

Diseño del Kit de Tinción Ziehl Neelsen del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"

Design Kit Ziehl Neelsen the Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"

OSWALDO A GRATEROL R¹, MICHEL E BARRETO E¹, NIDIAN A RAMOS¹, SANDRA FERNÁNDEZ F²,
OMAIRA J DA MATA J², JOSÉ A ANGULO²

RESUMEN

La tinción de Ziehl Neelsen (ZN), es una técnica de coloración de microorganismos para la identificación de patógenos, como *Mycobacterium tuberculosis* causante de la tuberculosis, que requiere de tres (03) soluciones: Carbol Fucsina Fenicada (Fucsina Básica), Azul de Metileno al 1% y Solución Decolorante, que se elaboran en la Sección de Reactivos y Colorantes del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" y se emplean en el diagnóstico de tuberculosis. Esta investigación surgió con el propósito de comprobar el tiempo de caducidad y condiciones de almacenamiento de dichos productos y presentarlos en un estuche tipo kit para su distribución, en apoyo a la Red Nacional de Laboratorios de Salud Pública y comercialización con otros entes. Se realizó el ensayo de tres (3) lotes del kit de Ziehl Neelsen; con su respectiva contramuestra que fue evaluada en el análisis final. Se registraron los parámetros físicos de temperatura y humedad relativa bajo condiciones normales de almacenamiento en el laboratorio, con las muestras protegidas de la luz. Se evaluó la funcionalidad por medio de la tinción ZN observada bajo microscopio, de tres (03) muestras con ATCC 700686: *M. peregrinum* y ATCC 29213: *S. aureus* por lote; tomando en cuenta el exceso de colorante, y la definición de las coloraciones. Estas evaluaciones se realizaron durante dos (02) años encontrándose como resultado que física y funcionalmente los productos contentivos en el kit se mantenían estables, fijándose un tiempo de caducidad de dos (02) años.

Palabras claves: Tinción de Ziehl Neelsen, *M. tuberculosis*, Tinción diferencial, Estabilidad.

SUMMARY

Ziehl Neelsen (ZN) is a staining technique of microorganisms for the identification of pathogens as *Mycobacterium tuberculosis*, causative of tuberculosis, which requires three (03) solutions: Carbol Fuchsin combined with Phenol (Basic Fuchsin), Methylene Blue 1% and Bleaching solution, which are prepared in Section of Reagents and Coloring of the Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" and are used in the diagnosis of tuberculosis. This investigation was made with the purpose of checking the shelf life and storage conditions of these products and present them in a kit type container for distribution in support of the National Network of Public Health Laboratories and marketing with other entities. The analysis was performed in three (3) batches of the Ziehl Neelsen kit; with their respective counter sample that was evaluated in the final analysis. The physical parameters of temperature and relative humidity were recorded in the laboratory under normal storage conditions with samples protected from light. The functionality was evaluated through ZN staining being observed under a microscope three (03) samples with ATCC 700686: *M. peregrinum* and ATCC 29213: *S. aureus* by Batch; taking into consideration the excess dye, and the definition of the colors. These evaluations were conducted for two (02) years found as main result that physically and functionally the products in the kit were stable, and can set an expiration time of two years.

Keywords: Ziehl Neelsen staining, *M. tuberculosis*, differential staining, Stability.

1. Departamento de Medios de Cultivo y Reactivos. Gerencia Sectorial de Producción, Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", e-mail.oswaldo.graterol@inhr.gob.ve Telf.: 0212. 2191777.

2. Departamento de Bacteriología. Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad causada por *Mycobacterium tuberculosis*, una bacteria que casi siempre afecta a los pulmones. Se trata de una afección curable y que se puede prevenir. La infección se transmite de persona a persona a través del aire. Cuando un enfermo de TB pulmonar tose, estornuda o escupe, expulsa bacilos tuberculosos al aire. Basta con que una persona inhale unos pocos bacilos para quedar infectada. La TB es una de las 10 principales causas de mortalidad en el mundo ⁽¹⁾. Según cifras dadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) 10,4 millones de personas enfermaron de TB en 2015 y 1,8 millones murieron por esta enfermedad (entre ellos, 0,4 millones de personas con VIH). Para el mismo año, la OMS reporta que un millón de niños (de 0 a 14 años) enfermaron de TB y 170.000 niños murieron debido a esta causa (sin incluir los niños con VIH). De igual manera, señala que más del 95% de las muertes por TB se producen en países de ingresos bajos y medianos, entre ellos, seis países acaparan el 60% de la mortalidad total; encabeza esta triste lista la India, seguida de Indonesia, China, Nigeria, Pakistán y Sudáfrica. La TB es una de las causas principales de defunción en las personas VIH-positivas: En 2015, el 35% de las muertes asociadas al VIH se debieron a la tuberculosis. Se estima que entre 2000 y 2015 se salvaron 49 millones de vidas gracias a la dispensación de servicios de diagnóstico y tratamiento contra la TB. La OMS señala que acabar para 2030 con la epidemia de TB es una de las metas relacionadas con la salud incluida en los Objetivos de Desarrollo Sostenible adoptados en fecha reciente ⁽¹⁾.

A pesar de que en los últimos años la micobacteriología ha experimentado importantes avances tecnológicos, que permiten la detección rápida mediante pruebas moleculares automatizadas, como la Xpert MTB/Rif® que de forma simultánea detecta la TB y la resistencia a la rifampicina, considerado éste como el fármaco más importante contra esta enfermedad, provee resultados en menos de dos horas desde la recepción de la muestra⁽¹⁾, sin embargo su alto costo constituye una desventaja, en consecuencia el diagnóstico precoz de la TB, sigue recayendo en el examen microscópico de las muestras clínicas, mediante

el uso de la técnica de tinción de Ziehl Neelsen (ZN) ya que es el procedimiento más simple, económico y rápido que proporciona al clínico una orientación diagnóstica preliminar. La tinción de ZN es una técnica de tinción diferencial utilizada para la identificación de microorganismos patógenos, tales como *Mycobacterium tuberculosis*; así como algunos protozoarios del género Apicomplexa (coccidios intestinales) entre otros. La coloración de ZN es la técnica más apropiada para ser utilizada en todos los laboratorios de los países de América Latina. Es la recomendada por la OMS y la Unión Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias (UICTER) por ser la que asegura resultados reproducibles con un entrenamiento sencillo y resulta la más económica⁽²⁾. Los resultados y confiabilidad de esta prueba dependen de la ejecución y de la calidad de los reactivos, siendo esto crucial para el control de la TB.

La tinción ZN se fundamenta en la estructura de las paredes celulares de las micobacterias que contienen lípidos y otros ácidos grasos (ácidos micólicos) de elevado peso molecular, que les confieren la propiedad de resistir la decoloración con alcohol-ácido, después de la tinción con colorantes básicos calientes, por lo que se denominan bacterias ácido resistentes o ácido-alcohol resistentes. La tinción se basa en colocar carbol-fucsina y calentar la preparación ligeramente para solubilizar las ceras, lípidos y otros ácidos grasos de la pared celular para que permita el paso libre del colorante, el cual tiene una enorme afinidad por los ácidos micólicos presentes en la pared. Al enfriar con agua, los componentes de la pared vuelven a solidificar, resistiendo la acción abrasiva del alcohol-ácido, donde el azul de metileno se utiliza como contratinción⁽³⁾.

En esta técnica se emplean tres productos: Carbol Fucsina Fenicada (Fucsina Básica), Solución de Azul de Metileno al 1% y Solución de Alcohol Ácido (soluciones que conforman el Kit de Ziehl Neelsen) ⁽⁴⁾. En el Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" (INHRR) estos productos son elaborados en la Sección de Reactivos y Colorantes y se utilizan de rutina en el laboratorio de Diagnósticos Especiales del Departamento de Bacteriología, para el diagnóstico de TB.

La presente investigación surgió con el propósito de comprobar el tiempo de caducidad y condiciones de

almacenamiento de dichos productos, para dar cumplimiento a requisitos de las Buenas Prácticas de Manufactura como garantía de su calidad ⁽⁵⁾.

De igual modo, al considerar las ventajas de poseer un producto que ha sido preparado según procedimientos estandarizados que aseguran su calidad y garantizan la confiabilidad de los resultados para el diagnóstico precoz de la TB, además esta investigación se planteó responder a la necesidad de disponer de insumos de producción nacional destinados a la identificación de microorganismos patógenos como el *Mycobacterium tuberculosis* causante de la TB, enfermedad que afecta un importante sector de la población venezolana, mediante el diseño y producción del Kit de Tinción ZN del (INHRR).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se prepararon tres (03) lotes del kit ZN, cada uno contenido de: Carbol Fucsina Fenicada (Fucsina Básica), Solución de Azul de Metileno al 1% y Solución de Alcohol Ácido (Decolorante); con su respectiva contramuestra, envasados en frascos ámbar ⁽⁵⁾, elaborados por el mismo operario en la misma fecha y usando los mismos equipos, siguiendo procedimientos documentados.

Los tres lotes se almacenaron en condiciones de ambiente del laboratorio, protegidos de la luz, por un periodo de 02 años, se registraron a diario las variables de temperatura y humedad relativa del cuarto de almacenamiento.

Se evaluó la funcionalidad de tres muestras de cada lote por el método de tinción, con una suspensión de *Mycobacterium peregrinum* (ATCC 700686) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213).

Para ello, se preparó una suspensión de *M. peregrinum* ATCC 700686 y *S. aureus* ATCC 29213, en agua estéril con una turbidez comparable con el Mc Farland 0,5. Posteriormente se realizó la mezcla de 50 uL de cada suspensión, se mezcló y se colocó una gota en la lámina portaobjeto. Se dejó secar y luego se realizó la coloración por la técnica de ZN. Se visualizó con el microscopio a 100X, tomando en consideración: Buena coloración de los bacilos ácido resistentes, coloración de contraste adecuada, definición de la coloración roja y azul, respectivamente, así como la presencia o no de precipitados ^(2,6)

El Procedimiento de tinción y observación de las láminas con el respectivo registro se realizó cada seis (06) meses por espacio de dos (02) años, durante el periodo 2012-2014, según cronograma de evaluación de la tinción.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los registros diarios de las variables temperatura y humedad relativa en el lugar de almacenamiento, en condiciones de temperatura ambiente y protegidos de la luz, se recopilaron 464 datos. Obteniéndose una temperatura promedio de 24,58°C y una humedad relativa de 53,68% (Figura 1).

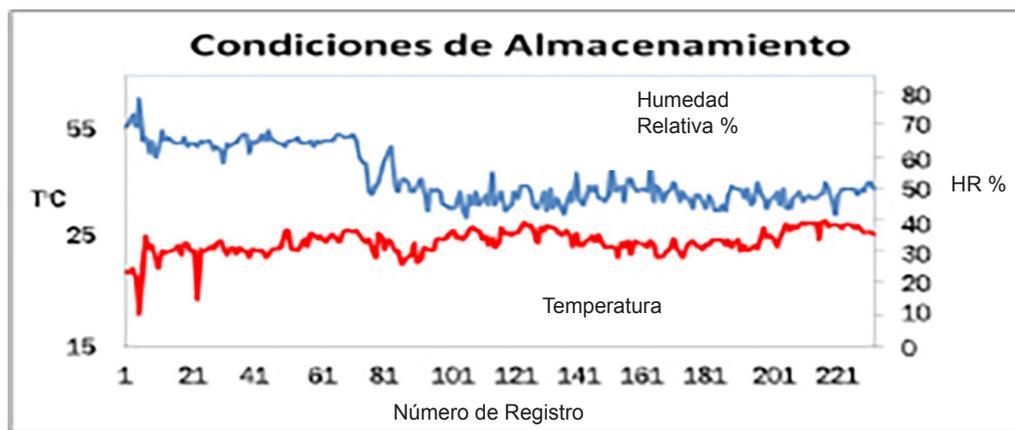


Figura 1. Humedad Relativa y Temperatura registradas durante la investigación

Durante la evaluación funcional se observaron las tinciones con el microscopio a 100X, obteniéndose buena coloración de los bacilos ácidos resistentes, además de adecuada coloración de contraste, sin presencia de precipitados en todas las tinciones realizadas (Figura 2).

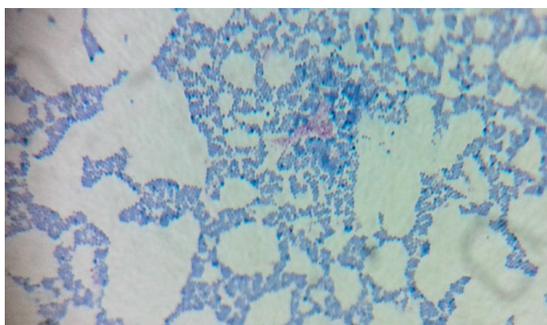


Figura 2. Observación con microscopio 100X *M. peregrinum* ATCC 700686. Coloración roja

CONCLUSIONES

Con base en los resultados de esta investigación se estableció que para los productos que componen el Kit de tinción ZN elaborado en el INHRR, el tiempo de caducidad es de al menos dos años bajo las condiciones evaluadas.

Los resultados de este estudio constituyen un aval para el diseño y producción del Kit de tinción ZN del INHRR, a los fines de responder a la necesidad de disponer de insumos de producción nacional destinados a la identificación de microorganismos patógenos como el *Mycobacterium tuberculosis*.

El trabajo de esta investigación es un soporte para el diagnóstico precoz de la TB, mediante el diseño y desarrollo de un Kit de producción nacional para la tinción ZN, que satisfaga la necesidad de los laboratorios regionales, con indiscutible valor, costo-beneficio, para el control de esta enfermedad, colaborando con la sustitución de importaciones y liberándonos de la dependencia de productos comerciales de alto costo.

REFERENCIAS

- 1) Organización Mundial de la Salud. Nota Descriptiva. 2016. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/>. (Consultado 05 de febrero de 2017).
- 2) Organización Panamericana de la Salud. Manual para el Diagnóstico Bacteriológico de la Tuberculosis. Normas y Guía Técnica. Parte I. 2008. Disponible en: <http://files.sld.cu/tuberculosis/files/2009/12/tb-labs-baciloscopia1.pdf>. (Consultado 07 de septiembre de 2015).
- 3) Tankeshwar, A. Ziehl-Neelsen Technique (AFB Staining): Principle, Procedure and reporting. 2013. Disponible en: <http://microbeonline.com/ziehl-neelsen-technique-principle-procedure-reporting/>. (Consultado 09 de febrero de 2016).
- 4) Ramos N, Graterol O, Barreto M, Márquez M. Manual de Reactivos, Colorantes y Soluciones. Caracas: Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"; 2013. p.25-118.
- 5) Buenas Prácticas de Manufactura para la Industria Farmacéutica 2004. En: Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela N° 38.009, 26 de agosto, 2004.
- 6) Ministerio de Salud. Viceministerio de Salud Colectiva. Norma Oficial Venezolana del Programa Nacional Integrado de Control de la Tuberculosis. Manual para Coordinadores y Laboratorios. Caracas: Ministerio de Salud; 2006.