -  
aceite de oliva en dos cambios de 5 minutos.

10.2.- Escurrir y secar con papel filtro.

10.3.- Lavar en agua corriente durante 5 minutos.

10.4.- Teñir en solución de Fenol Fucsina durante 10 minutos  
a 80°C.

10.5.- Lavar en agua corriente durante dos minutos.

10.6.- Decolorar en solución acuosa de ácido sulfúrico de 2 a  
5 minutos procurando que las laminillas tomen un color  
rosa pálido.

10.7.- Lavar en agua corriente durante 5 minutos.

10.8.- Contrastar con Azul de Metileno durante 30 segundos.

10.9.- Secar las laminillas con papel filtro.

10.10.-Montar en resina.

RESULTADOS:

- BACILOS ACIDO RESISTENTES - Rojo Brillante.

- TEJIDO CONJUNTIVO - Azul.

11.- Preparación de los reactivos.

XILOL ACEITE DE OLIVO

Aceite de olivo.....	1 parte.
Xilol.....	2 partes.

SOLUCION FENOL Y FUCSINA

Alcohol absoluto.....	5.0 ml.
Fucsina Básica.....	0.5 gr.
Agua destilada.....	50.0 ml.
Fenol (cristales).....	250.0 mgs.

ACIDO SULFURICO 5%

Acido Sulfúrico concentrado.....	5.0 cc.
Agua destilada.....	95.0 cc.

AZUL DE METILENO (MADRE)

Azul de Metileno.....	1.4 mg.
Alcohol de 96%.....	100.0 ml.

AZUL DE METILENO (TRABAJO)

Solución Madre, Azul de Metileno.....	10.0 ml.
Agua destilada.....	90.0 ml.

## RESULTADOS

### NUMERO DE ESTUDIOS REALIZADOS

Se analizaron 12 casos de tejido proveniente de ganado bovino, 10 de ellos correspondieron a ganglios linfáticos y sólo dos fueron de pulmón. Algunos casos como el número cinco, ocho y nueve, tuvieron tres, cuatro y cuatro muestras respectivamente, por lo que en total se analizaron 20 muestras de los 12 casos estudiados; los que tenían varias muestras fueron identificadas con las letras A, B, C, y D. respectivamente.

De acuerdo al plan trazado dentro de la metodología se utilizaron cortes de ganglios linfáticos como control negativo a cinco niveles, cortes de tejido pulmonar como control positivo a un nivel, lo de los 12 casos problemas fueron de ganglios linfáticos y sólo 2 de pulmón, también estos a cinco niveles, por lo tanto, de cada muestra se practicaron once cortes, por lo que en suma fueron 220 cortes para cada técnica de coloración haciendo un gran total de 440 preparaciones histológicas.

### PORCENTAJE DE CASOS POSITIVOS

De los 12 casos problemas que se estudiaron, 6 fueron positivos a bacilos alcohol ácido resistente (*Mycobacterium Tuberculosis*), correspondiendo a los casos número cuatro, cinco, siete, ocho, nueve y doce, resultando negativos los casos número uno, dos, tres, seis, diez y once. Tal como se especifica en la Tabla Número 1.

Lo anterior arroja un porcentaje del 50% en los casos estudiados, aplicando las coloraciones modificadas de Ziehl Neelsen y Fite Faraco (Estandarizadas).

### RELACION ENTRE LAS CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS Y MICROSCOPICAS DE LOS TEJIDOS ANALIZADOS.

Al establecer la correlación macro-microscópica de los casos sospechosos, se encontró que todos los ganglios que microscópicamente fueron positivos a tuberculosis tenían un diámetro mayor del normal el cual oscilaba entre 1 - 1.5 cms. de diámetro máximo y en cambio los ganglios que histológicamente fueron negativos mantenían un diámetro dentro de los límites normales, menor de 5 milímetros. Respecto a la consis--

tencia, los casos positivos eran duros mientras que los negativos fueron de consistencia blanda.

En cuanto al color, los casos positivos eran blanco-grisáceos y los negativos eran café rosáceos.



T A B L A N ° . 1

RESULTADOS DEL ANALISIS HISTOLOGICO DE 12 CASOS DE GANADO BOVINO MEDIANTE LAS TECNICAS DE ZIEHL NEELSEN Y FITE FARACO PARA EL DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS Y ESTANDARIZACION DE TECNICAS DE COLORACION.

TABLA N° 1.

NUMERO DE CASO.	CONTROL NEGATIVO.	CONTROL POSITIVO.	CASO PROBLEMA.
1	0 (GL)	* (P)	0 (GL)
2	0 (GL)	* (P)	0 (GL)
3	0 (GL)	* (P)	0 (P)
4	0 (GL)	* (P)	* (GL)
5 <sub>A</sub>	0 (GL)	* (P)	* (GL)
5 <sub>B</sub>	0 (GL)	* (P)	* (GL)
5 <sub>C</sub>	0 (GL)	* (P)	* (GL)
6	0 (GL)	* (P)	0 (GL)
7	0 (GL)	* (P)	* (GL)
8 <sub>A</sub>	0 (GL)	* (P)	* (GL)
8 <sub>B</sub>	0 (GL)	* (P)	* (GL)
8 <sub>C</sub>	0 (GL)	* (P)	* (GL)
8 <sub>D</sub>	0 (GL)	* (P)	* (GL)
9 <sub>A</sub>	0 (GL)	* (P)	0 (GL)
9 <sub>B</sub>	0 (GL)	* (P)	* (GL)
9 <sub>C</sub>	0 (GL)	* (P)	* (GL)
9 <sub>D</sub>	0 (GL)	* (P)	* (GL)
10	0 (GL)	* (P)	0 (GL)
11	0 (GL)	* (P)	0 (GL)
12	0 (GL)	* (P)	* (P)

0 = NEGATIVO.

\* = POSITIVO.

GL = GANGLIO LINFATICO.

P = PULMON.

## HALLAZGOS HISTOLOGICOS DE LOS 12 CASOS ESTUDIADOS

### CONTROLES NEGATIVOS

Invariablemente fueron negativos a bacilos alcohol ácido resistente (*Mycobacterium Tuberculosis*). Tal como se es pecifica en la Tabla Número 2

### CONTROLES POSITIVOS

Estos invariablemente fueron positivos a bacilos - alcohol ácidos resistentes (*Mycobacterium Tuberculosis*). Ver Tabla Número 2.

Para establecer el diagnóstico de tuberculosis - - aparte de la identificación del *mycobacterium tuberculosis*, se utilizaron los siguientes criterios histológicos propio de - las lesiones granulomatosas tales como:

- NECROSIS CENTRAL DENTRO DEL GRANULOMA.
- CELULAS GIGANTES DE LANGHANS.
- CELULAS EPITELIODES.
- REACCION INFLAMATORIA CRONICA LINFOPLASMOCITARIA.
- FIBROSIS.

(Ver Tabla Número 2).

Todos los elementos anteriormente descritos, estuvieron presentes en las lesiones tuberculosas, tanto de los casos control positivo como en los casos problemas que resultaron positivos.

Es conveniente destacar que hubo leves variaciones cuantitativas respecto a los elementos histológicos anteriormente descrito, ya que mientras que en algunos la necrosis fue abundante como en los casos cinco y nueve, el resto era escaso. Por lo que respecta a las células Gigantes de Langhans. células Epiteliodes , Reacción Inflamatoria Crónica Linfoplasmocitaria y la Fibrosis no hubo diferencia significativa. Lo que si destaco fue la cantidad de bacilos tuberculosos para los casos problemas positivos, pues se encontró una marcada variación, incluso dentro de los ganglios de un mismo caso. No así en el control positivo, este con abundante cantidad de bacilos. Tal como se especifica en la Tabla Número 2.

T A B L A N ° . 2

HALLAZGOS HISTOLOGICOS DE 12 CASOS DE GANADO BOVINO  
PARA EL DIAGNOSTICO DE TUBERCULOSIS.

TABLA N° 2.

CASOS.	MUESTRAS.	CANTIDAD DE BACILOS ACIDO RESISTENTES.	CELULAS EPITELIOIDES.	CELULAS GIGANTES DE LANGHANS.	REACCION INFLAMATORIA CRONICA LINFOPLASMOCITARIAS.	NECROSIS	FIBROSIS.
1	C.N	0	0	0	0	0	0
	C.P	++++	*	*	*	*	*
	C.PR	0	0	0	0	0	0
2	C.N	0	0	0	0	0	0
	C.P	++++	*	*	*	*	*
	C.PR	0	0	0	0	0	0
3	C.N	0	0	0	0	0	0
	C.P	++++	*	*	*	*	*
	C.PR	0	0	0	0	0	0
4	C.N	0	0	0	0	0	0
	C.P	++++	*	*	*	*	*
	C.PR	++	*	*	*	*	*
5A	C.N	0	0	0	0	0	0
	C.P	++++	*	*	*	*	*
	C.PR	+	*	*	*	*	*
5B	C.N	0	0	0	0	0	0
	C.P	++++	*	*	*	*	*
	C.PR	+++	*	*	*	*	*
5C	C.N	0	0	0	0	0	0
	C.P	++++	*	*	*	*	*
	C.PR	++	*	*	*	*	*
6	C.N	0	0	0	0	0	0
	C.P	++++	*	*	*	*	*
	C.PR	0	0	0	0	0	0
7	C.N	0	0	0	0	0	0
	C.P	++++	*	*	*	*	*
	C.PR	+++	*	*	*	*	*
8A	C.N	0	0	0	0	0	0
	C.P	++++	*	*	*	*	*
	C.PR	++	*	*	*	*	*
8B	C.N	0	0	0	0	0	0
	C.P	++++	*	*	*	*	*
	C.PR	++	*	*	*	*	*
8C	C.N	0	0	0	0	0	0
	C.P	++++	*	*	*	*	*
	C.PR	+	*	*	*	*	*
8D	C.N	0	0	0	0	0	0
	C.P	++++	*	*	*	*	*
	C.PR	+	*	*	*	*	*
9A	C.N	0	0	0	0	0	0
	C.P	++++	*	*	*	*	*
	C.PR	0	0	0	0	0	0
9B	C.N	0	0	0	0	0	0
	C.P	++++	*	*	*	*	*
	C.PR	++	*	*	*	*	*
9C	C.N	0	0	0	0	0	0
	C.P	++++	*	*	*	*	*
	C.PR	++	*	*	*	*	*
9D	C.N	0	0	0	0	0	0
	C.P	++++	*	*	*	*	*
	C.PR	+	*	*	*	*	*
10	C.N	0	0	0	0	0	0
	C.P	++++	*	*	*	*	*
	C.PR	0	0	0	0	0	0
11	C.N	0	0	0	0	0	0
	C.P	++++	*	*	*	*	*
	C.PR	0	0	0	0	0	0
12	C.N	0	0	0	0	0	0
	C.P	++++	*	*	*	*	*
	C.PR	+	*	*	*	*	*

CN= CONTROL NEGATIVO.  
CP= CONTROL POSITIVO.

0 = NEGATIVO  
\* = POSITIVO

+ = ESCASO  
++ = MODERADA

+++ = ABUNDANTES  
++++ = MUY ABUNDANTES

CASOS QUE TUVIERON MAS DE UNA MUESTRA:

5a = Ganglios Suprafaringeos.

5b = Ganglios Mediastinicos.

5c = Ganglios Mesentericos.

8a = Ganglios Suprafaringeos.

8b = Ganglios Supramamarios

8c = Ganglios Mesentericos.

8d = Ganglios Mediastinicos.

9a - Ganglios Supramamarios.

9b = Ganglios Mesentericos.

9c = Ganglios Suprafaringeos.

9d = Ganglios Mediastinicos.

MODIFICACIONES HECHAS A LAS TECNICAS ORIGINALES  
DE COLORACION DE ZIEHL NEELSEN Y FITE FARACO

En el caso de la tinción de Ziehl Neelsen, las modificaciones fueron las siguientes:

- Los cortes de parafina en la técnica original eran de 6 micras y se modificó los cortes a 5 micras.
- El tiempo de tinción de la solución "A" (Carbol Fucsina) - que era de 30 minutos en la técnica original y se modificó a un tiempo de 10 minutos mediante la aplicación de calor - (estufa) a 80°C.
- En cuanto a la decoloración en la técnica original se dejaban los cortes tomarán un color rosa pálido y se modificó a 30 segundos de tiempo.
- En la técnica original el tiempo de lavar en agua corriente que era de 8 minutos y se modificó a dos minutos.
- El tiempo de contraste no se especifica en la técnica original y en la modificada se le da un tiempo de 15-30 segundos.



- En la técnica original el tiempo de lavar en agua destilada no se especifica y en la modificada nada más se lava en - - agua corriente durante 2 minutos.
- En la técnica original en la deshidratación en alcohol de - 96%, alcohol absoluto y la aclaración en xilol es de 2 cambios en cada uno y en la modificada es nada más un cambio - de 10 segundos cada uno.

Ver Técnica Original y Técnica modificada en la --  
página Número: (15, 16, 17, 19 y 20).

En el caso de la tinción de Fite Faraco las modifi  
caciones que se hicieron fueron mucho más marcadas que en la  
de Ziehl Neelsen habiendo tenido que hacer variaciones a la -  
técnica modificada quedando finalmente como se presenta en la  
página número: (26 y 27).

Ver Técnica Original de Fite Faraco, página número  
(22 y 23).

Ver Técnica Modificada por Fite Faraco, página nú-  
mero: (24 y 25).

Ver Técnica Final Estandarizada de Fite Faraco, página número: (26 y 27).

Las cuales fueron las siguientes modificaciones:

- En la técnica original, la desparafinización de los cortes se realiza con una mezcla de dos volúmenes de trementina refinada y un volumen de aceite de parafina viscoso con dos baños cada uno de 2.5 minutos y en la modificación es con una mezcla de xilol y aceite de olivo en dos cambios de 5 minutos.
- En la técnica original, el tiempo de coloración en Carbol - Fucsina es de 6 - 24 horas en temperatura ambiente y en la modificada es de 10 minutos mediante la aplicación de calor en una estufa a 80°C.
- En la técnica original el tiempo de lavado en agua no se especifica y se pasa al formol durante 5 minutos y en la modificada nada más se lava en agua corriente durante 2 minutos sin pasar al formol.
- En la técnica original se pasan los cortes de tejido por --

$\text{KMNO}_4$  durante 3 minutos, luego se pasan a lavar en agua para después blanquear con ácido oxálico al 2% durante 30 segundos y se lavan en agua y en la modificada no se realizan estos pasos antes mencionados.

- En la técnica original se tiñen después con Van Gienson diluido durante 3 minutos y en la modificación se contrasta con azul de metileno durante 30 segundos.
  
- En la técnica original la deshidratación se realiza con alcohol al 95%, alcohol absoluto y se aclara con xilol para después pasar al montaje y en la modificación se estilan -- las laminillas, se secan con papel filtro y se aclaran con xilol con 2 cambios en cada uno durante 10 segundos, se montan. Estos pasos son después del contraste.

## DISCUSIONES

De acuerdo a la casuística estudiada bajo los puntos de vista macroscópicas y microscópicas, aplicando las técnicas de Ziehl Neelsen y Fite Faraco para el diagnóstico del *Mycobacterium Tuberculosis*, debe de tenerse en cuenta lo siguiente:

- Que la frecuencia de tuberculosis bovina es alta en base a los casos sospechosos macroscópicamente, habiendo llegado ésta al 50% mediante la comprobación histológica.
- Este porcentaje es muy significativo, ya que revela que la incidencia de tuberculosis en ganado bovino, es alta en nuestro medio, el cual debe ser un motivo de preocupación, tanto para las autoridades sanitarias encargadas de supervisar la aplicación de normas destinadas a regular el uso de carne de bovino para consumo humano y también alertar a los médicos veterinarios y zootecnistas para que tomen conciencia del problema epidemiológico que representa la tuberculosis en nuestro medio.
- Es de importancia fundamental, tener en cuenta las características macroscópicas, para sospechar de la existencia de

un proceso tuberculoso, tales características fueron el aumento en el tamaño de los ganglios linfáticos oscilando entre 1 - 1.5 cms. de diámetro, la consistencia generalmente aumentada (dura), la coloración blanquecina. Estos cambios no se presentan en ausencia de enfermedad tuberculosa, tal como se mostró en nuestro estudio.

- Los cortes histológicos de tejido negativo (control negativo) y positivos (control positivo) al bacilo tuberculoso, son de una utilidad indiscutible en el diagnóstico de casos sospechosos de tuberculosis al aplicar las técnicas de coloración modificadas de Ziehl Neelsen y Fite Faraco.
  
- El diagnóstico de tuberculosis, debe estar apoyado aparte de la presencia del mycobacterium tuberculosis por otras características histológicas propias de los granulomas que -- por orden de importancia son los siguientes:
  - CELULAS EPITELIODES.
  - CELULAS GIGANTES DE LANGHANS.
  - REACCION INFLAMATORIA CRONICA LINFOPLASMOCITARIA.
  - NECROSIS.
  - FIBROSIS.

En mi opinión la variación en la cantidad de los elementos anteriormente mencionados entre un caso y otro, depende fundamentalmente en el estadio evolutivo de la lesión histológica.

- En cuanto a las modificaciones hechas a las técnicas de tinción de Ziehl Neelsen y Fite Faraco para la demostración -- del mycobacterium tuberculosis en relación a las técnicas originales de las mismas, fueron los siguientes puntos:

- GROSOR DEL CORTE.
- TIEMPO.
- APLICACION DE CALOR.
- ELIMINACION DE ALGUNOS REACTIVOS.
- APLICACION DE TIEMPOS NO ESPECIFICADOS.

En cuanto al tiempo de tinción en la técnica original de Ziehl Neelsen es de aproximadamente de una hora con 20 minutos y en la técnica modificada es de aproximadamente de treinta y cinco minutos.

Y el tiempo de coloración en la técnica original de Fite Faraco es de aproximadamente de 17 horas con 5 minutos y en la técnica modificada es de aproximadamente de treinta y cinco minutos.

Al haber realizado varias veces las tinciones modi  
ficadas de las técnicas de Ziehl Neelsen y Fite Faraco, se lo  
gró constatar que es más sencilla y económica, la técnica de  
tinción modificada de Ziehl Neelsen que la de Fite Faraco.

## CONCLUSIONES

- 1.- La frecuencia de tuberculosis fue del 50% de acuerdo a la casuística estudiada.
- 2.- Las variantes de las características macroscópicas son -- evidencias altamente sugestivas en lesiones por el myco-- bacterium tuberculosis.  

El aumento del tamaño de los ganglios linfáticos -- mayor de 1 centímetro, la consistencia dura y la colora-- ción blanquecina, son las características macroscópicas -- altamente sugestiva de un proceso tuberculoso, ya que la variación es muy marcada en comparación a un tejido de -- ganglio normal.
- 3.- La aplicación de controles positivos y negativos son de -- gran utilidad en las técnicas de coloración modificadas -- de Ziehl Neelsen y Fite Faraco para el diagnóstico de ba-- cilos tuberculosos (mycobacterium tuberculosis) en casos sospechosos.
- 4.- Los criterios para el diagnóstico de tuberculosis, aparte de la presencia del mycobacterium tuberculosis, por orden de importancia son los siguientes:



- CELULAS EPITELIODES.
- CELULAS GIGANTES DE LANGHANS.
- REACCION INFLAMATORIA CRONICA LINFOPLASMOCITARIA.
- NECROSIS.
- FIBROSIS.

5.- De acuerdo a las modificaciones hechas a las técnicas de tinción de Ziehl Neelsen y Fite Faraco, se logró que se realizaran ordinariamente con el mismo tiempo y tan sencillo como la de Hematoxilina y Eosina en el Laboratorio de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de Guadalajara. Siendo esto a la vez un acervo en los recursos de diagnóstico de la misma.

6.- Las técnicas de tinción modificadas de Ziehl Neelsen y Fite Faraco, se logró constatar que es más sencilla y económica la de Ziehl Neelsen que la de Fite Faraco.

#### RECOMENDACIONES

Se sugiere que cuando se tenga un caso sospechoso o sugestivo de tuberculosis, se practiquen cuando menos cinco cortes histológicos (5 niveles), ya que en algunos casos, en

el primer nivel no se puedan encontrar todos los elementos su  
gestivos de tuberculosis y en los posteriores sí.

## RESUMEN

Se procedió a estudiar 12 casos de tejido de ganglio linfático y pulmón de ganado bovino sospechoso de tuberculosis, encontrando el 50% de positividad en éstos casos.

Se realizaron cortes histológicos de éstos aplicando las técnicas de coloración modificadas de Ziehl Neelsen y Fite Faraco (para demostración del mycobacterium tuberculosis) utilizando controles positivos y negativos de casos conocidos, para estandarizar estas técnicas en el Laboratorio de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de Guadalajara. Procediéndose a evaluar las ventajas y desventajas que ofrecen las Técnicas Modificadas y su utilidad práctica, determinando que la técnica modificada de Ziehl Neelsen es superior que la de Fite Faraco.

### BIBLIOGRAFIA

- 1.- BENITEZ, B.L., G. DE LA VEGA, G. Y R. FREYRE, H. 1975. Histoquímica: Manual Práctico I.M.S.S. México, D.F.
- 2.- BURCK, H. CH. 1969. Técnica Histológica: Manual para Realizar Preparaciones Microscópicas en el Laboratorio. Paz Montalvo. Madrid.
- 3.- GABE, M. 1976. Histological Techniques. Springer-Verlag. New York.
- 4.- GILLESPIE, J.H. Y J.F. TIMONEY. 1983. HAGAN Y BRUNER. Enfermedades Infecciosas de los Animales Domésticos. 4ta. Ed. Prensa Médica Mexicana. México, D.F. PP. 228-248.
- 5.- HIMES, E.M. 1977. Histologic Examination of Bovine Tissue Suspected of Being. Memorias del I Simposium Internacional de Laboratorios de Diagnóstico. Tomo I Guanajuato, México. PP. 1-8.
- 6.- JENSEN, R. AND D.R. MACKEY. 1971. Diseases of Feedlot Cattle. 2da. Ed. Lea-Febiger. Philadelphia. - pp. 154-162.

- 7.- JUBB, K.V.F. Y P.C. KENNEDY. 1973. Patología de los -  
Animales Domésticos. Tomo I. Labor. México,  
D.F. PP. 273-288.
- 8.- LEE, G.L. (ED). 1968. Manual of Histologic Staining. -  
Methodos of the Armed Forces Institute of Pa--  
thology. 3ra. Ed. Mc. Graw Hill. New York.
- 9.- LEPPER, A.W.D. Y C.W. PEARSON. 1976. La Detección de  
Anticuerpos Circulantes en la Tuberculosis Bo-  
vina. Zoonosis. 23:52.
- 10.- LYNCH, M.J., S.S. RAPHAEL, L.D. MELLOR. P.D. SPARE Y -  
M.J.H. INWOOD. 1972. Métodos de Laboratorio.  
2da. Ed. Interamericana. México. D.F.
- 11.- SMITH, A. Y J. BRUTON. 1977. Atlas a Color de Téchni--  
cas de Coloración Histológica. Year Book Medi-  
cal Publishers. Chicago.
- 12.- WELLS, K.F. 1973. La administración del Programa de -  
Erradicación de la Tuberculosis Bovina en Cana-  
da. V Reunión Interamericana Sobre el Control  
de la Fiebre Aftosa y Otras Zoonosis. Pub. --  
Científica N° 256:154156. Organización Pana-  
mericana de la Salud. Washington, D.C.