

LABORATORIO CENTRAL DE SALUD PÚBLICA Dpto. de Parasitología

PROCEDIMIENTO PARA LA TINCIÓN DE ZIEHL-NEELEN MODIFICADA

Esta tinción es útil para visualizar quistes de protozoos intestinales que tienen la propiedad de ser ácido-alcohol resistente (AAR).

Cryptosporidium es un protozoo (parásito unicelular) intestinal de elevada prevalencia a nivel mundial. Produce predominantemente diarrea acuosa con tendencia a la recurrencia **en niños y personas inmunodeprimidas**.

Cyclospora e *Isospora* suelen producir diarrea persistente, sobre todo en pacientes inmunocomprometidos o con infección por el VIH (principalmente *Isospora*).

A) Material necesario

- Muestra (heces)
- Portaobjetos.
- Aplicador o varillas para hacer la extensión.
- Mechero de alcohol
- Reactivos para la tinción: Agua, Fucsina Fenicada, Alcohol-Ácido y Azul de Metileno.

Preparación de Reactivos

Fucsina fenicada de Ziehl-Neelsen: Para tinción ácido-alcohol resistente.

Fucsina básica.....1,5 g

Etanol 96%.....50 ml

Fenol acuoso.....27,5 ml

Disolver poco a poco la Fucsina básica en etanol 96% hasta disolución completa, luego añadir el fenol y seguir mezclando.

Nota. El etanol es inflamable. El fenol es tóxico y corrosivo

Ácido-Alcohol: (decolorante para tinción Ziehl-Neelsen)

Alcohol/ácido (3 ml de HCl en 100 ml de etanol de 96°).

Ácido clorhídrico para análisis.....3 ml

Etanol 96%.....100 ml

El ácido debe ser agregado en forma lenta sobre el alcohol al tiempo que se agita suavemente la solución.

ADVERTENCIA: el ácido clorhídrico es muy corrosivo. El etanol es inflamable

Azul de metileno: Colorante de contraste

Azul de metileno.....1 g

Agua destilada.....100 ml

B) Procesamiento para la Tinción

1. Etiquetar o identificar el portaobjetos.
2. Tomar una porción pequeña de las heces (principalmente aquellas que contengan moco) con ayuda de un aplicador o una varilla.
3. Hacer una extensión **fin**a sobre el portaobjetos.
4. Dejar secar a temperatura ambiente.
5. Una vez seca, fijar la extensión aplicando calor con ayuda de un mechero.
6. Cubrir la preparación con **FUCSINA BASICA FENICADA** y calentar hasta observar la emisión del primer vapor. Mantener la preparación durante 30 min.
7. Lavar con chorro suave de **AGUA** de canilla
8. Decolorar con **ALCOHOL-ÁCIDO** durante 1 minuto (los quistes AAR de estos parásitos intestinales no se decoloran, permaneciendo de color rojo-fucsia).
9. Lavar con chorro suave de **AGUA** de canilla
10. Cubrir la preparación con el reactivo **AZUL DE METILENO** durante 2 a 3 minutos.
11. Lavar con chorro suave de **AGUA** de canilla
12. Secar la preparación y visualizar en el microscopio con el objetivo 100x (aceite de inmersión).

C) Observación en el microscopio

- Los quistes de estos parásitos se observarán de color de rojo/fucsia sobre fondo azul.
- Se pueden guardar en una caja alguna de las extensiones positivas, para tenerlas como referencia y control positivo.