

## Artículo Original

# Reproducibilidad del método de coloración Naranja de Acridina Fenólica para baciloscopia de lepra y concordancia con el Ziehl Neelsen

María Juliana Araújo  
Marisol Villalobos  
Maritza Rey Pinzón

### RESUMEN

**A**unque el diagnóstico de lepra es clínico, se hace necesario contar con pruebas complementarias como la baciloscopia, que ayuden a su clasificación, control del tratamiento y vigilancia. Puesto que el método de tinción tradicional Ziehl Neelsen (ZN) presenta como desventaja un prolongado tiempo de lectura en muestras con una carga bacilar baja, se requiere buscar nuevas alternativas. Con tal objetivo, se evaluó la reproducibilidad (concordancia intra e interobservador) del método de coloración fluorescente Naranja de Acridina Fenólica (NAF), reportado en la literatura para el diagnóstico de la tuberculosis, y se analizó su concordancia con la coloración ZN.

El trabajo se inició con la estandarización de la coloración y su posterior aplicación en los duplicados de 103 muestras de moco y linfa, con diferentes grados de positividad, provenientes de pacientes con Lepra Lepromatosa, que consultaron al Centro Dermatológico "Federico Lleras Acosta" y se realizó lectura ciega a las placas teñidas con NAF y ZN.

La comparación del tiempo de lectura promedio de los dos métodos de coloración fue realizada con el test de t Student, encontrándose que este tiempo fue significativamente menor con NAF (promedio 9.5 minutos), respecto a ZN (promedio 27.5 minutos) ( $t=8.2$ ;  $p=0.009$ ).

La reproducibilidad interobservador demostró ser **excelente** para las muestras de moco nasal y linfa (Kappa = 1.0 y 0.91 respectivamente); la reproducibilidad intraobservador, evaluada en muestras de linfa, demostró resultados **buenos** para ambos observadores (Kappa = 0.74 y 0.80 respectivamente). La concordancia en la lectura entre los métodos ZN y NAF demostró ser **excelente** para identificar presencia o ausencia de bacilos en las muestras de moco nasal (Kappa = 1.0) y **bueno** para las muestras de linfa (Kappa = 0.68). Referente al análisis del costo directo, se estableció que NAF es más económico.

Debido a la facilidad en su procesamiento, menor tiempo de lectura, reproducibilidad y economía, se recomienda utilizar este método de coloración, como alternativa al ZN, para la clasificación y seguimiento de pacientes multibacilares.

**Palabras clave:** *Mycobacterium leprae*, NAF, ZN.

**María Juliana Araújo, Bacterióloga, Master en Microbiología, Docente, Centro Dermatológico "Federico Lleras Acosta".**  
**Marisol Villalobos, Estudiante de Bacteriología, Pontificia Universidad Javeriana, Santafé de Bogotá.**

**Maritza Rey Pinzón, Médica Epidemióloga, Jefe Docencia e Investigación, Centro Dermatológico "Federico Lleras Acosta", Santafé de Bogotá.**

Correspondencia: María Juliana Araújo, Avenida 1ª No. 13A-61, Santafé de Bogotá, Colombia.

E-mail: Cenderma@impsat.net.co

## INTRODUCCION

La lepra es una enfermedad endémica en países subdesarrollados. El *Mycobacterium leprae* es un bacilo ácido-alcohol resistente (BAAR), no cultivable en medios sintéticos tradicionales, pero capaz de limitar su multiplicación en el cojinete plantar de ratón, el armadillo de nueve bandas, cultivo de fibroblastos y células de Schwann; es intracelular obligado, predominante en macrófagos y tiende a formar paquetes denominados globias.<sup>1,2</sup>

Se plantea como principal vía de entrada la mucosa nasal y posiblemente la piel.<sup>3</sup> La supervivencia del *Mycobacterium leprae* es aproximadamente de 36 horas a 9 días en secreción nasal, y sólo se ha demostrado como reservorio animal el armadillo de 9 bandas (*Dasypus novemcinctus*).

En 1873 Gerhard Henrick Armauer Hansen logró observar al microscopio, en preparaciones de lepromas, la presencia de bacilos<sup>2</sup> que fueron inicialmente clasificados como Gram positivos y luego fuertemente ácido-alcohol resistentes, al colorearlos con carbol-fucsina.<sup>4,5-7</sup>

Sin embargo, pasaron varias décadas antes de lograrse avances en el conocimiento de las características del *M. leprae*, lo cual se consiguió por medio del desarrollo de modelos experimentales tales como la inoculación en almohadilla plantar del ratón y la infección del armadillo<sup>1,2</sup>; estos modelos permitieron la producción abundante de masa bacilar. Posteriormente, empleando técnicas de Biología molecular, se logró el mapeo genético de esta micobacteria, cuya importancia residirá en el establecimiento de las secuencias génicas que codifican los factores de virulencia y moléculas esenciales para su supervivencia, con lo cual se podrán establecer estrategias terapéuticas selectivas y específicas.<sup>8</sup>

En 1960 se combinaron técnicas de microscopía electrónica, de luz y pruebas de viabilidad, para establecer que la irregularidad de la coloración de la bacteria se debe a la pérdida parcial del contenido citoplásmico después de la muerte.<sup>1,4,9,10</sup>

Existen coloraciones fluorescentes para BAAR como Auramina-Rodamina, introducida por Hageman en 1938, que presenta dificultades para su uso, puesto que no hay

un contraste adecuado que permita diferenciar los bacilos del material de fondo.<sup>4,6,8,11-18</sup> En 1982 Katila y Mantyjärvi evaluaron otro método de coloración fluorescente para *M. tuberculosis*, utilizando naranja de acridina más fenol, obteniendo un contraste de rojo-naranja brillante para los bacilos con el material de fondo negro-verde.<sup>16,17</sup>

En el Centro Dermatológico "Federico Lleras Acosta", a los pacientes inscritos en el programa de Hansen se les realizan baciloscopias que se colorean con ZN, encontrándose que la lectura se hace más dispendiosa en muestras de pacientes con una carga bacilar baja. Por tal razón, se ha identificado la necesidad de hallar otra prueba que facilite la detección del *M. leprae*. Como un primer paso en esta búsqueda, se evaluó la reproducibilidad de la coloración Naranja de Acridina Fenólica y su concordancia con el ZN.

## MATERIALES Y METODOS

### POBLACION DE ESTUDIO

Se tomaron las placas originales (coloreadas con ZN) y las copias (sin teñir) de 95 muestras de linfa y 8 de moco, provenientes de pacientes con la enfermedad de Hansen (LL) que consultaron al Centro Dermatológico "Federico Lleras Acosta", con diversos grados de positividad: 12 muestras (+++), 30 (++) , 30 (+) y 30 (-). Los originales fueron leídos en forma ciega y reportados por dos observadores.

Los duplicados se tiñeron con NAF, y fueron igualmente leídos y reportados por los mismos dos observadores, quienes no se comunicaban los resultados.

Para evaluar la reproducibilidad intraobservador, cada uno de los dos observadores realizó una relectura del 30% de las muestras de linfa coloreadas con NAF. Para garantizar el ciego, una persona ajena al estudio se encargó de seleccionar las placas y pasarlas a los observadores, sin que supieran que se trataba de una relectura ni conocieran los resultados iniciales.

Para el análisis de la concordancia entre los dos métodos de coloración, se tomaron 65 pares (ZN y NAF) de placas de linfa y 7 de placas de moco.

## Reproducibilidad del método de coloración Naranja Acridina

### ESTANDARIZACION DE LA COLORACION NAF

Para la estandarización de la coloración NAF se utilizó, como control positivo, una suspensión de lepromina y, como control negativo, frotis de sarro dental, moco nasal de pacientes sanos y frotis de *Klebsiella ozaenae* y *Staphylococcus aureus*.

Las muestras se fijaron con metanol por 2 minutos y con calor por 20 segundos; una vez se estandarizó la técnica de fijación, se aplicó el colorante Bacto Naranja de Acridina ( Difco ) y una preparación del colorante por componentes: cristales de fenol, agua destilada, etanol al 95% y naranja de acridina, empleando diferentes tiempos con el fin de establecer el óptimo para la coloración.

Luego se realizó un lavado empleando soluciones de agua destilada, tampón fosfato pH 7.0 y tampón fosfato pH 4.0. Posteriormente se secaron las láminas a temperatura ambiente, y se realizó la lectura por medio del microscopio de fluorescencia (Carl Zeiss) con objetivos de 10X, 25X y 40X.

Para diferenciar los BAAR de otros microorganismos, se modificó la técnica aplicando una solución de colorante preparada con etanol al 95%, agua destilada, ácido clorhídrico concentrado (37%) y azul de metileno, por tiempos de 10-120 segundos. Además, para verificar la presencia de bacilos por NAF, se realizó una contracoloración con ZN en aquellas placas donde NAF evidenció más bacilos ácido alcohol resistentes.

Por último, se realizó un ensayo para establecer el método de conservación adecuado, empleando glicerol fosfato y almacenándose los controles por seis semanas en refrigeración y congelación protegidos de la luz, realizándose semanalmente una lectura.

### PLAN DE ANALISIS

Los tiempos promedios de lectura fueron comparados mediante el test de *t* de Student, fijándose el nivel de significancia estadística en  $\alpha = 0,05$ .

No se usó la prueba *t* de Student pareada por las siguientes razones:

El test de *t* pareado se utiliza para medir la significancia estadística de la diferencia entre los promedios, en un estudio que implica muestras pareadas y, por lo tanto, la ausencia de independencia. Los sujetos de un estudio pueden ser pareados por tres caminos:

1. Los individuos son pareados a ellos mismos; esto significa que son sus propios controles. Se mide una característica, se aplica algo, y se mide nuevamente. En este caso, las placas leídas son diferentes. Los originales son teñidos con Ziehl Neelsen y las copias con Naranja de Acridina, y se compara el tiempo promedio de lectura con cada coloración para cada observador (Tablas 1, 2).

El único caso en el que se necesitaría una prueba de *t* pareada habría sido si el observador, cuyos tiempos promedio de lectura se están comparando, hubiese recibido un entrenamiento especial después de la primera lectura y, luego de éste, leer las mismas placas, hecho que no ocurrió en nuestro estudio.

2. Los sujetos pueden ser gemelos o hermanos, uno de los cuales es asignado a uno de los grupos de estudio y el otro a otro grupo.
3. Los individuos pueden ser "artificialmente" emparejados, con respecto a uno o más factores sospechosos de tener un efecto de confusión que se desea eliminar.

Ninguno de los últimos fue nuestro caso, como es claro en el capítulo de Materiales y Métodos.

Para el análisis de la concordancia, tanto entre las lecturas de las láminas empleando los dos métodos de coloración como intra e interobservador, se utilizó el test Kappa. Se consideró una concordancia como **mala** con valores de Kappa de 0-0.20, **débil**, 0.21-0.40, **moderada** 0.41-0.60, **buena** 0.61-0.80, **excelente** 0.81-1.0.<sup>18</sup>

El costo directo de los dos métodos de coloración se calculó teniendo en cuenta el valor de los elementos utilizados y el costo de los tiempos de toma, procesamiento y lectura de la muestra.

## Reproducibilidad del método de coloración Naranja Acridina

### RESULTADOS

#### ESTANDARIZACION DE COLORACION NAF

Se estableció que los dos métodos de fijación utilizados (metanol y calor) no demostraron diferencia alguna. Debido a su bajo costo, las muestras se fijaron con calor por 20 segundos.

La optimización de la coloración se logró utilizando el colorante preparado por componentes, y se estandarizó como se describe a continuación:

- Fijación de las muestras con calor por 20 segundos
- Aplicación del colorante por 2 minutos.
- Lavado con agua destilada.
- Aplicación del decolorante por 15 minutos.
- Lavado con agua destilada.
- Secado de láminas a temperatura ambiente.
- Aplicación del líquido de montaje glicerol fosfato.
- Lectura microscópica con objetivo de 10X, 25X.
- Confirmación morfológica con objetivo de 40X.

Empleando esta metodología se observó fluorescencia en la totalidad del control positivo, mientras que en los controles negativos no se observó fluorescencia alguna.

Los controles almacenados en refrigeración mostraron disminución en la fluorescencia a partir de la cuarta semana, mientras que en congelación, a partir de la tercera semana, se observó pérdida parcial de la fluorescencia; por tanto, se estableció como tiempo óptimo de conservación 20 días en refrigeración.

#### TIEMPO DE LECTURA

Los resultados del tiempo de lectura de los dos métodos de coloración se presentan en la Tabla 1 para el observador 1, donde el tiempo de lectura fue significativamente menor con Naranja de Acridina Fenólica respecto al ZN

( $t = 8.18$  y  $p = .0009$ ). El rango de lectura para Naranja de Acridina Fenólica fue de 2-17 minutos y para ZN el rango de lectura estuvo entre 10 y 37 minutos.

En la Tabla 2 se encuentran los resultados de tiempo de lectura del observador 2; el tiempo promedio de lectura, al igual que para el observador 1, fue significativamente menor con NAF en relación con ZN ( $t = 8.95$  y  $p = 0.006$ ). El rango de lectura para NAF fue de 3-20 minutos y para ZN fue de 15-40 minutos.

No se encontró una diferencia significativa en el tiempo de lectura con NAF entre los dos observadores ( $t = 1.44$  y  $p = 0.235$ ).

Ziehl Neelsen		Naranja de Acridina Fenólica	
T. Lectura (minutos)	Frecuencia	T. Lectura (minutos)	Frecuencia
10	2	2	2
13	1	4	1
20	1	5	3
25	2	7	2
28	1	8	4
30	4	10	10
32	1	12	1
35	5	15	4
37	1	17	2

Tiempo Promedio  $27.5 \pm 8.8$  min.  
 $t = 8.18$   $p = 0.009$

Tiempo Promedio  $9.5 \pm 4.1$  min

**Reproducibilidad del método de coloración Naranja Acridina**

**Tabla 2**

**Tiempo de lectura con las dos coloraciones  
Observador 2**

Ziehl Neelsen		Naranja de Acridina Fenólica	
T. Lectura (minutos)	Frecuencia	T. Lectura (minutos)	Frecuencia
15	2	3	1
20	2	4	2
25	2	5	3
30	4	6	1
32	2	7	2
35	2	8	2
37	2	10	4
38	1	12	3
40	1	13	2
		15	4
		18	3
		19	1
		20	1

Tiempo Promedio  $29.2 \pm 7.7$  min  
 $t = 8.95$        $p = 0.006$

Tiempo Promedio  $10.9 \pm 5.1$  min.

**REPRODUCIBILIDAD**

Al analizar la reproducibilidad interobservador (Tabla 3), las lecturas de las muestras de linfa y moco coloreadas con NAF presentaron una concordancia **excelente**, con un Kappa= 0.91 y 1.0 respectivamente.

Los resultados de la reproducibilidad intraobservador (relectura) del observador 1 demostraron una concordancia

buena, Kappa= 0.74; para el observador 2 la reproducibilidad fue **excelente**, Kappa= 0.80.

**CONCORDANCIA ENTRE ZN Y NAF**

La coincidencia en la lectura con los dos métodos de coloración para el observador 2 se presenta en la Tabla 3; se observa una concordancia **buena** (Kappa= 0.68) con las muestras de linfa y **excelente** (Kappa= 1.0) con las de moco nasal.

Los resultados obtenidos con ZN y con NAF, para el observador 1 en muestras de linfa, se relacionan en la Tabla 4. La concordancia global fue **buena** (Kappa= 0.66), pero un análisis detallado permite evidenciar que la concordancia entre los dos métodos es **excelente**, cuando se trata de identificar la presencia o ausencia de bacilos (negativos vs positivos) (Kappa= 0.94), pero disminuye cuando se tiene en cuenta el número de bacilos (una cruz Kappa= 0.61; dos cruces Kappa= 0.32 y tres cruces Kappa= 0.51). Esta diferencia está dada porque NAF detecta una mayor cantidad de bacilos que ZN; sólo en dos muestras coloreadas con ZN la detección (en cruces) fue mayor a la reportada con NAF.

El costo directo de los dos métodos de coloración empleados por lámina con cinco muestras teñidas con NAF fue de \$ 3.476,20 y el de ZN \$ 7.216,70.

**DISCUSION**

Según reportes de literatura, la coloración NAF no ha sido utilizada como prueba complementaria en lepra. Smithwick y colaboradores<sup>17</sup> la utilizaron en tuberculosis como prueba diagnóstica, encontrando una sensibilidad de 1.0 y una especificidad de 0.98 frente al cultivo.

Este trabajo se constituye en una de las primeras aproximaciones de la coloración NAF para la detección de *M. leprae*, basado en la relación entre la familia Mycobacteriaceae por la presencia de ácido micólico en la pared celular.<sup>1,2,13</sup>

**Reproducibilidad del método de coloración Naranja Acridina**

**Tabla 3**  
**Reproducibilidad Intercoloración, Intra e Interobservador**

	N	Coincidencia observada	Concordancia (Kappa)
Intercoloración ZN-NAF			
Observador 2 Linfa	65	0.785	0.680
Moco	7	1.0	1.0
Interobservador NAF			
Linfa	95	0.937	0.912
Moco	8	1.0	1.0
Intraobservador 1 NAF	31	0.806	0.737
Intraobservador 2 NAF	30	0.862	0.803

En el empleo de los colorantes, el preparado por componentes demostró mejores resultados por su capacidad de penetración en la pared celular atribuida al fenol<sup>10,17</sup> y el glicerol fosfato nos permitió una mejor visualización y conservación de la muestra, evidenciándose por la permanencia de la fluorescencia en refrigeración, lo cual permite verificar con lecturas posteriores el grado de positividad de las baciloscopias.<sup>11</sup> No existe diferencia estadísticamente significativa en el tiempo de lectura interobservador, posiblemente debido a la facilidad en el manejo de la técnica. La concordancia intraobservador e interobservador asegura la reproducibilidad del método.

No se hizo validación de la prueba con un patrón de oro, porque el objetivo no es discriminar enfermos de no enfermos. Las láminas que podrían interpretarse como posibles "falsos positivos", ya que el NAF permitió la visualización de bacilos que no se habían detectado por el ZN, fueron contrateñidas con ZN, y en todos los casos se verificó que se trataba de bacilos ZN+. A pesar de lo anterior, la presencia de falsos positivos es posible, tanto para ZN como para NAF, puesto que se trata de coloraciones para

BAAR en general y no para *Mycobacterium leprae* específicamente.

Debido a que la concordancia entre ZN y NAF disminuyó al tener en cuenta la cantidad de bacilos, se realizó una contracoloración con ZN (los duplicados ya teñidos con NAF se colorearon con ZN) para confirmar la presencia de bacilos, obteniéndose entonces una concordancia del 100%. Las discrepancias halladas inicialmente podrían explicarse por una diferencia real entre las muestras, ya que durante el estudio se trabajó con originales (ZN) y con duplicados (NAF) y no con la misma placa, como ocurrió al realizar la contracoloración. A pesar de lo anterior, la presencia de falsos positivos es posible tanto para ZN como para NAF, pues se trata de coloraciones para BAAR en general y no para *Mycobacterium leprae* específicamente.

Por sus características (facilidad de procesamiento, menor tiempo de lectura, reproducibilidad y economía), se recomienda utilizar este método de coloración como alternativa al ZN para determinar la carga bacilar del enfermo de Hansen.

## Reproducibilidad del método de coloración Naranja Acridina

**Tabla 4**  
**Concordancia entre las dos coloraciones en muestras de linfa**  
**Observador 1**  
**NAF**

ZN		(-)	(+)	(++)	(+++)	Total
	(-)	30	0	0	1	31
(+)	1	12	8	0	21	
(++)	0	1	5	4	10	
(+++)	0	0	0	3	3	
Total	31	13	13	8	65	

### ABSTRACT

Although diagnosis in leprosy is essentially based on clinical features, the bacillary index of slit-skin smears is useful for classification, treatment, evaluation and follow-up, especially for multibacillary patients. Traditionally Ziehl Neelsen has been used to identify bacillus from leprosy patients. This method possesses some difficulties because of the long reading time needed, mostly for smears taken from patients on the paucibacillary end of the spectrum. These reasons led us to search for new methods that could make the slit-skin smear lecture easier for the observer, reducing reading time and therefore costs. With this objective in mind, we evaluated the reliability (intra and inter-observer) of Phenolic Acridine Orange Fluorescent stain (NAF), previously reported for the diagnosis of tuberculosis, and its concordance with the traditional Ziehl-Neelsen stain in identifying these microorganisms.

The initial phase included the standardization of the technique. Duplicates of 103 lymph and mucus smears, taken from lepromatous patients in different phases of the disease, were stained with NAF and evaluated by blind

observers, who also evaluated the original ZN stains of the same plates.

Reading time was measured for each plate by each observer. The mean reading time was compared between NAF and ZN by *t* Student test, and it was statistically significantly lower for NAF (mean 9.5 minutes) than for ZN (mean 27.5) ( $t= 8.2$ ;  $p= 0.009$ ). Interobserver reliability was excellent for mucus and lymph smears (Kappa= 1.0 and 0.91 respectively); intraobserver reliability, evaluated on lymph smears, showed good results for both observers (Kappa 0.74 and 0.8 respectively). When we analyzed concordance between both methods for presence or absence of bacilli, it was excellent in mucus samples and good for lymph smears (Kappa= 0.68). Comparison of direct costs for both methods showed that NAF was less expensive than ZN.

We propose NAF as an useful method for the identification of leprosy bacillus from lymph and mucus smears. Due to its easier processing, lower costs and reading time, it could be used as an alternative to ZN staining.

**Key words:** *Mycobacterium leprae*, Acridine Orange, ZN.

## Reproducibilidad del método de coloración Naranja Acridina

### AGRADECIMIENTOS

A las doctoras Luisa Porras, por su apoyo para la realización del trabajo y Amina Meneses, por facilitar el original y la copia de las placas de baciloscopia que sirvieron de base para este trabajo.

### BIBLIOGRAFIA

1. Hastings RC. (ed) Leprosy. New York, Churchill Livingstone. 1995; 331 p.
2. Rodríguez G, Orozco LC. Lepra. Instituto Nacional de Salud. Bogotá, 1996, 222 p.
3. Bhutani LK. Leprosy. The Lancet 1995; 335:697-703.
4. Convit J, Pinaridi ME. A simple method for the differentiation of Mycobacterium Leprae from other mycobacteria through routine staining technics. Int J Leprosy 1972; 40:130-132.
5. Naranjo De P, Rodríguez G, Rodríguez J et al. La coloración de Ziehl Neelsen en histopatología biomédica 1988; 8:84-93.
6. Pfaller M. Application of new technology to the detection, identification, and antimicrobial susceptibility testing of mycobacteria. Clin Microbiol Infect Dis 1994; 329-337.
7. Patterson VK, McDonald C, Miller B et al. Use of UV paralens adapter for detection of acid-fast organisms. J Clin Microbiol 1995; 33:239-241.
8. Maldonado J (ed). El laboratorio clínico y las técnicas de Biología molecular - Un matrimonio indisoluble. Iladiba. 1999; 13:71-72.
9. Allen JA. Modified Ziehl-Neelsen stain for Mycobacteria. Med Lab Sci 1992; 49:99-102.
10. Lipsky B, Gates J, Tenover F et al. Factors affecting the clinical value of microscopy for acid-fast bacilli. Rev Infect Dis 1984; 6:214-222.
11. Cserni G. Auramine fluorescence for acid-fast bacilli in formalin-fixed paraffin-embedded tissues. Am J Clin Pathol 1994; 101:114.
12. Drevets D, Elliott A. Fluorescence labeling of bacteria for studies of intracellular pathogenesis. J Immunol Meth 1995; 185:69-79.
13. Kepner R, Pratt J. Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present. Microbiol Rev 1994; 58:603-615.
14. McCarter Y, Robinson A. Detection of acid-fast bacilli in concentrated primary specimen smears stained with rhodamine-auramine at room temperature and at 37C. J Clin Microbiol 1994; 32:2487-2489.
15. Strumpf Y, Tsang A, Schork A et al. The reliability of gastric smears by Auramine-Rhodamine staining technique for the diagnosis of tuberculosis. Am Rev Respirat Dis 1976; 114:971-976.
16. Daniel T. The rapid diagnosis of tuberculosis: A Selective Review. J Lab Clinic Medic 1990; 116:277-282.
17. Smithwick R, Rigbie M, Ferguson R, et al. Phenolic Acridine Orange Fluorescent stain for mycobacteria. J Clin Microbiol 1995; 33:2763-2764.
18. Sackett D, Haynes R, Guyatt G et al. Clinical Epidemiology, 2ª. ed. Boston/Toronto/London; Little Brown and Company (eds), 1991; 34-61.