



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BIOMEDICAS
T.S.U. HISTOTECNOLOGÍA
TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**



**MÉTODOS HISTOLÓGICOS PARA LA DETECCIÓN
DE *Mycobacterium tuberculosis* EN BIOPSIAS PLEURALES**

Autores:

Carrasquero Cinthya

Esparragoza José

Tutor:

Lic. Alcira Argüello

Bárbula , Mayo de 2015.



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BIOMEDICAS
T.S.U. HISTOTECNOLOGÍA
TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**



CONSTANCIA DE APROBACIÓN

Los suscritos miembros del jurado designado para examinar el Trabajo Especial de Grado titulado:

**METODOS HISTOLOGICOS PARA LA DETECCIÓN
DE *Mycobacterium tuberculosis* EN BIOPSIAS PLEURALES**

Presentado por los bachilleres:

CARRASQUERO CINTHYA C.I.:24.441.318

ESPARRAGOZA JOSÉ C.I.:22.012.987

Hacemos contar que hemos examinado y aprobado la misma, y que aunque no nos hacemos responsables de su contenido, encontramos correcto en su calidad y forma de presentación.

Fecha:

Profesor: Eliana López

Profesor: Lizet Requena

Profesor: Luisel Rodriguez



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BIOMEDICAS
T.S.U. HISTOTECNOLOGIA
TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**



**METODOS HISTOLOGICOS PARA LA DETECCIÓN
DE *Mycobacterium tuberculosis* EN BIOPSIAS PLEURALES**

AUTORES:

Carrasquero Cinthya

Esparragoza José

TUTOR:

Lic. Alcira Argüello

AÑO: 2015

RESUMEN

La presente investigación se desarrolló con el objetivo de analizar los diferentes métodos histológicos existentes para la detección del *Mycobacterium tuberculosis* en biopsias pleurales. Este agente es causante de la enfermedad llamada Tuberculosis que generalmente es localizada en el pulmón, aunque puede afectar otros órganos, lo que equivale a una enfermedad extrapulmonar, como por ejemplo la tuberculosis pleural. En este estudio monográfico de tipo documental se ha sintetizado información sobre la tuberculosis pleural y su diagnóstico histológico, siendo estos procedentes de diversas fuentes como artículos científicos, manuales, libros y webs. En el estudio se desarrolla la patología en general, pruebas diagnósticas y alternativas a la misma. Al respecto se piensa que el estudio puede tener ventaja práctica debido a los conocimientos descritos durante la investigación, sirviendo estos, de orientación e información a la colectividad y comunidad tanto estudiantil como profesional.

Palabras claves: *Mycobacterium tuberculosis*, biopsia, histología, procesamiento.



**CARABOBO UNIVERSITY
MEDICAL SCIENCES FACULTY
SCHOOL OF BIOMEDICAL SCIENCES
T.S.U. HISTOTECNOLOGY
GRADE WORK**



**TYPING METHODS FOR DETECTION
Mycobacterium tuberculosis IN PLEURAL BIOPSIES**

AUTHORS:

Carrasquero Cinthya

Esparragoza José

TUTOR:

Lic. Alcira Argüello

YEAR: 2015

ABSTRACT

This research was conducted with the aim of publicizing the various existing histological methods for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in pleural biopsies. This agent is causing the disease called Tuberculosis which is usually located in the lung, although it can affect other organs, equivalent to extrapulmonary disease, such as pleural tuberculosis. In this monographic study has been synthesized information about the pleural tuberculosis and histological diagnosis, being these from various sources such as scientific papers, manuals, books and websites. It develops study of the pathology in general, diagnostic and alternatives to such tests. In this regard it is thought that the study may have practical benefit because the knowledge described in the research, serving these how guidance and information to the community and both student and professional community.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, biopsy, histology, processing.

Research summary: Methods pathological diagnoses morphological studies.

ÍNDICE

	Pág.
CONSTANCIA DE APROBACIÓN.....	II
CONSTANCIA DE ENTREGA.....	III
RESUMEN.....	IV
SUMMARY.....	V
INTRODUCCIÓN.....	7
RESEÑA HISTORICA Y ANTECEDENTES.....	10
CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y PATOLOGÍA.....	12
DIAGNÓSTICO Y PROCESAMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE TEJIDO PLEURAL.....	13
TÉCNICAS PARA LA DETECCIÓN DE <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	14
CAUSAS Y RAZONES POR LA CUAL SE OBTIENEN DIAGNÓSTICOS FALSOS POSITIVOS MEDIANTE LOS MÉTODOS HISTOLÓGICOS.....	19
CONCLUSIÓN.....	21
BIBLIOGRAFÍA.....	24

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es una enfermedad pulmonar contagiosa conocida desde tiempos inmemorables, siendo una de las principales causas de muerte por agentes infecciosos en el mundo. Esto ha constituido desde hace siglos un problema para la humanidad de gran magnitud y de alta prevalencia, con la aparición de nuevos casos infecciosos donde un tercio de la población mundial se encuentra actualmente contaminada por tuberculosis. Esta enfermedad se transmite cuando una persona contaminada tose o estornuda generando microscópicas gotas de saliva que son inhaladas por personas sanas. Habitualmente provocando tos, fiebre, expectoración (ocasionalmente con sangre) cansancio y en algunos casos pérdida de peso.¹

Dicho padecimiento es infecto-contagiosa, si el huésped es inmunocomprometido, la lesión no cura y evoluciona hacia la enfermedad tuberculosa con la formación de una lesión de tipo productiva que se caracteriza por la formación del Granuloma crónico, producido por una bacteria de la familia de las Micobacterias, llamado *Mycobacterium tuberculosis* que se localiza generalmente en el pulmón, aunque puede afectar otros órganos. El *Mycobacterium tuberculosis* es comúnmente obtenido en casi todos los casos por inhalación de partículas aerógenas alcanzando los bronquios y alveolos donde son destruidos por macrófagos, si la cantidad de bacilos es mayor a la de los fagocitos pueden aislarse manteniéndose ocultos por años mientras se multiplican dañando al organismo.²

Las enzimas que destruyen los tejidos posiblemente provienen de los macrófagos que ocasionan necrosis. Siendo estos microorganismos, que dependiendo de la memoria inmunológica pueden desencadenar una lesión tisular a causa de las enzimas destructoras de tejidos, ocasionando necrosis caseosa que al licuarse suele drenar a un bronquio, dejando una caverna tuberculosa (mecanismo que explica la diseminación broncogénica a otras partes del pulmón). Las micobacterias, son microorganismos aerobios de forma bacilar que pueden

persistir en lesiones antiguas necróticas y calcificadas y mantener la capacidad de reanudar el crecimiento.¹

La característica principal es que no se tiñen fácilmente con los procedimientos comunes a pesar de que son filogenéticamente Gram positivas, esto se debe a la presencia de capas impregnadas de material lipídico y ácidos micólicos además de proteínas, haciendo que repelen el agua, siendo impermeables a compuestos químicos en solución acuosa. Los lípidos cerosos de la pared celular convierten a las micobacterias en resistentes al alcohol ácido, impidiendo la tinción con colorante de anilina, por tal razón las muestras de micobacterias teñidas con Gram pueden tener una apariencia variable ya sea negativamente o fantasma, haciendo que no tomen bien el colorante y únicamente se observe un borde débilmente teñido. Sin embargo, una vez teñidas (con los métodos adecuados), estas son resistentes a la decoloración con alcohol ácido y por ende es que se conocen como bacilos ácido alcohol resistente (BAAR).^{3,4,5}

Por lo que, se debe tener el conocimiento de cuáles son los métodos adecuados para llevar a cabo tales procesos, puesto que se pueden presentar algunas dificultades cuando se intenta demostrar las micobacterias en muestras pleurales, a causa del proceso que sufren los tejidos durante su deshidratación e inclusión en parafina y/o durante el proceso de desparafinización siguiendo los métodos clásicos, ocasionando que gran cantidad de bacilos se desprendan del tejido a causa de las violentas interacciones entre el Xilol, el alcohol y el agua (usados comúnmente para desparafinar los cortes de tejidos antes de realizar las tinciones). Esto explica la existencia de numerosas modificaciones a las técnicas histológicas para lograr teñir este tipo de bacterias, donde la mejor es aquella que dé con los resultados satisfactorios para cada laboratorio.⁶

La siguiente investigación tiene como objetivo general analizar los diferentes métodos histológicos existentes para la detección de *Mycobacterium tuberculosis* en biopsias pleurales, los objetivos específicos a desarrollar son describir los procedimientos para la obtención de muestras de tejido pleural, describir las técnicas histológicas para la detección del *Mycobacterium tuberculosis* y

determinar las causas y razones por la cual se obtienen diagnósticos falsos positivos y negativos mediante los métodos histológicos.

Desde el punto de vista metodológico, este estudio monográfico es de tipo documental y bibliográfico el cual, se ha sintetizado información sobre la tuberculosis pleural y su diagnóstico histológico, siendo estos procedentes de diversas fuentes como artículos científicos, manuales, libros y webs. Este tipo de investigación tiene la particularidad de utilizar como fuente primaria el documento escrito en diferentes formas basándose esencialmente en el resultado de otras investigaciones y de reflexiones teóricas, siendo estas, a partir de su lectura, analizadas e interpretadas. Esta investigación se fundamenta en el uso de los distintos métodos histológicos para la detección del *Mycobacterium Tuberculosis*

Cierto es, la complejidad de distinguir el bacilo de la tuberculosis de otras Micobacterias por examen microscópico, por tal razón el estudio taxonómico es necesario al igual que es aconsejable la realización de biopsias para el estudio histopatológico y así poder diferenciar la gran variedad de Micobacterias existentes en el tejido y dar un análisis y demostración de los bacilos en los granulomas de muestras de tejidos de biopsias pleurales. ¿Cuál sería la utilidad práctica? Al respecto se considera que el estudio puede tener utilidad práctica debido a que los conocimientos que se esperan describir durante la investigación pueden servir de orientación e información a la colectividad y comunidad tanto estudiantil como profesional.

DESARROLLO

Reseña histórica

En la época de la revolución industrial, muchas personas morían de tuberculosis debido a la alta densidad de población, la enfermedad se propagaba de forma rápida en las ciudades. Las causas de la tuberculosis se han debatido desde hace mucho, se piensa que el primer agente causal haya sido *Mycobacterium bovis* o una variante, contrayendo el hombre la enfermedad al consumir carne o leche de animales infectados. Robert Koch puso fin a esta discusión en 1882 con el descubrimiento de la bacteria de la tuberculosis (Bacilo de Koch). Impartió una conferencia en la que relató cómo había identificado el bacilo en material tuberculoso, su cultivo in vitro y la producción de la enfermedad cuando inoculó el cultivo puro en animales de experimentación, de cuyas lesiones tuberculosas pudo aislar de nuevo el bacilo.²

La tuberculosis pleural es una condición prevalente en hasta un 30% de los pacientes con tuberculosis y de hecho constituye una de las manifestaciones más frecuentes de la presentación inicial. El diagnóstico de la tuberculosis pleural usualmente presenta la dificultad característica de demostrar la infección por *Mycobacterium tuberculosis* mediante confirmación directa en tinciones y cultivos, lo que ha impulsado el establecimiento de nuevos criterios y el desarrollo de intervenciones dirigidas a mejorar la sensibilidad de los métodos diagnósticos.²

Antecedentes de la Investigación

Según Rodríguez y cols., 2009, "Tuberculosis pleural. Utilidad de la reacción en cadena de la polimerasa en muestra de tejido" realizaron un estudio de tipo comparativo y de diseño transaccional, de campo, no experimental, donde analizaron muestras de pleura parietal de 52 pacientes, 30 hombres y 22 mujeres, en una edad promedio de 39 años con sospecha de tuberculosis pleural.

realizaron una biopsia pleural a los pacientes con diagnóstico de tuberculosis pleural, cuyo protocolo se definió como de alto valor de sospecha clínica en pacientes que presentaron criterios como antecedente epidemiológico definidos por el contacto con enfermos tuberculosis, dolor pleurítico, tos, disnea, fiebre, pérdida de peso y sudoración nocturna, así como el hallazgo paraclínico positivo de velocidad de sedimentación globular elevada o trombocitosis, se les hizo un cultivo de muestra y estudio histopatológico utilizando la técnica de Z-N. Del total de las muestras sembradas en el cultivo, resultaron positivas 6. Y En 21 biopsias pleurales se identificaron lesiones inflamatorias crónicas granulomatosas Concluyendo que el estudio histopatológico de la biopsia de pleura es una técnica accesible y rápida con una adecuada sensibilidad y especificidad para el diagnóstico sugestivo de tuberculosis pleural. Para lograr un diagnóstico etiológico definitivo de pleuritis tuberculosa es necesario asociar el valor de sospecha clínica del paciente con el estudio del tejido pleural por medio de los diferentes métodos disponibles: bacteriológicos, histopatológicos y de biología molecular.

En otro contexto, Rabucha y cols., 2012⁸, desde el punto de vista metodológico, realiza en Caracas-Venezuela una investigación de tipo correlacional y de diseño transaccional titulado “Utilidad de la adenosina deaminasa, interferón gamma y biopsia pleural para el diagnóstico de tuberculosis pleural” El objetivo de este trabajo fue demostrar la eficacia de la adenosina deaminasa, interferón gamma y biopsia pleural para el diagnóstico de tuberculosis pleural y si estos biomarcadores podrían obviar la práctica de la biopsia. Concluyendo en que la adenosina deaminasa no es útil aislada como método diagnóstico para la tuberculosis pleural, recomendando no obviar la biopsia pleural ya que esta constituye actualmente para muchos investigadores, un método diagnóstico útil, sobretodo en países en vías de desarrollo, donde muchas veces la toracoscopia y la biopsia dirigida por imagen no son accesibles. Sobre las bases estudiadas se ha relacionado esta investigación vinculando los importantes métodos basados para la obtención del diagnóstico de tuberculosis pleural a pesar de la variedad de métodos diagnósticos existentes.

Características morfológicas

Las *Mycobacterium tuberculosis*, son microorganismos de forma bacilar que en general pueden variar mucho en su morfología desde formas cocoides pequeñas a largos filamentos, estos suelen tener una morfología característica, ya sea delgado de forma recta o ligeramente curvada y su tamaño varía de 1-4 micras de largo por 0-5 micras de ancho. La característica principal del *Mycobacterium tuberculosis* es que no se tiñen fácilmente con los procedimientos comunes a pesar de que son filogenéticamente Gram positivas, esto se debe a la presencia de capas impregnadas de material lipídico y ácidos micólicos además de proteínas, haciendo que repelen el agua siendo impermeables a compuestos químicos en solución acuosa.³

Patología

La tuberculosis puede manifestarse como infección primaria o secundaria La tuberculosis primaria es adquirida por la exposición inicial a *Mycobacterium tuberculosis* por lo general como resultado de la inhalación de aerosoles infectados, generado cuando tose una persona con tuberculosis, en la infección primaria aparece la lesión que consiste en un granuloma parenquimatoso periférico por lo general en los lóbulos superiores.^{1,9}

La tuberculosis secundaria representa la reactivación de la tuberculosis pulmonar primaria o una nueva infección en un huésped previamente expuesto a la tuberculosis primaria, donde la reacción inicial a *M. tuberculosis* es diferente en la tuberculosis secundaria la respuesta inmunitaria celular se produce después de un intervalo de latencia y lleva la información de muchos granulomas y diseminación del tejido necrótico, donde los segmentos apical y posterior de los lóbulos superiores son los más afectados.⁹

Diagnóstico

El estudio histológico de un Granuloma y la demostración de BAAR hacen muy sugestivo el diagnóstico de tuberculosis y por ello se debe considerar que es muy importante determinar la infección como la enfermedad, ya que ambas solo son dos pasos continuos de la embestida que la *M. tuberculosis* efectúa al organismo humano.⁹

Procedimientos para la obtención de muestras de tejido pleural

En presencia de *M. tuberculosis*, si es preciso estudiar la estructura histológica de la muestra de pleura infectada, es obligatorio e ineludible recurrir a las biopsias pleural para el diagnóstico de *Mycobacterium tuberculosis* en el tejido pleural. Las biopsias pleurales consisten en la extracción de una muestra de la pleura mediante procesos médicos invasivos o no invasivos e intervenciones quirúrgicas realizadas por el médico responsable, efectuándose así mediante:

Toracoscópio: se debe aplicar anestesia local en la zona de inserción de forma cuidadosa, el paciente adopta la posición decúbito lateral con el hemitórax sano hacia abajo. El trocar se introduce en el tórax, se evacúa completamente el derrame pleural mientras se está realizando la aspiración del líquido pleural. Luego se introduce el toracoscópio, se explora la cavidad pleural, tomando biopsias sobre las lesiones dudosas de la pleura.¹⁰

Biopsia abierta: se lleva a cabo en el hospital, utilizando anestesia general. El cirujano hará una pequeña incisión en el lado derecho o izquierdo del tórax, en donde las costillas son separadas suavemente, tomando un pedazo de tejido del área del tórax, después del cometido, la herida se cierra con puntos de sutura y el

médico puede optar por dejar un pequeño tubo plástico en el tórax para evitar que se acumule aire y líquido.¹¹

Punción: Este examen se puede realizar en un consultorio médico. El paciente estará sentado, el médico limpiará la piel en el sitio del procedimiento e inyectará un medicamento insensibilizador local a través de ésta dentro del revestimiento de los pulmones y la pared torácica. Luego introduce una aguja hueca más grande a través de la piel dentro de la cavidad torácica. Una aguja de corte más pequeña se encuentra dentro de la aguja hueca. El médico rota la aguja más pequeña y luego retira la aguja para recoger las muestras de tejido. Cuando se completa el procedimiento, se coloca un vendaje sobre el sitio de la biopsia.¹¹

Las muestras obtenidas deben ser rotuladas para evitar inconvenientes que pueden traer consecuencias graves para el paciente, deben ser almacenadas y conservadas dado el caso en que no sean derivadas de inmediato y trasladadas bajo condiciones estrictas en contenedores rígidos.

Técnicas histológicas para la detección de *Mycobacterium tuberculosis*

Se denomina técnica histológica a una serie de métodos y técnicas utilizados para poder estudiar las características morfológicas y moleculares de los tejidos. Hay diversas vías para estudiar los tejidos, es decir, series de técnicas que se utilizarán dependiendo de qué característica se desee observar y qué tipo de tejido o diagnóstico se espera dar, elección que dependerá del resultado final que se quiera obtener.

Al recibir la muestra de biopsia pleural en el laboratorio, estas deben ser fijados en solución de formalina al 10 %, cuyo procedimiento consta de 1mm de tejido por hora, la función de este paso es mantener la muestra evitando que se produzca la autólisis. Seguidamente el tejido es extraído de la solución fijadora, para ser deshidratado en varios baños en alcoholes de concentración ascendente, normalmente metanol, de gradación creciente hasta alcohol de 100°, luego ser

contrastada y aclarada con una solución que sea miscible tanto con el alcohol de 100° como con la parafina, denominado sustancia intermediaria, el tiempo de incubación de la pieza en algunos líquidos intermediarios no debe ser excesivo puesto que estas sustancias endurecen la pieza y provocan problemas al hacer las secciones.¹²

Posteriormente son incluidas en parafinas o menor medida la celoidina, esto implica que para que la parafina líquida pueda penetrar completamente en el tejido, ha de sustituirse el agua por un solvente orgánico, a esto se debe la previa deshidratación del tejido en alcoholes, el medio de inclusión debe estar en estado líquido a 56°C, para crear un medio homogéneo, tras el embebimiento completo de la muestra y se vierte parafina líquida en un molde, se introduce la muestra y se coloca según la orientación deseada de corte y se deja solidificar a temperatura ambiente, esto permite la realización de los cortes de menor grosor con gran facilidad y una precisión mayor que cuando los mismos se realizan por congelación, las secciones son de 4 a 7 micras de grosor ya que deben ser atravesados por la luz para que puedan ser observados bajo un microscopio, luego son desparafinadas e hidratada procediendo luego con las coloraciones.¹²

Es necesario tener en cuenta que las Micobacterias, son microorganismos que tienen presencia de capas con grandes cantidades de material lipídico y ácidos micólicos, como la capa interna (moderadamente electrón-densa compuesta por peptidoglicano), la capa media (más ancha que la anterior y electrón-transparente compuesta por polisacárido) y una capa externa (de grosor variable, electrón-opaca y de estructura glucolípida). Además de estos componentes, existen proteínas relacionadas a dichas capas, algunas con funciones enzimáticas que son necesarias para la construcción y reconstrucción de los polímeros de la pared durante el proceso de división celular y crecimiento, otras con función de porina con elementos relacionados a la baja permeabilidad de las Micobacterias en moléculas hidrofílicas por lo que su pared es hidrofóbica, haciendo que repelen el agua siendo impermeables a compuestos químicos en solución acuosa,

impidiendo la tinción con colorantes de anilina, como el violeta cristal (que se usa en la técnica de Gram).^{3,4,5}

Por tal razón es necesario el uso de tinciones ácido-alcohol resistente, y el colorante más utilizado para explorar la ácido-alcohol resistencia de las Micobacterias, es la fucsina básica, que penetra al citoplasma bacteriano y se une a los ribosomas; también reacciona con los ácidos micólicos de la pared celular de las Micobacterias, lo cual impide la salida de la fucsina atrapada en el citoplasma bacilar cuando se agrega el alcohol-ácido o el H₂SO₄; otras bacterias no ácido-alcohol resistentes, resisten la mezcla de alcohol-ácido o del ácido solo, y permanecen teñidos y aparecen de color rojo.¹³

Las principales coloraciones que demuestran el ácido- alcohol resistencia en los bacilos tuberculosos son las siguientes:

Tinción de Ziehl-Neelsen:

Empleada principalmente para detectar Micobacterias en biopsias y muestras de punción, utilizando una modificación de ésta para cortes histológicos. Esta tinción fue descubierta el 1 de mayo de 1882 por Paul Ehrlich, donde posteriormente Franz Ziehl, un bacteriólogo alemán (1857-1926), cambió el mordiente de Ehrlich (aceite de anilina) por otra sustancia semejante pero de composición más precisa (ácido carbólico), posteriormente Karl Adolf Neelsen, un patólogo alemán (1854-1894), cambió la genciana por fucsina y el ácido nítrico por sulfúrico. Ni Ziehl ni Neelsen hicieron publicación alguna ni se atribuyeron autoría: el nombre de la tinción surgió de una simple nota al pie de una página, en una publicación que Heinrich Albert Johne (un patólogo alemán de la época) hiciera en 1885. La mayoría de las coloraciones iniciales se practicaron en extendidos, en los cortes de tejidos y los resultados eran menos reproducibles.¹⁴

El procedimiento de esta técnica consiste en: Desparafinar e hidratar los cortes, seguidamente aplicar ácido periódico 5% 10 minutos, luego se lava con agua destilada y se aplica fucsina fenicada por 15 minutos, después se decolora en alcohol ácido al 50% y se vuelve a lavar con agua destilada, se aplica hematoxilina

durante 10 minutos y seguidamente se procede con deshidratar, aclarar y montar con PDX o similar.¹⁵ Esta técnica arroja como resultado: bacilos ácido-alcohol resistente teñidos de color rojo intenso en un fondo de contraste de color azul.¹⁵

Tinción de Fite-Faraco

En el caso del método de Fite-Faraco, se impregnan los cortes con grasa de gallina antes de teñirlos, dejando como último tiempo la desparafinización en Xylol y alcohol, con lo que logra retener gran cantidad de bacilos; pero las laminas teñidas con este método no permiten una desparafinización uniforme ni toman el colorante de contraste con igual intensidad en todas las aéreas del tejido, donde por lo general no se obtiene una buena diferenciación. Mientras que Fite desparafina, antes de teñir, con una mezcla de Xylol y aceite de oliva o Xylol y aceite de cacahuete o algún otro aceite, como el de algodón pudiendo también, utilizar petrolato líquido.⁵

Esta técnica obtiene mejor contraste que la anterior y el colorante de fondo se retiene con mayor uniformidad pero tiene la desventaja que usa para colorar una solución alcohólica de ácido clorhídrico, con lo que aun se desprenden numerosos bacilos, reteniendo menor cantidad de estos que con la técnica de Faraco. Debido a lo sucedido se utiliza una variante de la técnica de Fite-Faraco donde se sustituye el alcohol clorhídrico (para decolorar) y se utiliza una solución acuosa de ácido sulfúrico. Con esto, se logra retener la cantidad de bacilos y se obtiene una mejor diferenciación y una coloración de contraste más uniforme. También se sustituye el azul de metileno por el verde claro amarillento, sobre cuyo fondo se destacan con mayor brillantez los bacilos teñidos de rojo.⁵

La descripción de la técnica es: Desparafinar los cortes con la mezcla de Xylol-aceite de oliva (2 cambios de 5 minutos cada uno), se escurre y seca las laminas con papel filtro, luego se lava en agua corriente durante 5 minutos, se procede con teñir con la solución de fenol-fucsina 20 minutos a temperatura ambiente y se lava con agua corriente, seguidamente se decolora con solución acuosa de ácido sulfúrico al 5% de 2 a 5 minutos (procurando que las laminas tomen un color rosa

pálido), se lava en agua corriente durante 10 minutos, posteriormente se contrasta con una solución de verde claro amarillento 30-60 segundos (dando un color verde pálido), se secan las láminas con papel filtro ligeramente y se dejan secar completamente durante una hora a temperatura ambiente y finalmente se monta con PDX o similar.⁵

Los resultados de este procedimiento son: bacilos ácido-alcohol resistentes en color rojo brillante con un fondo verde pálido.⁵

Tinción de Kinyoun

La tinción de Kinyoun es otro método utilizado para la tinción de microorganismos resistentes a los ácidos similar a la tinción de Ziehl-Neelsen con la diferencia que las Micobacterias serán vistas de color violeta. Se utiliza un agente tenso activo (alta concentración de fenol en carbolfuscina) que aumenta la permeabilidad del colorante a través de la capa cerosa. Esta alta concentración de fenol permite disolver el material lipídico de la pared celular de la Micobacterias, lo cual ocasiona la penetración de la carbolfuscina sin la necesidad de calor. El procedimiento de dicha tinción consiste en: Desparafinar la muestra, seguidamente sumergir los cortes en carbol fucsina 5 minutos, se lava en agua corriente, luego se diferencia en alcohol ácido 3% durante 3 minutos, se procede con lavar en agua corriente, después se sumergen los cortes en azul de metileno durante 3 minutos y se Lava con agua corriente, posteriormente se Deja secar, se deshidrata, aclara y monta.¹⁶

Los resultados de esta tinción es: bacterias ácido-alcohol resistente de color violeta y las no acido-alcohol resistentes de color azul.

Luego de realizar cualquiera de los métodos mencionados, la laminas con cortes de tejido pleural, ya teñidas, se visualizan en el microscopio y de tal manera el médico patólogo puede realizar un informe preliminar o definitivo documentando los resultados del examen microscópico de la muestra, los colorantes, soluciones,

reactivos e insumos recibidos y consumidos y finalmente evaluar la situación epidemiológica y calidad de actividades destinadas al control de la tuberculosis.

Causas y razones por la cual se obtienen diagnósticos falsos positivos mediante los métodos histológicos para la detección de micobacteria tuberculosis

A pesar de la gran variedad de métodos para la detección de tuberculosis no histológica, como baciloscopia de esputo, rayos X, prueba de tuberculina, PPD o citologías, es aconsejable efectuar biopsias para el estudio histopatológico, teniendo en cuenta que aunque el análisis histológico para BAAR Tuberculosis y la demostración de los bacilos en los granulomas de muestras de tejidos de biopsias pleurales, son útiles no suelen ser fácil de distinguir de otras Micobacterias en muestras teñidas, ya que las lesiones pueden ser un poco diferente a pesar de que es idéntico el parasitismo intracelular de las Micobacterias y algunos bacilos no tuberculosos pueden aparecer con la misma apariencia de la *M. tuberculosis*, motivo por el cual se tiende a confundir y por ende dar un mal diagnóstico.¹⁷

Puede ocurrir, muy frecuentemente, durante el proceso de coloración, el desprendimiento de bacilos de los casos muy positivos y queden flotando en el colorante y se pasen a aéreas de otra lámina, produciendo así una falsa impresión de positividad. También puede acontecer un diagnóstico fallido, los errores cometidos al momento de procesar la muestra, como por ejemplo, desparafinar únicamente con Xylol las biopsias del paciente con la enfermedad de tuberculosis; utilizar fucsinas viejas, mantenidas en jarras de coplin, que pierden rápidamente su actividad y producen precipitaciones; usar concentraciones bajas de fenol; dejar evaporar el alcohol de la solución de fucsina por cierre inadecuado del recipiente; interpretar como positivos a los bacilos que habiéndose desprendido, contaminan otras biopsias.¹⁷

A causa de esto, es que se recomienda que las biopsias sean almacenadas individualmente; disminuir el número de BAAR de las biopsias pleurales por el uso

de la mezcla ácido sulfúrico- alcohol absoluto; negativizar las preparaciones por el uso de alcohol- ácido clorhídrico en tiempo prolongados o dejar los cortes mucho tiempo en alcohol, antes del montaje; utilizar controles de otras infecciones masivas como Hansen o micobacterias atípicas para casos de enfermedad tuberculosa. Actualmente es cada vez menos frecuente la biopsia pleural por sospecha de tuberculosis debido a que el diagnóstico clínico suele ser realizado sobre la base de los niveles de adenosín-deaminasa (ADA) en líquido pleural.^{4,8,15}

Sin embargo, la biopsia pleural es de gran utilidad en el diagnóstico de enfermedades pleurales cuando es realizada y analizada por un equipo de especialistas experimentados. Tiene alto rendimiento diagnóstico, especialmente cuando se realizan técnicas complementarias de diagnóstico y existe una estrecha colaboración entre el médico clínico y el patólogo. Por lo tanto es necesario tener en cuenta que existe un conjunto de pruebas no convencionales para la detección de tuberculosis propiamente en tejidos, pero ninguna de estas cumple con las condiciones ideales de bajo costo, simplicidad, sensibilidad y especificidad.¹⁷

CONCLUSIÓN

La Tuberculosis es una enfermedad infecciosa oportunista de frecuente asociación con el VIH elevando la mortalidad por la demora en el diagnóstico y tratamiento. Este padecimiento constituye uno de los problemas de salud más descuidados y abundantes del mundo, sobre todo con más influencia en países subdesarrollados debido a la susceptibilidad individual y las malas condiciones socioeconómicas, considerándose estos, factores de relevante responsabilidad para contraer esta enfermedad. La tuberculosis pulmonar continúa siendo un importante problema de salud a nivel mundial el cual aporta anualmente un número elevado de casos. Los elementos que han impedido el control adecuado de la misma son la deficiente búsqueda activa de los casos considerados reservorios y la multiresistencia del *Mycobacterium tuberculosis*.

La detección oportuna, el tratamiento pertinente y la adherencia terapéutica, son hasta ahora la garantía de interrumpir el proceso de la enfermedad y evitar las resistencias, es sumamente importante para controlar la propagación de la tuberculosis desde aquellos que tengan la enfermedad de tuberculosis activa hacia aquellos que nunca han estado infectados con esta enfermedad. En algunos países con una alta incidencia de esta enfermedad, les aplican una vacuna BCG para prevenir la tuberculosis. Sin embargo, la efectividad de esta vacuna es limitada. Es importante recalcar que no debe descartarse el diagnóstico oportuno de tuberculosis en una persona vacunada que presente dicha enfermedad puesto que la tuberculosis pulmonar puede causar daño permanente a los pulmones e incluso extra pulmonar si no se trata oportunamente

Por tal razón el presente estudio se ha realizado bajo las condiciones metodológicas de una investigación documental donde se plantea los distintos métodos histológicos y modificaciones de la misma para el diagnóstico del *Mycobacterium tuberculosis*, el cual desde hace mucho tiempo se han utilizado, llegando finalmente a la conclusión de que estas técnicas otorgan un diagnóstico y manejo en cuanto al tratamiento del paciente. Llegar a un diagnóstico definitivo

de tuberculosis puede ser difícil, incluso aún en personal con alta experiencia en este campo, el medio más efectivo de control de tuberculosis es identificar y tratar un paciente con tuberculosis activa o infección latente con el objetivo de interrumpir la cadena de transmisión. Existen varias formas de identificar a un paciente con infección tuberculosa activa o no.

Debemos tener en cuenta que las técnicas convencionales son rayos X, RCP, citologías, PPD, baciloscopia de esputo, prueba de tuberculina, cultivos de esputo; pruebas indispensables y más comúnmente utilizadas para el diagnóstico de la tuberculosis, ya que aportan una acción importante para el diagnóstico, permitiendo tener mayor agilidad, precisión y accesibilidad; sin embargo la observación de BAAR en este tipo de muestras deben ser consideradas solo como sospecha de tuberculosis, un ejemplo es el caso de la baciloscopia, el cual es considerado uno de los métodos menos sensibles para el diagnóstico de la tuberculosis, debido a el número estimado de microorganismos necesarios para que el resultado de positivo. Ya que en el caso de la tuberculosis extra pulmonar el número de bacilos presentes es relativamente pequeño;

En cuanto a los métodos sofisticados como al PCR no puede usarse en especímenes extra pulmonares, porque puede alcanzar resultados falsos positivos y solo debe ser usado en esputo; en cuestión al cultivo ocurre que ocasionalmente arrojan un resultado negativo que podría explicarse por la ocurrencia de contaminación del medio de cultivo el cual se presenta con más frecuencia en estos tipos de casos o la posibilidad de que las bacterias presentes en la muestra pierdan su viabilidad durante el proceso de descontaminación o concentración.

Por tal razón se concluye que, la importancia de realizar biopsias y aplicar los métodos histológicos en especímenes de formas extrapulmonares de la tuberculosis, estriba en el hecho de que en muchas instituciones de atención médica y servicios de urgencias no cuentan con otros métodos diagnósticos de reconocida sensibilidad y especificidad por ende el estudio histológico es necesario, recomendable e importante para la detección de la *Mycobacterium*

tuberculosis, incluso también como técnica complementaria con cualquier de los otros métodos convencionales permitiendo la confirmación de la existencia del bacilo en el tejido pleural y simultáneamente estudiar con profundidad el grado de afección de dicha enfermedad.

Es importante comentar que las técnicas histológicas se pueden implementar en instituciones de salud donde las personas normalmente no tienen acceso inmediato a laboratorios médicos especializados, donde se realizan pruebas que dan con el resultado con gran especificidad y de esta forma obtener posibles diagnósticos aproximados que puedan resultar de ayuda antes de tomar decisiones preventivas ante el posible contagio.

Recomendaciones

Cabe destacar que es preciso aumentar las investigaciones en cuanto al *Mycobacterium tuberculosis*, no solo por su afección y contagio sino también en cuanto a su distribución geográfica, puesto que sería de gran utilidad determinar con nuevas técnicas, el riesgo de infección en diferentes zonas permitiendo fundamentar estrategias especialmente para el estudio histopatológico y a su vez mediante estudios científicos y poder encontrar una solución para acabar con esta epidemia empleando así nuevas estrategias para la detección de *Mycobacterium tuberculosis* en la cual se encuentre una forma directa de genes de virulencia dianas para nuevos fármacos y antígenos.

Y con posteriores experimentos optimizar un método histológico que dé con la especificidad inmediata y directa del *Mycobacterium tuberculosis* en tejido pleural, en caso de no contar con otros métodos diagnósticos convencionales y sin la necesidad de posteriormente realizar comparaciones o complementaciones para tener seguridad del resultado. Es necesario comentar que la técnica histológica es un arte y como tal no todos pueden realizarla con igual habilidad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas, A., Fausto, N., Mitchell, R. Patología Humana. 8ª ed. España: Editorial Elsevier Saunders; 2008.
2. Tuberculosis (tisis, TB): definición Autor: Redacción Onmeda (19. marzo 2012)
<http://www.onmeda.es/enfermedades/tuberculosis-definicion-1329-2.html>
3. Gorocica, P., Jiménez M., Garfias Y., Sada I., Lascurain R. Componentes glicosilados de la envoltura de Mycobacterium tuberculosis que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex.2005; v.18 n.2.
4. Cavallini, E., Gamboa M., Hernández F., García J. Bacteriología General: Principios y Prácticas de Laboratorio. Costa Rica: Editorial Universidad de Costa Rica; 2005.
5. García A., Zamudio M. Microbiología Medica. México: universidad nacional autónoma de México. 1998
6. Reyes, A. Revista Latinoamericana de Anatomía Patológica. 1963; Vol. VII, 2, 81-83.
7. Rodríguez, P., Rivera, Z., Suarez, L., Correa, M., Rabucha, A., Suarez, C., Villarroel, A. Tuberculosis pleural. Utilidad de la reacción en cadena de la polimerasa en muestras de tejido. Gac. Méd. 2009; 117 (3): 231-242. Caracas, Venezuela.

8. Suárez, E., Rabucha, A., Correa, M., Blandenier, C. Utilidad de la adenosina deaminasa (ADA), interferón gamma y biopsia pleural para el diagnóstico de tuberculosis pleural. Gac. Méd; 2012; 120(3): 187-197. Caracas, Venezuela.
9. Rubín, Rafael. PATOLOGIA. Fundamentos clinicopatológico en medicina. Sexta edición
10. Oyonarte M. Modulo pleuroscopía Toracoscopía. Rev. chil. enferm. respir. 2008; v.24 n.1. Chile.
11. Nih.gov [internet]. EE.UU: Rockville Pike; [actualizado 26 feb. 2014]. Disponible en:
<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/003863.htm>
12. webdelprofesor.ula.ve [internet] Venezuela: Merida. Disponible en:
<http://www.webdelprofesor.ula.ve/odontologia/carjav/documentos/BIOPSIA.pdf>
13. Rodríguez T., Gerzain J. Glosario ilustrado de dermatología y dermatopatología. 1era edición. Colombia: Univ. Nacional de Colombia; 2004.
14. Ledermann, W. La tuberculosis después del descubrimiento de Koch. Rev Chil. Infect. 2003; vol: 20 48-50. Disponible en:
http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0716-10182003020200015&script=sci_arttext
15. De Naranjo P., Rodríguez G., Rodríguez J., Caldas M. La coloración de Ziehl-Neelsen en histopatología. 1988; Vol. 8,, nos. 3 y 4
16. Panreac.es [Internet]. España: Barcelona. [Única versión]. Disponible en:
<http://www.panreac.es/pdf/pdf01/Tincion-de-Ziehl-Neelsen01.pdf>

17. González S. Contribución de la biopsia pleural al estudio de las enfermedades de la pleura. 1997; vol. 26 No. 2. Chile Disponible en:
[http://biblio.uchile.cl/client/en_US/sisib/search/detailnonmodal/ent:\\$002f\\$002fSD_ILS\\$002f37\\$002fSD_ILS:37452/ada?qu=BIOPSIA+CON+AGUJA.&ic=tru](http://biblio.uchile.cl/client/en_US/sisib/search/detailnonmodal/ent:$002f$002fSD_ILS$002f37$002fSD_ILS:37452/ada?qu=BIOPSIA+CON+AGUJA.&ic=tru)