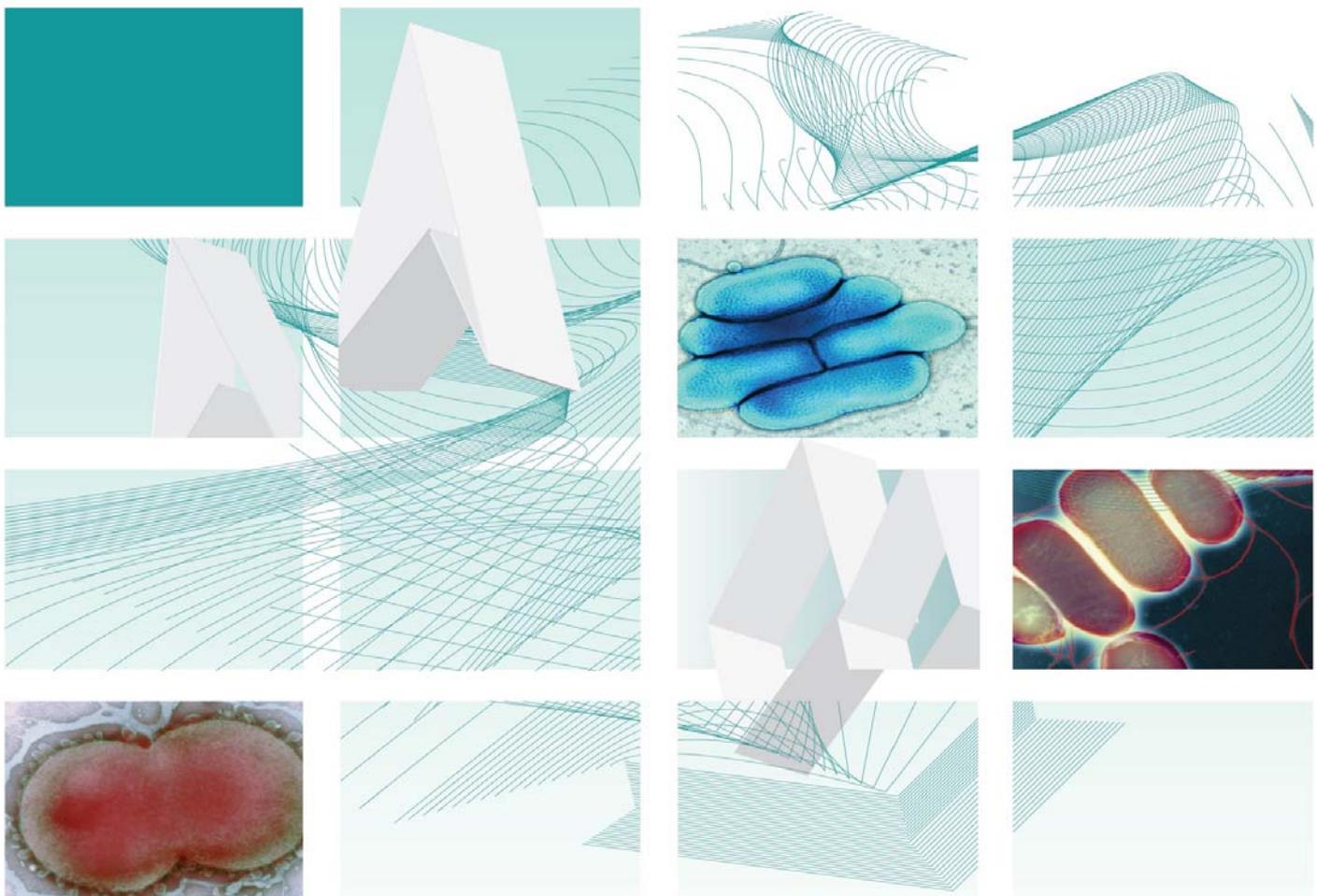




Protezione e miglioramento della salute pubblica nazionale

Ricerche Microbiologiche: Procedure Standard del Regno Unito

Procedure di Colorazione



NICE has accredited the process used by Public Health England to produce Standards for Microbiology Investigations. Accreditation is valid for 5 years from July 2011. More information on accreditation can be viewed at www.nice.org.uk/accreditation.

For full details on our accreditation visit: www.nice.org.uk/accreditation.

Emesso da Standard Unit, Microbiology Services, PHE

Batteriologia-Procedure| TP 39 | Emissione no: 2.1 | Data di emissione: 02.09.15 | Pagina: 1 di 52

Ringraziamenti

Le Procedure Standard del Regno Unito per le Ricerche Microbiologiche (SMI - Standards for Microbiology Investigations) sono sviluppate sotto l'egida della Public Health England (PHE) in collaborazione con il Servizio Sanitario Nazionale (NHS - National Health Service), la Sanità Pubblica del Galles e con le organizzazioni professionali i cui loghi sono di seguito elencati sul sito web <https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories> Le SMI sono sviluppate, revisionate e controllate da diversi gruppi di lavoro che sono supervisionati da un comitato direttivo (consultare <https://www.gov.uk/government/groups/standards-for-microbiology-investigations-steering-committee>).

Si ringraziano per contributi forniti i numerosi operatori dei laboratori clinici, gli specialisti e i laboratori di riferimento che hanno fornito informazioni e commenti durante lo sviluppo di questo documento. Si ringraziano i Revisori Medici per le modifiche apportate ai contenuti clinici.

Per ulteriori informazioni contattare:

Standards Unit
Microbiology Services
Public Health England
61 Colindale Avenue
London NW9 5EQ

E-mail: standards@phe.gov.uk

Website: <https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories>

Numero di accesso alle pubblicazioni della PHE: 2015075

Le Procedure Standard del Regno Unito per le Ricerche Microbiologiche sono sviluppate con la collaborazione di:



I loghi sono aggiornati al momento della pubblicazione

Contenuti

RINGRAZIAMENTI.....	2
CONTENUTI.....	3
TABELLA MODIFICHE.....	5
RICERCHE MICROBIOLOGICHE; PROCEDURE STANDARD DEL REGNO UNITO: SCOPO E OBIETTIVO	6
SCOPO DEL DOCUMENTO	9
INTRODUZIONE	9
INFORMAZIONE TECNICA/LIMITAZIONI.....	9
COLORAZIONI BATTERI	11
1 COLORAZIONE AURAMINA-FENOLO – 1 (PER BACILLI ACIDO RESISTENTI)	11
2 COLORAZIONE GRAM.....	13
3 COLORAZIONE KINYOUN (PER SPECIE <i>MYCOBACTERIUM</i> E <i>NOCARDIA</i>).....	15
4 COLORAZIONE MCFADYEAN	17
5 MODIFICHE METODO DI COLORAZIONE DI KINYOUN.....	18
6 MODIFICA DI SANDIFORD DELLA COLORAZIONE GRAM	18
7 COLORAZIONE SPORE.....	19
8 COLORAZIONE DI VINCENT (PER BATTERI ORALI).....	21
9 COLORAZIONE DI ZEHL-NEELSEN (PER BACILLI ACIDO RESISTENTI).....	22
COLORAZIONI FUNGHI	23
1 COLORAZIONE DI GROCOTT-GOMORI METENAMINA ARGENTO (GMS) (PER FUNGHI).....	23
2 COLORAZIONE LATTOFENOLO BLU COTTON.....	25
3 COLORAZIONE MODIFICATA DI GIEMSA (PER <i>PNEUMOCYSTIS JIROVECI</i>).....	27
4 PREPARAZIONE CON NIGROSINA (INCHIOSTRO DI CHINA)	28
5 IDROSSIDO POTASSIO – PREPARAZIONE CALCOFLUORO BIANCO (KOH-CFW) (PER FUNGHI).....	30
6 COLORAZIONE RAPIDA DI FIELD (PER <i>PNEUMOCYSTIS JIROVECI</i>).....	31
COLORAZIONI PARASSITI.....	32
1 COLORAZIONE ARANCIO DI ACRIDINA (PER <i>TRICHOMONAS VAGINALIS</i>)	32

2	COLORAZIONE AURAMINA-FENOLO – 2 (PER SPECIE <i>CRYPTOSPORIDIUM</i>).....	34
3	COLORAZIONE CALCOFLUORO (PER MICROSPORIDI)	35
4	COLORAZIONE DI FIELD (PER SPECIE <i>PLASMODIUM</i>)	36
5	COLORAZIONE GIEMSA (PER <i>DIENTAMOEBE FRAGILIS</i> E <i>BLASTOCYSTIS HOMINIS</i>).....	38
6	COLORAZIONE GIEMSA (PER SPECIE <i>PLASMODIUM</i>).....	40
7	LUGOL A BASE DI IODIO (PER PARASSITI)	42
8	COLORAZIONE TRICROMICA MODIFICATA (PER MICROSPORIDI).....	43
9	COLORAZIONE MODIFICATA A FREDDO DI ZIEHL-NEELSEN (PER SPECIE <i>CRYPTOSPORIDIUM</i> E <i>ISOSPORA</i>)	44
10	COLORAZIONE RAPIDA DI FIELD (PER <i>DIENTAMOEBE FRAGILIS</i> E <i>BLASTOCYSTIS HOMINIS</i>).....	45
	APPENDICE	47
	BIBLIOGRAFIA	49



NICE ha accreditato la procedura usata dalla Public Health England per elaborare gli Standards for Microbiology Investigations. L'accreditamento è valido per 5 anni dal Luglio 2011. Informazioni più dettagliate sull'accreditamento possono essere consultate: www.nice.org.uk/accreditation.

Per ulteriori informazioni sul nostro accreditamento consultare: : www.nice.org.uk/accreditation

Tabella delle Modifiche

Ciascun metodo SMI possiede una registrazione separata delle correzioni. Quelle attuali sono specificate in questa pagina. Le precedenti modifiche sono disponibili presso standards@phe.gov.uk.

I documenti nuovi o revisionati devono essere controllati in ciascun laboratorio in accordo con il sistema locale di gestione della qualità.

Modifica No/Data.	4/02.09.15
Emissione eliminata. no	2
Emissione inserita no.	2.1
Sezione(i) interessate	Modifica
Pagina 38 colorazione di Field.	Modifiche minori alla sezione.

Modifica No/Data.	3/22.07.15
Emissione eliminata. no	1.2
Emissione inserita no.	2
Sezione(i) interessate	Modifica
Documento intero .	Collegamenti ipertestuali aggiornati al gov.uk.
Pagina 2.	Loghi aggiornati aggiunti.
Scopo del documento.	Lo scopo è stato aggiornato per includere coloranti/ colorazioni utilizzati per la differenziazione delle cellule del sangue, ad esempio, colorazione con blu di metilene utilizzata per la differenziazione dei globuli bianchi (GB). Questa può essere consultata nell'appendice di questo documento.
Introduzione	Questa sezione è stata aggiornata e aggiunta bibliografia.
Informazione tecnica/limitazioni.	Questa sezione è stata aggiornata e aggiunta bibliografia.
Considerazioni sulla sicurezza.	Informazione bibliografia aggiornate ove necessario.
Procedure, risultati e interpretazioni.	Informazione e bibliografia aggiornate ove necessario.
Bibliografia.	Aggiornata parte della bibliografia.

Ricerche Microbiologiche Standard del RU[#]: Situazione

Utilizzatori delle SMI

- Nel Regno Unito sono principalmente destinate come risorsa generale ai professionisti che operano nel campo della medicina di laboratorio e delle malattie infettive.
- Le SMI forniscono ai clinici informazioni in merito allo standard dei servizi di laboratorio riferibili alle ricerche per la diagnosi delle infezioni nei loro pazienti e le documentazioni forniscono indicazioni che facilitano la prenotazione elettronica di tests appropriati.
- Le SMI forniscono gli standard per le ricerche microbiologiche anche ai responsabili della sanità pubblica che devono considerarle come parte delle procedure da adottare per la salute (sia clinica che pubblica) per la propria popolazione.

Informazioni di base per le SMI

Le SMI comprendono algoritmi e procedure raccomandate che riguardano tutte le componenti del processo diagnostico dalla fase pre-analitica (sindrome clinica) alle diverse fasi analitiche (prove di laboratorio) e post-analitiche (interpretazione e comunicazione dei risultati).

Gli algoritmi delle sindromi sono corredati da informazioni più dettagliate contenenti consigli sulle indagini per specifiche malattie e infezioni. Note orientative riguardano il contesto clinico, la diagnosi differenziale e indagini appropriate per particolari condizioni cliniche. Le note orientative descrivono metodologie di laboratorio essenziali che sono alla base della qualità, ad esempio la validazione della prova.

La Standardizzazione del processo diagnostico conseguente all'adozione delle SMI consente di garantire in tutto il Regno Unito strategie d'indagine equivalenti nei diversi laboratori ed è una condizione essenziale per interventi nel campo della sanità pubblica, della sorveglianza, e per le attività di ricerca e di sviluppo.

Coinvolgimento delle organizzazioni professionali

Lo sviluppo delle SMI è condotto nell'ambito della PHE in collaborazione con il NHS, Royal College of Pathologists e con le organizzazioni professionali.

L'elenco delle organizzazioni partecipanti può essere trovato su sito at <https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories>. L'inclusione del logo di una organizzazione in una SMI implica il sostegno degli obiettivi e del processo di preparazione del documento. I rappresentanti delle organizzazioni professionali fanno parte del comitato direttivo e dei Gruppi di Lavoro che sviluppano le SMI. Le opinioni dei rappresentanti possono non essere rigorosamente conformi a quelle dei membri delle organizzazioni a cui appartengono né a quelle delle loro organizzazioni. I rappresentanti prescelti rappresentano uno strumento bidirezionale per la consultazione e dialogo. Le opinioni espresse sono ricercate con un processo di consultazione

[#] Microbiologia è usato come termine generico per includere le due specialità di Microbiologia Medica riconosciute dal GMC (General Medical Council), (che comprende Batteriologia, Micologia e Parassitologia) e la Virologia Medica.

Le SMI sono sviluppate, revisionate e aggiornate con un ampio processo di consultazione.

Assicurazione di qualità

Il NICE (National Institute for Health and Care Excellence) ha accreditato la procedura utilizzata dai Gruppi di Lavoro per produrre le SMI. L'accREDITAMENTO è applicabile a tutte le linee guida prodotte dall'Ottobre del 2009. La procedura per lo sviluppo delle SMI è certificata dalla ISO 9001:2008.

Le SMI rappresentano una procedura standard di buona qualità pratica alla quale si devono attenere per la propria attività tutti i laboratori di microbiologia clinica e di sanità pubblica del Regno Unito. Le SMI sono accreditate dal NICE e non rappresentano gli standard minimi di attività, e neppure il più alto livello di complesse indagini di laboratorio disponibili nel Regno Unito. Utilizzando le SMI, i laboratori dovranno tenere conto delle esigenze locali e intraprendere ricerche addizionali qualora opportune. Le SMI aiutano i laboratori a soddisfare i requisiti dell'accREDITAMENTO con la promozione di procedure d'elevata qualità che possono essere verificate. Le SMI forniscono inoltre un punto di riferimento per lo sviluppo del metodo.

Le prestazioni della SMI dipendono dal personale ben addestrato e dalla qualità dei reagenti e delle attrezzature utilizzate. I laboratori dovrebbero assicurare che tutti i reagenti di tipo commerciale e quelli messi a punto in laboratorio siano stati validati e risultati idonei allo scopo. I laboratori devono partecipare a programmi di valutazione di qualità esterni ed eseguire le relative procedure del controllo di qualità interno.

Coinvolgimento del paziente e della comunità

Nello sviluppo delle SMI i rispettivi Gruppi di Lavoro sono impegnati per favorire il coinvolgimento dei pazienti e dell'opinione pubblica. Grazie al coinvolgimento pubblico, di operatori sanitari, ricercatori e organizzazioni di volontariato la SMI risultante sarà strutturalmente valida e atta a soddisfare le esigenze dell'utente. L'opportunità di partecipazione per contribuire alla consultazione è estesa al pubblico con l'accesso libero al nostro sito web

Informazione della gestione e dei dati sensibili

La PHE è un'organizzazione che condivide le direttive Caldicott. Ciò significa prendere ogni possibile precauzione per prevenire la diffusione non autorizzata di informazioni sui pazienti e di garantire che le informazioni relative agli stessi siano mantenute in condizioni di sicurezza.

Lo sviluppo di metodi SMI è assogGETTO agli obiettivi PHE di Uguaglianza

<https://www.gov.uk/government/organisations/public-health-england/about/equality-and-diversity>.

I Gruppi di Lavoro SMI sono impegnati a raggiungere gli obiettivi di parità di consultazione efficace con gli appartenenti al pubblico, i partner, le parti interessate ed i gruppi specialistici coinvolti.

Dichiarazione legale

Mentre ogni cura è stata intrapresa per la preparazione delle SMI, PHE e ogni altra organizzazione di sostegno, deve, per quanto possibile in base a qualunque legge vigente, escludere la responsabilità per tutte le perdite, costi, reclami, danni o spese derivanti da o connessi all'uso di una SMI o con qualsiasi informazione ivi contenuta. Se si apportano modifiche a una SMI, si deve porre in evidenza dove e da chi sono state effettuate tali modifiche.

Le conoscenze di base e la tassonomia microbica per la SMI sono le più complete possibili, al momento della pubblicazione. Eventuali omissioni e nuove informazioni saranno considerate nel corso della prossima revisione. Queste procedure standard (SMI) possono essere sostituite solo da revisioni dello standard, azione legislativa, o in seguito ad indicazioni da parte dell'ente accREDITATO NICE.

I diritti d'autore delle SMI sono della "Crown" e questi dovrebbero essere riconosciuti quando appropriato

Citazione suggerita per questo documento

Public Health England. (2015). Staining Procedures. UK Standards for Microbiology Investigations. TP 39 Emissione 2.1 <https://www.gov.uk/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories>

Scopo del Documento

Questa procedura comprende i metodi per le procedure di colorazione comunemente utilizzate nei Laboratori di microbiologia clinica per l'identificazione degli agenti patogeni e coloranti/colorazioni usati per la differenziazione delle cellule ematiche, quali la colorazione con blu di metilene utilizzata per la differenziazione dei globuli bianchi (GB) del sangue. Le colorazioni ed i coloranti sono trattati nell'appendice.

Questa SMI dovrebbe essere usata con le altre SMI.

Introduzione

La colorazione è una tecnica importante usata in microscopia per aumentare il contrasto nell'immagine microscopica. Le colorazioni sono utilizzate per evidenziare le strutture nei campioni clinici, spesso quando osservate con l'ausilio di microscopi diversi. Le colorazioni possiedono differenti affinità per microrganismi diversi e sono utilizzate per differenziare i tipi di microrganismi o loro strutture specifiche.

La colorazione prevede: preparazione del campione su vetrini, fissazione (rivolta a mantenere la forma della cellula) colorazione con coloranti e osservazione microscopica.

Informazioni tecnica/limitazioni

Il tempo di ogni fase varia a in funzione della concentrazione e della formulazione delle soluzioni coloranti e degli altri reagenti. Quando possibile, seguire le istruzioni del produttore.

Fase di risciacquo

L'uso di acqua di rubinetto non è consigliato quando si preparano strisci o quando, come in alcuni protocolli di colorazione, si eseguono operazioni di risciacquo, ad esempio nel protocollo Ziehl-Neelsen; *Mycobacterium gordonae* è stato trovato nell'acqua di rubinetto e può interferire con la valutazione accurata del campione che deve essere colorato. Si consiglia acqua deionizzata o distillata¹.

L'eccesso di risciacquo fra le fasi potrebbe inoltre causare un errore nella procedura di colorazione.

Fase di decolorazione

Per i protocolli di colorazione, molti laboratori non adottano tempi fissi di decolorazione e pertanto i risultati possono variare. In alcuni, il personale di laboratorio è istruito ad aggiungere il decolorante goccia a goccia fino a quando il preparato si schiarisce.

Difficoltà di interpretazione dei risultati della colorazione

La tecnica di colorazione è un fattore che influenza i risultati. Ciò può essere dovuto a differenze nella successione delle fasi procedurali dei protocolli che potrebbero essere giustificate se persistono problemi di interpretazione. La standardizzazione dei protocolli ridurrà al minimo la variazione dei risultati. Altri aspetti che possono influenzare i risultati sono¹:

- gli strisci possono essere di difficile lettura quando le culture non sono state sufficientemente mescolate per rompere gli agglomerati rendendo così indistinguibili le singole cellule
- batteri parzialmente acido-resistenti possono inoltre contribuire alla confusione durante la valutazione

- tipo e la qualità di campione/striscio. Gli strisci troppo spessi non saranno leggibili e quelli troppo sottili possono provocare falsi negativi o richiedere la ripetizione della procedura
- reagenti scaduti
- preparazione dei reagenti - questa include la verifica della data di scadenza dei reagenti e la disponibilità di protocolli di garantire concentrazioni appropriate. Possono verificarsi difficoltà di lettura degli strisci quando i reagenti non sono preparati a concentrazioni esatte.
- improprio utilizzo del microscopio

Assicurazione della qualità

In commercio sono disponibili molti metodi di colorazione che sono descritti in questo Standard for Microbiology Investigation (SMI)). Gli utenti devono assicurarsi che i preparati per le colorazioni siano stati sottoposti a rigorosi controlli di qualità. Quando si utilizzano le colorazioni commerciali è importante, ai fini del controllo di qualità, registrare i numeri di lotto e le date in cui sono state utilizzate.

I coloranti preparati in house o diluiti dovrebbero essere controllati per assicurare che non sia presente nessuna contaminazione da microrganismi ambientali.

Ogni volta che si esegue la procedura di colorazione, dovrebbero essere usati vetrini di controllo positivi e negativi, eccetto che per il Gram, per il quale, se non viene utilizzato un nuovo lotto, possono essere sufficienti i controlli positivi. Se la colorazione non è utilizzata di frequente, è consigliabile approntare controlli ogni volta che la procedura è eseguita su un microrganismo sconosciuto. Se i vetrini di controllo non forniscono risultati soddisfacenti, la procedura di colorazione non deve essere accettata. I vetrini positivi e negativi devono essere preparati utilizzando ceppi di riferimento noti.

COLORAZIONI BATTERI

1 Colorazione Auramina-fenolo – 1 (Per bacilli acido resistenti)

Introduzione

Questa tecnica di colorazione è utilizzata per dimostrare la presenza di bacilli acido resistenti (specie *Mycobacterium*). Questi microrganismi possiedono un involucro ceroso che li rende difficili da colorare e decolorare. Il metodo usa una colorazione fluorescente. La colorazione con auramina possiede maggior sensibilità e specificità rispetto al metodo di Ziehl-Neelsen. Si tratta di un metodo migliore se usato per lo screening di campioni da casi sospetti di tubercolosi specialmente nei casi a sede polmonare ed extrapolmonari nei quali la presenza dei bacilli è solitamente ridotta².

L'auramina-rodamina è un'altra colorazione fluorescente che evidenzia i bacilli acido resistenti, in particolare la specie *Mycobacterium*. Anche se non è specifica per i microrganismi acido-resistenti come la colorazione Ziehl-Neelsen, è economica e più sensibile, e come tale viene solitamente utilizzata come metodo di screening³. I microrganismi assumono un aspetto rossastro quando sono colorati con auramina-rodamina.

Considerazioni sulla sicurezza⁴⁻²⁰

Tutti i sospetti appartenenti al complesso *Mycobacterium tuberculosis* complex devono essere processati in una cabina microbiologica con scarico protetto di Classe 1 in ambiente con Livello di Contenimento 3.

Il fenolo è uno dei componenti utilizzati nei metodi con auramina-fenolo per la colorazione degli acido resistenti. Il fenolo è una sostanza chimica pericolosa, se non manipolata con cura, e pertanto il personale di laboratorio deve prestare attenzione. Il fenolo è velenoso, corrosivo e combustibile.

Seguire la valutazione locale del COSHH e la valutazione del rischio durante l'esecuzione di tutte le procedure di colorazione.

Devono essere indossati guanti monouso.

Si sconsiglia l'uso di punte di diamante. Sono raccomandati vetrini smerigliati contrassegnati con matita.

Il materiale strisciato deve essere fissato ponendo i vetrini su una piastra elettrica prima della colorazione (65-75°C). Questa procedura deve essere eseguita in una cabina di Classe 1 con scarico protetto finché il materiale strisciato è essiccato e fissato al vetrino. Questi poi dovrebbero essere inseriti in un adatto contenitore o supporto.

Nota: La fissazione al calore non uccide le specie *Mycobacterium* e i vetrini devono essere maneggiati con cura.

Fare riferimento a [B 40 - Investigation of specimens for *Mycobacterium* species](#).

Metodo²¹

- preparare uno striscio e riscaldare per fissare
- coprire il vetrino con Auramina-fenolo (1: 10v/v) e lasciare agire per 10 minuti
- lavare delicatamente con acqua (garantire che l'acqua sia o deionizzata o distillata)
- decolorare con acido alcool 1% per 3-5 min
- lavare delicatamente con acqua come in precedenza
- ripetere il passaggio acido alcool fino a quando non diffonde altro colorante dallo striscio

- colorazione di contrasto con permanganato di potassio 0,1% o rosso tiazina per 15 sec (questo garantisce uno sfondo scuro per bacilli fluorescenti acido alcool resistenti [AAFB-alcohol and acid fast bacilli] che sono più facili da rilevare). Il KMnO_4 colora tutte le cellule epiteliali rendendo più difficile l'osservazione degli AAFB
- lavare delicatamente con acqua come in precedenza e asciugare all'aria. Non asciugare tamponando su carta assorbente.
- esaminare i vetrini utilizzando microscopia a epifluorescenza ultravioletta con ingrandimento 25 x o 40 x (usare obiettivo di ingrandimento 40 x che evita l'applicazione del coprioggetto)

Nota: Se sono utilizzate confezioni commerciali, seguire le istruzioni del produttore

Interpretazione

Risultato positivo

I bacilli acido resistenti variano da 0.5-10 μm di lunghezza e appaiono di colore giallo-verde brillante su sfondo scuro²¹.

Risultato negativo

Non osservata alcuna fluorescenza. Le cellule non acido-resistenti appaiono scure.

Microrganismi per controllo qualità

Controllo positivo

Specie *Mycobacterium*.

Controllo negativo

Come controllo negativo può essere utilizzato uno striscio negativo accertato.

Informazione tecnica

Tipo di acqua utilizzato

È importante garantire che l'acqua di risciacquo e l'acqua utilizzata per la preparazione del colorante non sia contaminata da batteri acido alcool resistenti ambientali, quali *Mycobacterium gordonae* che è di frequente riscontro nell'acqua di rubinetto e con l'uso di tubature di gomma. Si raccomandano acqua distillata o deionizzata.

Limitazione uso colorazione Auramina fenolo

La più grande limitazione per l'uso diffuso della tecnica di colorazione con auramina fenolo è la necessità di disporre di un microscopio a fluorescenza. Molti laboratori clinici possiedono un microscopio di questo tipo, ma per coloro che non lo hanno in dotazione, la spesa iniziale per l'acquisto di questo strumento può non essere giustificata.

È disponibile una nuova generazione di diodi emettenti luce (LED). Questi sono economici da produrre, emettono luce di qualsiasi tipo di lunghezza d'onda e sono segnalati tempi di funzionalità nell'ordine di 20 000-30 000 ore. Sono così potenti che sono utilizzati per l'illuminazione e hanno anche consentito l'uso della microscopia a fluorescenza con colorazione auramina fenolo nei paesi con scarse risorse e possono fornire un miglior rapporto costo beneficio per migliorare la diagnosi della tubercolosi²²

2 Colorazione Gram

Introduzione

La colorazione Gram è una procedura complessa e differenziale e rappresenta il test più utile eseguito nei laboratori di microbiologia. La procedura di colorazione differenzia microrganismi appartenenti al dominio batterico in funzione della struttura della parete cellulare²³. I microrganismi sono classificati secondo la loro reazione alla colorazione di Gram in Gram positivi e Gram negativi. Il nome "Gram" deriva dal suo inventore, Hans Christian Gram. Le pareti cellulari dei batteri Gram-positivi sono dotate di strati più spessi e densi di peptidoglicano. Lo iodio penetra la parete cellulare di questi batteri e modifica il colorante blu inibendo la sua diffusione attraverso la parete cellulare durante la decolorazione. I batteri Gram-positivi devono avere una parete cellulare intatta per produrre una reazione positiva. Le cellule Gram negative, che non mantengono il cristalvioletto di metile, si colorano con il colorante di contrasto²⁴. Possono essere usati come coloranti contrasto rosso neutro, safranina o carbol-fucsina²⁴.

In ogni modo, anche se la colorazione Gram rappresenta un valido strumento per l'identificazione di un microrganismo batterico, non tutti i batteri possono essere definitivamente classificati con questa tecnica. Ciò ha fatto emergere i gruppi gram-variabili (microrganismi che possono essere negativi o positivi alla colorazione) ed i gruppi di batteri gram-indeterminati (che non rispondono alla colorazione di Gram e, di conseguenza, non possono essere determinati come Gram positivi o Gram negativi, es. i batteri acido resistenti)

Questa tecnica è stata utilizzata anche per la colorazione di alcuni funghi, quali *Candida* e *Cryptococcus*, che si osservano come lieviti Gram positivi.

Considerazioni sulla sicurezza⁴⁻²⁰

Lo iodio è corrosivo e pertanto dovrebbe essere evitate inalazione, ingestione o contatto con la pelle.

Etanolo e acetone sono infiammabili. Entrambi causano irritazione della pelle, occhi e intossicazione quando ingeriti o inalati a lungo

Seguire la valutazione locale del COSHH e la valutazione del rischio durante l'esecuzione di tutte le procedure di colorazione..

Metodo

Modifica di Hucker della colorazione Gram per l'esame degli strisci²³⁻²⁵

- preparare uno striscio e riscaldare leggermente per fissare
- coprire il vetrino con lo 0,5% di cristal violetto e lasciare agire per 30 sec
- inclinare il vetrino, e risciacquare delicatamente con acqua
- versare sufficiente Lugol (1%) per allontanare l'eccesso di acqua, ricoprire con iodio di recente preparazione e lasciare agire per 30 s.
- inclinare il vetrino e lavare lo iodio con l'acqua
- decolorare con 95-100% di etanolo o acetone fino a quando il colore smette di defluire dallo striscio
- risciacquare con acqua
- ricoprire il vetrino con 0,1% di safranina come colorante di contrasto e lasciare agire per circa 30 secondi – 1 minuto

Nota: Il colorante di contrasto può agire per un tempo maggiore se si utilizzano altri coloranti, per esempio, rosso neutro, per circa 2 minuti

- lavare rapidamente con acqua e asciugare
- Esaminare il vetrino con un obiettivo ad immersione per osservare la morfologia cellulare e la colorazione di Gram

Interpretazione

Risultato positivo

I microrganismi Gram-positivi si colorano di blu intenso/viola.

Risultato negativo

I microrganismi Gram-negativi si colorano di rosa/rosso.

Nota: altri coloranti di contrasto (come carbol fucsina) possono fornire colori più intensi.

Microrganismi per controllo qualità

Per il controllo di qualità può essere utilizzata una coltura contenente microrganismi Gram positivi e Gram negativi.

Informazione tecnica

Osservazioni colorazione Gram

La procedura di colorazione Gram non sempre fornisce risultati chiaramente definiti. Sono di esempio:

- alcuni batteri Gram positivi appaiono regolarmente Gram negativi, in modo completo o in parte, per es. specie *Streptococcus* a rapida crescita, forme involutive di *Streptococcus pneumoniae* e alcuni ceppi della specie *Bacillus*. Per questo motivo si raccomanda che per questa procedura siano utilizzate colture molto giovani da terreni non-inibenti dopo che la crescita è divenuta visibile sulle piastre di coltura²³.
- alcuni batteri sottili, come le specie *Haemophilus*, possono facilmente non essere evidenziati se colorati con il metodo Gram, (consultare colorazione modificata di Sandiford),

Alternativa a colorazione di contrasto

Quando nel materiale clinico si sospetta fortemente la presenza di batteri, ma questi non sono rilevati dalla colorazione di Gram, usare le decolorazioni di contrasto alternative (come quelle di Sandiford o Giemsa), e che possono essere utili, quali le colorazioni negative d'inchiostro di china, o preparati umidi.

Errori frequenti nella procedura di colorazione Gram

Questi sono gli errori che sorgono in funzione del metodo e delle tecniche utilizzate e che potrebbero risultare in un microrganismo Gram positivo che si colora come Gram negativo. Queste includono;

- preparazione degli strisci troppo spessi
- calore eccessivo durante la fissazione
- ridotta concentrazione di cristalvioletto

- eccessivo risciacquo tra i passaggi durante la procedura di colorazione. Ciò potrebbe causare la rimozione durante il lavaggio del cristal violetto o del complesso colorante-iodio dalle cellule Gram positive
- insufficiente esposizione allo iodio
- prolungata decolorazione. L'eccessiva decolorazione porterà ad un risultato errato in cui le cellule Gram-positive possono presentare colorazione dal rosa al rosso indicando un risultato Gram negativo, mentre una decolorazione insufficiente porterà ad un risultato errato dove le cellule Gram-negative possono apparire di colore dal blu al viola indicando un risultato Gram positivo. Il grado di decolorazione richiesto è determinato dallo spessore dello striscio
- eccesso di colorazione di contrasto

3 Colorazione Kinyoun (per specie *Mycobacterium* e *Nocardia*)

Introduzione

La colorazione Kinyoun è un metodo per microrganismi acido-resistenti, in particolare *Mycobacterium* e *Nocardia*. La procedura per la colorazione Kinyoun è simile a quella di Ziehl-Neelsen, ma non implica il riscaldamento dei vetrini da colorare. Questo metodo è noto come "colorazione a freddo" perché la fase di riscaldamento è stata rimossa a favore dell'uso della concentrazione di carbol-fucsina più elevata nella colorazione primaria¹.

E' anche più veloce in termini di tempo e più facile da eseguire.

Cosiderazioni sulla sicurezza⁴⁻²⁰

Tutti i sospetti delle specie *Mycobacterium* devono essere processate in una cabina microbiologica con scarico protetto di Classe 1 in ambiente con Livello di Contenimento 3.

Il fenolo è un componente del reagente carbol-fucsina per i metodi Ziehl-Neelsen e Kinyoun per la colorazione degli acido resistenti. Il fenolo è una sostanza chimica pericolosa, se non gestita con attenzione.

Esiste anche il rischio di inalazione durante la procedura di miscelazione del fenolo e pure di contatto con la pelle o con gli occhi¹.

Seguire la valutazione locale del COSHH e la valutazione del rischio durante l'esecuzione di tutte le procedure di colorazione..

Metodo¹

- preparare uno striscio sottile del campione o colonia per la colorazione e fissare in metanolo
- ricoprire il vetrino con carbol-fucsina di Kinyoun e lasciare colorare per 5 minuti a temperatura ambiente. Non è richiesto calore
- lavare delicatamente con acqua fino a quando l'acqua che defluisce scorre chiara
- decolorare con acido-alcool (3% HCl in etanolo) per 3 minuti fino a quando viene rimosso tutto l'eccesso di carbol-fucsina e risciacquare con acqua.

- ripetere la decolorazione con acido-alcool ancora per 1-2min o fino a quando non scorre più colore rosso dallo striscio
- lavare delicatamente con acqua e far defluire l'acqua stagnante dalla superficie inclinando il vetrini
- ricoprire il vetrino con blu di metilene di contrasto e lasciar colorare per 3-4 min
- lavare delicatamente con acqua e lasciare asciugare all'aria
- esaminare a elevato ingrandimento a secco (400X), e confermare le strutture acido-resistenti con obiettivo a immersione ad olio (1000X)

Interpretazione

Risultato positivo

I microrganismi acido-resistenti appaiono rossi.

Risultato negativo

I microrganismi non-acido-resistenti appaiono blu.

Microrganismi controllo qualità

Controllo positivo

Specie *Mycobacterium*

Nocardia asteroides

Controllo negativo

Come controllo negativo può essere utilizzato uno striscio provato negativo.

Informazione tecnica

La carbol-fuxina di Kinyoun contiene una maggiore concentrazione di fenolo e fucsina-basica e per una corretta colorazione non richiede riscaldamento.

Fase risciacquo

L'uso di acqua del rubinetto non è consigliata in alcuni protocolli di colorazione quando si preparano gli strisci o quando si eseguono operazioni di risciacquo; ad esempio con il protocollo di Ziehl-Neelsen, il *Mycobacterium gordonae* è stato trovato nell'acqua di rubinetto e può interferire con la valutazione accurata del campione che deve essere colorato. E' consigliata acqua deionizzata o distillata¹.

Terreni agar

I microrganismi coltivati in terreni contenenti lipidi complessi cresceranno meglio e in genere si coloreranno meglio rispetto a quelli cresciuti su piastre di agar sangue; questo terreno fornisce solo lipidi a livello di sopravvivenza e può limitare la capacità dei microrganismi di evidenziare la proprietà di acido-resistenza dopo colorazione¹.

Altri fattori che possono influenzare i risultati¹:

Alcuni dei fattori che potrebbero influenzare i risultati dell'esame microscopico dei vetrini sono di seguito elencati;

- tipo e la qualità del campione

- numero di micobatteri presenti nel campione
- procedura del metodo di preparazione (diretta o concentrata)
- metodo di centrifugazione
- tecnica di colorazione usata
- qualità dell'esame - questo comprende la formazione e la competenza dell'istruttore e dell'allievo
- prevalenza e gravità della malattia

4 Colorazione McFadyean

Introduzione

La colorazione di McFadyean rappresenta una modifica della colorazione con blu di metilene ed è utilizzata nei campioni clinici per rilevare il *Bacillus anthracis*.

Cosiderazioni sulla sicurezza

Bacillus anthracis appartiene al Gruppo di Rischio 3.

Se clinicamente si sospetta *B. anthracis*, inviare direttamente i campioni al laboratorio di riferimento appropriato senza eseguire ulteriore lavoro / manipolazioni.

B. anthracis provoca malattie gravi e talvolta letali. E' stata segnalata un'infezione acquisita in laboratorio²⁶. La vaccinazione è indicata solo per il personale di laboratorio che lavora di routine con il microrganismo^{27,28}.

In caso di sospetto di *B. anthracis*, tutte le procedure di laboratorio, per esempio la colorazione, deve essere eseguita da personale esperto, in una struttura di contenimento di livello 3 con una cappa di sicurezza di protezione di Classe 1.

Seguire la valutazione locale del COSHH e la valutazione del rischio durante l'esecuzione di tutte le procedure di colorazione.

Metodo^{29,30}

- preparare uno striscio del campione o di una colonia che deve essere colorato e asciugare all'aria.
- ricoprire lo striscio con soluzione di alcol assoluto per circa 3 minuti a asciugare all'aria
- ricoprire il vetrino strisciato con soluzione blu di metilene (0,05 mg/ml in fosfato di potassio 20mM portata a pH 7,3) per 30-45 sec
- Lavare il vetrino delicatamente con acqua o, come precauzione di sicurezza, lavare il vetrino con una soluzione di ipoclorito al 10%
- lasciare asciugare il vetrino all'aria e poi esaminare con immersione ad olio

Interpretazione

Risultato positivo

I bastoncini di *B. anthracis* virulenti appariranno circondati da una zona chiara ben delimitata, dando l'apparenza di una capsula di colore rosso rosa.

Risultato negativo

N/D

Microrganismi controllo qualità**Controllo positivo***Bacillus anthracis***Controllo negativo**

Come controllo negativo può essere utilizzato uno striscio negativo accertato.

Informazione tecnicaSe si sospetta *B. anthracis*, tutti i lavaggi, materiali assorbenti e vetrini devono essere correttamente eliminati e autoclavati.

5 Modifiche metodo di colorazione di Kinyoun

Il metodo di colorazione modificato di Kinyoun prevede l'utilizzo di una soluzione all'1% di acido solforico e non del 3% di HCl come decolorante³¹. La soluzione di acido solforico non decolora con la forza dell'acido cloridrico e questo la rende utile per la colorazione di microrganismi che sono debolmente acido resistenti, come le *Nocardia*. È stata anche utilizzata per la colorazione delle specie di *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Actinomadura* e *Tsukamurella* (consultare [ID 10 - Identification of aerobic actinomycetes](#)). Come colorante di contrasto possono essere utilizzati il Verde Malachite o Verde Brillante, invece del blu di metilene, e di conseguenza i microrganismi non acido resistenti assumeranno colorazione verde anziché blu.

Un'altra modifica alternativa per la decolorazione è quella dell'uso di acido solforico al 20% invece di HCl, seguito da alcol 95%³¹.

6 Modifica di Sandiford della colorazione Gram

Introduzione

La modifica di Sandiford della tecnica di colorazione Gram è stata originariamente utilizzata per dimostrare la presenza di diplococchi Gram negativi intracellulari. Questa tecnica è stata usata con successo per l'identificazione delle specie *Neisseria* e *Haemophilus*³². Il colorante di contrasto migliora anche l'osservazione dei microrganismi Gram negativi e Gram variabili.

Considerazioni sulla sicurezza⁴⁻²⁰

Lo iodio è corrosivo e pertanto dovrebbero essere evitate inalazione, ingestione o contatto con la pelle.

Etanolo e acetone sono infiammabili. Entrambi causano irritazione alla pelle, occhi e intossicazione quando ingeriti o inalati a lungo.

Seguire la valutazione locale del COSHH e la valutazione del rischio durante l'esecuzione di tutte le procedure di colorazione.

Metodo³³

- diffondere un'ansata di campione clinico per ottenere uno striscio sottile su un vetrino sgrassato. Asciugare all'aria

- colorare con cristal-violetto per 2 min
- risciacquare in acqua di rubinetto
- colorazione di contrasto con soluzione di iodio per 2 min
- sciacquare in acqua corrente e asciugare tamponando
- decolorare in acetone alcol per 10-15 sec
- lavare in acqua corrente.
- asciugare
- colorazione di contrasto con soluzione di verde malachite di Sandiford (miscela di 1.5g di pironina Y e 0,5 g di verde malachite) e lasciare agire per 3 min
- coprire il vetrino con acqua (non lavare) e asciugare all'aria

Interpretazione

Risultato positivo

I microrganismi Gram-positivi si colorano di blu/viola intenso.

Risultato negativo

I microrganismi Gram negativi o Grami variabili si colorano di rosa su sfondo blu verde.

Microrganismi controllo qualità

Per il controllo della qualità può essere utilizzata una coltura contenente microrganismi Gram positivi e Gram negativi.

Informazione tecnica

N/D

7 Colorazione spore

Introduzione

Possono essere usati i seguenti metodi per la dimostrazione delle spore nei bacilli Gram positivi.

Considerazioni sulla sicurezza⁴⁻²⁰

Il verde malachite è pericoloso se ingerito e poco pericoloso in caso di contatto con la pelle, occhi e inalazione. Una grave sovraesposizione può portare alla morte.

Seguire la valutazione locale del COSHH e la valutazione del rischio durante l'esecuzione di tutte le procedure di colorazione.

Metodi

Metodo di Schaeffer e di Fulton (come modificato da Ashby)^{34,35}

- preparare uno striscio e riscaldare leggermente per fissare

- posizionare il vetrino su un becher di acqua bollente, appoggiandolo sul bordo con striscio batterico rivolto verso l'alto
- quando appaiono grandi gocce di acqua sulla parte inferiore del vetrino, ricoprire con la soluzione verde malachite al 5% e lasciare agire per 1 min mentre l'acqua è ancora bollente
- risciacquare con acqua fredda
- colorazione di contrasto con 0,5% safranina o 0,05% di fuscina basica per 30 sec
- lavare in acqua fredda e asciugare all'aria
- esaminare il vetrino con olio da immersione con microscopio ottico per la presenza di endospore

Methodo di Wirtz-Conklin^{29,30}

- preparare uno striscio e riscaldare moderatamente per fissare
- ricoprire il vetrino con il 5-10% di soluzione di verde malachite
- lasciare il vetrino a colorare per 45 min o, in alternativa, il vetrino può essere riscaldato delicatamente fino a emanazione di vapore per 3-6 min, rinnovare la colorazione se inizia ad asciugarsi
- lavare sotto acqua corrente
- colorazione di contrasto con il 0,5% di safranina per 30 secondi
- risciacquare e asciugare
- osservare il vetrino con microscopio ottico con obiettivo a immersione a olio (ingrandimento di 1000X)

Interpretazione

Risultato positivo

Le spore batteriche si colorano in verde.

I granuli lipidici rimangono privi di colore.

Risultato negativo

Le cellule vegetative si colorano in rosso. I batteri non sporigeni si colorano in rosa.

Microrganismi controllo qualità

Controllo positivo

Specie *Bacillus*.

Controllo negativo

Microrganismi che non producono spore, ad esempio *E. coli*.

Informazione tecnica

Si deve notare che tutti i residui presenti sul vetrino possono catturare e conservare il colorante verde malachite e pertanto quando si leggono i vetrini si deve usare cautela nell'interpretazione.

Variazioni nelle tecniche di colorazione delle spore

Sono state segnalate molte varianti per la colorazione a freddo. Alcuni usano i reagenti di Schaefer-Fulton, altri quelli di Wirtz-Conklin (entrambi consigliati in questo documento ed in altre SMI). Tutti utilizzano tempi di esposizione più lunghi rispetto a quelli che utilizzano il riscaldamento. Tuttavia, va notato che i metodi a freddo non sembrano essere standardizzati, e sarebbe utile soprattutto che siano utilizzati per dimostrare la presenza di spore e non per descrivere l'entità della sporulazione riscontrata in un campione. Inoltre, alcuni microbi possono non rispondere adeguatamente a questi metodi³⁵.

8 Colorazione di Vincent (per batteri orali)

Introduzione

Questa tecnica è utilizzata per colorare *Borrelia vincentii* (spirocheta che causa l'angina di Vincent) da tamponi orali e faringei. La presenza di numerose *Borrelia vincentii* associate a bacilli Gram negativi fusiformi a palizzata e leucociti polimorfonucleati indica infezione.

Considerazioni sulla sicurezza⁴⁻²⁰

Seguire la valutazione locale del COSHH e la valutazione del rischio durante l'esecuzione di tutte le procedure di colorazione.

Metodo

La procedura della colorazione di Vincent è simile a quella della di Gram, tranne che il colorante di contrasto (1% carbol-fucsina) è applicata per 30 sec.

Interpretazione

Risultato positivo

Borrelia vincentii appare come una spirale colorata in rosa pallido con batteri fusiformi rosa a forma di sigaro.

Nota: E' necessaria la presenza di entrambi i microrganismi per definire la diagnosi della malattia di Vincent.

Risultato negativo

N/D

Microrganismi di controllo

Le *Borrelia vincentii* sono grandi spirochete che variano tra 10-30µm in lunghezza³⁰.

Risultato positivo

Borrelia vincentii.

Risultato negativo

Come controllo negativo può essere utilizzato uno striscio negativo accertato.

Informazione tecnica

La concentrazione corretta del colorante è fondamentale per ottenere risultati accurati.

9 Colorazione di Ziehl-Neelsen (per bacilli acido resistenti)

Introduzione

Questa tecnica di colorazione è utilizzata per dimostrare la presenza di bacilli acido e alcol resistenti (AAFB-acid and alcohol fast bacilli) dotati di involucri cerosi che rendono difficile la colorazione e la decolorazione. In questo metodo il calore è utilizzato per facilitare la penetrazione del colorante primario nelle pareti cellulari cerosi di queste cellule difficili da colorare. L'uso del calore in questo metodo è la ragione per la quale questa tecnica è chiamata "metodo di colorazione a caldo"¹.

La colorazione auramina-fenolo è più sensibile di quella di Ziehl-Neelsen ed è quindi più adatta per la valutazione degli strisci da campioni clinici. Ziehl-Neelsen fornisce dettagli morfologici ed è più utile per confermare la presenza di AAFB nelle colture positive.

Considerazioni sulla sicurezza⁴⁻²⁰

Tutte le specie sospette di *Mycobacterium* devono essere processate in una cabina microbiologica con scarico protetto di Classe 1 in ambiente con Livello di Contenimento 3.

Seguire la valutazione locale del COSHH e la valutazione del rischio durante l'esecuzione di tutte le procedure di colorazione.

I guanti monouso devono essere indossati durante la manipolazione dei reagenti per evitare il contatto con la carbol-fucsina che è cancerogena, mentre l'acido-alcol è corrosivo.

Il fenolo è un componente del reagente carbol-fucsina dei metodi Ziehl-Neelsen e Kinyoun per la colorazione degli acido resistenti. Il fenolo è una sostanza chimica pericolosa, se non gestita con attenzione. E così si deve usare cautela da parte del personale di laboratorio in quanto è velenoso, corrosivo e combustibile.

Si sconsiglia l'uso di punte di diamante. Sono raccomandati vetrini smerigliati contrassegnati con con matita.

Prima della colorazione il materiale strisciato deve essere fissato ponendo i vetrini su una piastra elettrica (65-75°C). Questa procedura deve essere eseguita in una cabina microbiologica di classe 1 con scarico protetto fino a quando il materiale strisciato è essiccato e fissato sul vetrino. I vetrini dovrebbero poi essere inseriti in un contenitore o supporto adatto.

Nota: La fissazione al calore non uccide le specie *Mycobacterium* e i vetrini devono essere manipolati con cura.

Fare riferimento a [B 40 - Investigation of specimens for *Mycobacterium* species](#).

Metodo^{1,21}

- ricoprire il vetrino con carbol-fucsina concentrata
- riscaldare delicatamente la parte inferiore del vetrino fino alla comparsa di vapore, ma non di ebollizione. (Attenzione: il surriscaldamento causa schizzi di colorante e può rompere il vetrino)
- lasciare per 3-5 minuti mantenendo il vetrino umido con il colorante
- lavare il vetrino con un getto delicato e indiretto di acqua deionizzata fino alla scomparsa di colore nell'acqua di lavaggio

- decolorare per 10-20 sec con soluzione (3% v/v) di acido-alcool e poi risciacquare accuratamente con acqua. Ripetere la decolorazione e il lavaggio finché non appare lo striscio colorato vagamente in rosa e l'acqua di lavaggio scorre chiara
- colorazione di contrasto con (1% p/v) di blu metilene o verde malachite per 20-30 sec
- risciacquare con acqua e lasciare asciugare all'aria
- applicare olio di immersione e osservare con microscopio a luce trasmessa

Nota: Se sono utilizzate confezioni di reagenti commerciali pronti all'uso, seguire le istruzioni del produttore.

Interpretazione

Risultato positivo

I bacilli acido resistenti variano da 0.5 a 10µm in lunghezza e si colorano di rossa brillante. Alcuni possono apparire di aspetto granulare²¹.

Risultato negativo

Tutti gli altri microrganismi e lo sfondo del materiale appaiono di colore verde se si utilizza come contrasto il verde malachite o verde o blu se si utilizza blu di metilene.

Microrganismi per controllo qualità

Controllo positivo

Specie *Mycobacterium*

Controllo negativo

Come controllo negativo può essere utilizzato uno striscio negativo accertato.

Informazione tecnica

La colorazione Ziehl-Neelsen è meno sensibile di quella con auramina fenolo. Fornisce dettagli morfologici ed è più utile per confermare la presenza di AAFB in colture positive, ma non dovrebbe essere usato per "confermare" i risultati di campioni clinici che sono positivi con auramina fenolo³⁶.

Con il protocollo di Ziehl-Neelsen, durante il riscaldamento diretto del vetrino o la produzione di vapore, il vetrino non dovrebbe mai essere lasciato essiccare e dovrebbe costantemente avere un contatto con il liquido colorante durante tutta la procedura di colorazione.

1 Colorazione di Grocott-Gomori metenamina argento (GMS) (per funghi)

Introduzione

Tra le colorazioni argentiche, è ampiamente utilizzata la modifica con metenamina argento di Grocott - Gomori (GMS). Il colorante GMS produce una precipitazione argentea, comunemente, usata per visualizzare i funghi nelle sezioni istologiche. Queste sono state utilizzate con successo

per dimostrare la presenza di cisti di *Pneumocystis jirovecii* (già nota come *Pneumocystis carinii*) nei lavaggi broncoalveolari^{37,38}.

La GMS colora anche lieviti, alghe, involucro delle spore e la maggior parte dei parassiti microsporidi, specie *Nocardia* e delle specie *Mycobacterium* e batteri non filamentosi con capsule polisaccaridiche³⁹.

Considerazioni sulla sicurezza⁴⁻²⁰

Seguire la valutazione locale del COSHH e la valutazione del rischio durante l'esecuzione di tutte le procedure di colorazione.

Metodo^{38,40}

Metodo di Mahan e di Sale⁴¹

- fissare il vetrino in metanolo e asciugare all'aria. Deve essere incluso il vetrino di controllo positivo ogni volta che si esegue la procedura di colorazione
- ricoprire il vetrino con soluzione di acido cromico 10% per 10 min
- sciacquare in acqua distillata per pochi secondi
- ricoprire il vetrino con 1% sodio metabisolfito per 1min
- risciacquare bene con acqua distillata calda
- porre il vetrino in soluzione di lavoro metenamina argento pre-riscaldata in un bagno di acqua a 60°C per 15 a 20 minuti fino a quando la parte del vetrino strisciata con il campione assume colore marrone giallastro

Nota: La soluzione di nitrato d'argento metenamina deve essere di recente preparazione prima dell'uso e può essere usata una sola volta. Altre soluzioni possono essere utilizzate nuovamente per un periodo di un mese avendo provveduto che non si manifesti contaminazione fungina

- risciacquare bene con acqua distillata
- immergere il vetrino (o inondare il vetrino su un supporto per colorazione) in una vaschetta di Coplin contenente 1% di cloruro d'oro per 10 sec
- risciacquare bene con acqua distillata
- ricoprire il vetrino con il 2% (o il 5%, come raccomandato da Larone) di tiosolfato di sodio per 1-2 min³⁸
- lavare in acqua distillata per 30sec
- colorare il vetrino con soluzione di contrasto verde brillante * per 30sec
- lavare due volte l'eccesso di verde brillante dal vetrino con il 95% o di alcol assoluto (etanolo)
- immergere due volte in xilene
- porre una goccia di mezzo di montaggio del sul vetrino (es DPX), e coprire con coprioggetto

* Sciogliere 0,2 g di verde brillante in 0,2 ml di acido acetico glaciale in 100 ml di acqua distillata per preparare una soluzione verde di scorta. Per preparare la soluzione di lavoro, diluire 10 ml di soluzione verde di scorta in 40 ml di acqua distillata.

Metodo di Shimono e Hartman

La procedura è una modifica rapida del metodo a caldo di Mahan e Sale con metenamina argento, tranne per il tempo richiesto per riscaldare la soluzione di metenamina in quantità che è eliminata durante le manipolazioni generali della soluzione calda. In questo metodo, la soluzione è invece stratificata sui vetrini e riscaldata direttamente per circa 1 minuto, oppure è versata in una piastra di petri e riscaldata per circa 4-5 min. Infine, è di solito necessario un minor volume della soluzione di metenamina, con conseguente riduzione dei costi.

Interpretazione

Risultato positivo

Le ife fungine e i corpi dei lieviti si colorano in nero.

Anche le cisti di *Pneumocystis jirovecii* (4-7µm di diametro, prive di gemmazioni) si colorano in nero (e tipicamente collassano in varie forme - tonde, ovoidali o a mezzaluna), ma non i trofozoiti. Questi appaiono come punti neri a forma di "virgola" singola o doppia o come serie di "parentesi".

Il colore di fondo rimane verde.

Risultato negativo

Come controllo negativo può essere utilizzato uno striscio negativo accertato.

Microrganismi controllo qualità

Pneumocystis jirovecii e altri funghi positivi noti.

Controllo negativo

Come controllo negativo può essere utilizzato uno striscio negativo accertato.

Informazione tecnica

Lo svantaggio principale della GMS è che maschera il colore naturale dei funghi pigmentati, rendendo impossibile stabilire se un fungo è ialino, incolore o pigmentato. Per esempio, nella diagnosi di micosi causate da funghi dematiacei quali feoifomicosi, questa determinazione è cruciale³⁹.

E' stata anche utilizzata un'altra colorazione alternativa per funghi con acido Periodico di Schiff o Gridley e ottiene all'incirca le caratteristiche della colorazione GMS nell'identificazione dei funghi. In realtà presenta la morfologia fungina meglio della colorazione GMS.

Quando si sospetta la presenza di elementi fungini vecchi e non vitali, può essere richiesto un tempo di colorazione prolungato.

2 Colorazione lattofenolo cotton blu

Introduzione

Il lattofenolo cotton blu (LPCB) è la soluzione colorante più utilizzata nell'esame di lieviti e muffe e serve come colorante e liquido di montaggio nei preparati umidi⁴². E' semplice da preparare. Contiene tre componenti: fenolo, che ucciderà eventuali microrganismi viventi; acido lattico che

conserva strutture fungine e cotton blu che colora la chitina nelle pareti cellulari fungine. Dopo l'aggiunta di lattofenolo cotton blu i funghi si colorano di blu e ciò consente una più semplice visualizzazione dell'esame.

Possono essere utilizzate altre colorazioni alternative quali la Lattofucsina o la colorazione con blu anilina e queste hanno gli stessi principi della colorante LPCB. Se eseguita correttamente, la colorazione con Lattofucsina può conservare per diverse settimane la struttura e la disposizione delle ife, se presenti.

Considerazioni sulla sicurezza⁴⁻²⁰

Il lattofenolo cotton blu è acido mentre la Lattofucsina è corrosiva. Possono essere tossici per inalazione, contatto con la pelle e per ingestione.

Seguire la valutazione locale del COSHH e la valutazione del rischio durante l'esecuzione di tutte le procedure di colorazione.

Metodo³⁸

- mescolare il campione quale un raschiamento cutaneo, essudato liquido o tessuto con due gocce di KOH 10% su un vetrino pulito.
- aggiungere al vetrino una, o al massimo due gocce di lattofenolo cotton blu di montaggio/colorante
- premere delicatamente il coprioggetto per ottenere un preparato sottile evitando la formazione di bolle d'aria. Il riscaldamento moderato può anche aiutare a rischiarare il preparato
- esaminare il preparato su vetrino a basso ingrandimento (x100) con ridotta illuminazione. Aumentare l'ingrandimento (X430) per verificare la presenza di presunti elementi fungini.

Nota: se si esamina una coltura fungina, rimuovere una piccola porzione della colonia dalla superficie dell'agar e continuare dal passaggio precedente 2.

Sono disponibili preparazioni commerciali che, se usate, devono rispettare le istruzioni del produttore.

Interpretazione

Risultato positivo

Cellule del lievito, micelio e strutture fruttificanti si colorano in blu delicato mentre lo sfondo appare in azzurro pallido appena percettibile.

Risultato negativo

L'assenza di elementi fungini indica un risultato negativo.

Microrganismi controllo qualità

Controllo positivo

Come controllo positivo può essere utilizzato un campione positivo accertato..

Controllo negativo

Come controllo negativo può essere utilizzato uno striscio negativo accertato.

Informazione tecnica/limitazioni

Il lattofenolo cotton blu è utile solo nella colorazione di lieviti e muffe e quando è utilizzato come mezzo di montaggio. Tuttavia, questa procedura di colorazione non sempre conserva la posizione originale e la struttura di conidi, spore, e altri elementi caratterizzanti³⁸.

3 Colorazione modificata di Giemsa (per *Pneumocystis jirovecii*)

Introduzione

La colorazione di Giemsa è stata utilizzata di routine per evidenziare la presenza di *Pneumocystis jirovecii* in strisci di lavaggio bronco-alveolare (BAL) da pazienti con polmonite o negli immunocompromesi⁴³. I trofozoiti e i corpi presenti all'interno di cisti intatte possono essere colorati con Giemsa, ma la parete cistica non assume questo colorante.

Negli ultimi anni è stata sviluppata una modifica di questa colorazione, provvedendo alla solfatazione degli strisci prima della colorazione Giemsa; questa innovazione modifica apparentemente la superficie delle cisti di *P. jirovecii* in un modo da consentire al colorante Giemsa di reagire sia con le cisti che con i trofozoiti di *P. jirovecii* da visualizzare. Questa procedura evidenzia anche tutte le fasi del BAL o dell'espettorato), e ciò è particolarmente utile, considerando la prevalenza della polmonite da *P. jirovecii* polmonite associata alla diffusione dell'AIDS^{43,44}.

Cosiderazioni sulla sicurezza⁴⁻²⁰

Seguire la valutazione locale del COSHH e la valutazione del rischio durante l'esecuzione di tutte le procedure di colorazione.

Metodo⁴⁴

- preparare la diluizione 1 a 10 del colorante Giemsa in acqua tamponata a pH 7.2. Questa dovrebbe essere preparata al momento
- allestire uno striscio dal sedimento centrifugato del BAL e lasciare asciugare all'aria
- fissare lo striscio del BAL con etanolo o utilizzando il calore
- immergere il vetrino nel reagente di solfatazione* (usando le pinze) per 10 min
- Lavare in acqua corrente per 5 min
- coprire il vetrino con colorante diluito di Giemsa e lasciar reagire per 30 min
- far scorrere l'acqua di rubinetto sul vetrino per allontanare il colorante e per prevenire la precipitazione sullo striscio, lasciare asciugare all'aria
- montare sul vetrino un coprioggetto utilizzando qualsiasi mezzo di montaggio adatto o esaminare a ingrandimento ridotto o con obiettivo ad immersione in olio a basso ingrandimento senza aggiungere coprioggetto

* In una vaschetta di Coplin aggiungere lentamente 15mL di acido solforico concentrato a 45mL di acido acetico glaciale. Questa deve essere mantenuta in posizione verticale in un recipiente contenente acqua di rubinetto fredda (non inferiore a 10°C). La soluzione è miscelata delicatamente in recipiente sigillato con vaselina.

Interpretazione

Risultato positivo

I nuclei e la cromatina del parassita si colorano in rosso. Le cisti sono da ovali a circolari, di circa 5µm di diametro. Il contorno della cisti è generalmente rosso porpora e la parte centrale della cisti viola, sebbene il colore esatto vari nelle diverse parti dello striscio con prevalenza di tinte rosse in alcune aree e blu in altre.

Risultato negativo

I nuclei dei leucociti si colorano di viola, il citoplasma è grigio-bluastro, batteri e lieviti sono di colore blu scuro.

Microrganismi controllo qualità

Controllo positivo

Pneumocystis jirovecii

Controllo negativo

Come controllo negativo può essere utilizzato uno striscio negativo accertato.

Informazione tecnica

La colorazione di *Pneumocystis jirovecii* è più frequentemente ottenuta con metodi specifici usando anticorpi per immunofluorescenza o con la colorazione metanamina argento di Grocott-Gomori. Sono sempre più utilizzati metodi diagnostici alternative come la Polymerase chain reaction (PCR).

4 Preparazione con nigrosina (inchiostro di china)

Introduzione

L'utilizzo della nigrosina rappresenta una tecnica di colorazione negativa utilizzata per determinare la morfologia cellulare di un microrganismo. Lo sfondo è colorato, mentre il microrganismo rimane privo di colorazione e la sua morfologia non è falsata in alcun modo. Le capsule spostano il colorante e appaiono come aloni che circondano il microrganismo²⁴.

Questa colorazione fornisce un elevato grado di contrasto non disponibile in molte altre procedure di colorazione. È particolarmente indicata per la dimostrazione della capsula di *Cryptococcus neoformans* e può anche essere usata per evidenziare la presenza delle capsule batteriche e dei lieviti.

Considerazioni sulla sicurezza⁴⁻²⁰

Seguire la valutazione locale del COSHH e la valutazione del rischio durante l'esecuzione di tutte le procedure di colorazione.

Metodo^{24,31}

- porre una goccia di inchiostro di china su un vetrino pulito
- aggiungere 1 goccia di campione o coltura liquida o strofinare un frammento di materiale sulla superficie del vetrino accanto all'inchiostro prima di mescolarli nell'inchiostro. Espettorato o pus possono essere chiarificati con KOH e calore e poi mescolati con l'inchiostro di china

Nota: Se la preparazione è troppo scura, può essere diluita con una piccola goccia d'acqua

- mettere un coprioggetto sullo striscio evitando la formazione di bolle d'aria, premere con delicatezza usando un foglio di carta assorbente in modo che lo striscio diventi molto sottile e di colore chiaro
- esaminare con obiettivo ad elevato ingrandimento (microscopio a contrasto di fase) per rilevare la presenza di cellule incapsulate

Interpretazione

Risultato positivo

I microrganismi che possiedono una capsula appaiono molto rifrangenti, circondati da un'area chiara o da un alone su sfondo scuro.

I leucociti possono anche apparire con un aureola dovuta a perdite del citoplasma, ma in periferia l'alone ha un aspetto irregolarmente sfrangiato e all'interno della cellula l'alone presenta una parete cellulare più pallida.

Nota: Sono stati segnalati alcuni ceppi di *Cryptococcus neoformans* che sono negativi alla colorazione con inchiostro di china⁴⁵.

Risultato negativo

Nessuna zona chiara attorno al microrganismo osservato.

Microrganismi controllo di qualità

Controllo positivo

Cryptococcus neoformans o altri microrganismi capsulati.

Controllo negativo

Come controllo negativo può essere utilizzato uno striscio negativo accertato. *Candida albicans* potrebbe essere utilizzata in quanto priva di capsula.

Informazione tecnica

Sensibilità

Il test al lattice con antigene criptococcico ha dimostrato di essere nettamente più sensibile della preparazione con inchiostro di china ed è quindi consigliato per la diagnosi iniziale della malattia criptococcica³⁸.

Errori più comuni con questa colorazione sono;

- uso di inchiostro diluito. La corretta concentrazione di inchiostro di china è fondamentale per mostrare l'area capsulare
- striscio sul vetrino troppo spesso. E' richiesto un appropriato addestramento del personale di laboratorio per ottenere strisci soddisfacenti²⁴

5 Idrossido di potassio – preparazione calcofluoro bianco (KOH-CFW) (per i funghi)

Introduzione

Il colorante può essere utilizzato per l'esame diretto della maggior parte dei campioni usando la microscopia a fluorescenza. L'uso del calcofluoro bianco, un fluorescente brillantante con l'aggiunta di idrossido di potassio (KOH), renderà migliore la visualizzazione degli elementi fungini nei campioni osservati all'esame microscopico. Il calcofluoro bianco si lega aspecificamente alla chitina e alla cellulosa nella parete cellulare fungina ed emette fluorescenza da verde brillante a blu in funzione dei filtri ultravioletti utilizzati. Deve essere prevista una considerevole quantità di fluorescenza non specifica da materiali cellulari umani e da fibre naturali e sintetiche. Il calcofluoro bianco evidenzia le strutture sospette ma la loro interpretazione si avvale delle tradizionali caratteristiche morfologiche fungine. I preparati KOH-CFW possono essere conservati per diversi giorni a 4°C in camera umida³⁸.

Per ulteriori informazioni sulla preparazione dei campioni clinici che utilizzano idrossido di potassio, consultare [B 39 - Investigation of dermatological specimens for superficial mycoses](#).

Considerazioni sulla sicurezza⁴⁻²⁰

Per ulteriori informazioni su questa sezione, consultare in appendice la preparazione con KOH.

Seguire la valutazione locale del COSHH e la valutazione del rischio durante l'esecuzione di tutte le procedure di colorazione.

Metodo³⁸

- posizionare il campione da esaminare su un vetrino pulito da microscopio
- aggiungere una goccia di 10-30% KOH e una goccia di soluzione di calcofluoro bianco (0,1%), o miscelare in volumi uguali prima della procedura
- mescolare e mettere un copri oggetto sopra il campione distribuito sul vetrino. Lasciare digerire per almeno 20 min a temperatura ambiente o per un tempo inferiore. Spesso sono richiesti pochi minuti perché il calcofluoro bianco penetri nel microrganismo. Il campione dovrebbe poi essere schiacciato per ottenere un singolo strato monocellulare
- esaminare con microscopio a fluorescenza (360-370 nm) per fluorescenza blu-bianca

Nota: La sorgente luminosa richiesta è una lampada a vapori di mercurio. Un'altra fonte di luce alternativa è fornita dalle nuove generazioni di diodi fonte di luce (LED); questi sono potenti e emettono luce di qualsiasi lunghezza d'onda. Durano più a lungo e sono anche a basso costo di produzione. Le lampade alogene non sono di solito adatte in quanto emettono ridotti livelli di energia.

Interpretazione

Risultato positivo

Le pareti cellulari fungine appariranno colorate dal verde brillante al blu-bianco in funzione dei filtri ultravioletti utilizzati, con uno sfondo rossastro molto più attenuato.

Risultato negativo

Non si osserva fluorescenza.

Microrganismi controllo qualità**Controllo positivo**

Una sospensione di un lievito o muffa, per esempio di specie *Candida* o *Aspergillus*.

Controllo negativo

Una soluzione priva di funghi.

Informazione tecnica/limitazione**Trattamento di campioni delle unghie**

È importante che i campioni delle unghie siano pre-ammorbiditi prima dell'aggiunta di calcofluoro bianco, in caso contrario questo non sarà in grado di penetrare nel tessuto. Per ulteriori informazioni sul trattamento dei campioni di unghie, consultare [B 39 - Investigation of dermatological specimens for superficial mycoses](#).

Alternative per sbiancanti ottici

KOH può essere utilizzato anche con sbiancante ottico, il Blankophor migliora il rilevamento di elementi fungini nei campioni clinici⁴⁶.

Filtri di blocco UV

Si deve notare che per salvaguardare la sicurezza dell'occhio, non sono raccomandati i filtri di blocco che permettono la trasmissione di lunghezze d'onda più corte e rendono bianchi gli elementi su sfondo blu³⁸.

Controllo di qualità

Il controllo di qualità deve essere eseguito di routine per garantire la qualità del reagente, la procedura e la microscopia³⁸.

6 Colorazione Rapida di Field (per la polmonite da *Pneumocystis jirovecii*)

Introduzione

Questa è una tecnica di colorazione per rilevare la presenza di *Pneumocystis jirovecii* nel lavaggio broncoalveolare (precedentemente nota come *Pneumocystis carinii*).

Considerazioni sulla sicurezza⁴⁻²⁰

Seguire la valutazione locale del COSHH e la valutazione del rischio durante l'esecuzione di tutte le procedure di colorazione.

Metodo

Per eseguire questa procedura di colorazione, consultare la colorazione rapida di Field per i protozoi parassiti - *Dientamoeba fragilis* e *Blastocystis hominis*.

Interpretazione

Risultato positivo

Le pareti delle cisti di *P. jirovecii* non saranno colorate ma lo saranno le forme trofiche. I trofozoiti assumono colore blu pallido e i nuclei appaiono come puntini rossastri isolati circondati da un alone pallido.

Risultato negativo

I batteri si colorano in blu scuro, i nuclei dei leucociti in viola e il citoplasma dei leucociti in grigio-azzurro.

Microrganismi controllo qualità

Controllo positivo

Pneumocystis jirovecii

Controllo negativo

Come controllo negativo può essere utilizzato uno striscio negativo accertato.

Informazione tecnica

La colorazione per *Pneumocystis jirovecii* è più comunemente eseguita con metodi specifici con anticorpi per immunofluorescenza, colorazione con acido periodico di Schiff o colorazione argentea. Sono sempre più utilizzati metodi diagnostici alternativi come la PCR.

COLORAZIONE PARASITI

1 Colorazione arancio di acridina (per *Trichomonas vaginalis*)

Introduzione

L'arancio acridina è un fluorocromo che colora in modo differenziale i nuclei dei microrganismi. Il metodo di colorazione è semplice e permette un rapido, accurato e preciso esame microscopico. Questa tecnica può essere usata per la dimostrazione di *Trichomonas vaginalis* negli strisci vaginali. È stato anche raccomandato nella diagnosi di vaginosi batterica per l'identificazione rapida delle cellule del lievito e delle clue cells⁴⁷⁻⁴⁹.

Considerazioni sulla sicurezza⁴⁻²⁰

L'arancio di acridina è un colorante arancione che può causare irritazione delle vie respiratorie e degli occhi di persone predisposte. Se ingerito, può anche essere nocivo.

Seguire le indicazioni locali del COSHH e la valutazione del rischio durante l'esecuzione di tutte le procedure di colorazione.

Metodo^{47,50}

- preparare uno striscio e asciugare all'aria (i vetrini devono essere processati entro 24 ore)
- colorare il vetrino con la soluzione arancio di acridina per 5-10 sec
- lavare per allontanare il colorante, e decolorare lo striscio con soluzione alcolica salina per 5-10 sec

- lavare lo striscio con soluzione fisiologica (0,85% p/v di cloruro di sodio) e asciugare ponendo il vetrino su un supporto idoneo
- aggiungere allo striscio una goccia di soluzione fisiologica o acqua distillata e coprire con un coprioggetto
- Esaminare lo striscio con microscopio a fluorescenza con filtro di eccitazione BG 12 e una combinazione di filtri di sbarramento n° 44 e n° 53 (con lunghezze d'onda di eccitazione a 470nm e di emissione rispettivamente a 530 e 650nm)
- esaminare dapprima con l'obiettivo x10 per osservare la distribuzione di materiale fluorescente, e quindi con l'obiettivo x40 per ricercare *T. vaginalis* e rilevare anche le cellule del lievito, clue cells e batteri

Nota: soluzione fisiologica con alcol è costituita da 5 ml di etanolo assoluto (o metanolo) e 245mL di 0,85% p/v di cloruro di sodio.

Interpretazione

Trichomonas vaginalis è di solito a forma di pera con dimensioni medie di circa 10 x 7µm⁵¹.

Risultato positivo

I trofozoiti di *Trichomonas vaginalis* si colorano in rosso mattone con nucleo giallo-verde a forma di banana o tondeggiante.

Risultato negativo

I lieviti si colorano di rosso con nucleo verde brillante, ma sono notevolmente più piccoli e morfologicamente diversi. Sono facilmente distinguibili dai trichomonadi.

Cellule epiteliali mostrano* fluorescenza luminosa giallo-verde con nucleo verde brillante.

I leucociti (cellule del pus) mostrano solo moderata fluorescenza luminosa giallo-verde del nucleo.

Nota: * Nella vaginosi batterica, possono essere chiaramente osservati batteri di colorazione arancio che aderiscono a cellule epiteliali verdi (clue cells).

Microrganismo controllo qualità

Controllo positivo

Trichomonas vaginalis.

Controllo negativo

Come controllo negativo può essere utilizzato uno striscio vaginale negativo dimostrato.

Informazione tecniche

Sensibilità

Nella ricerca di *Trichomonas vaginalis* la colorazione con arancio acridina ha dimostrato di essere più sensibile rispetto ai preparati umidi^{52,53}.

Limitazione dell'uso della colorazione con arancio di acridina (AO- acridine orange)

La tecnica di colorazione con AO ha uno svantaggio in quanto richiede un microscopio a fluorescenza. Molti laboratori clinici possiedono un microscopio a fluorescenza, ma per quelli che non lo hanno, la spesa iniziale per l'acquisto di un simile microscopio può non essere giustificata.

Errata interpretazione degli strisci

L'errata interpretazione degli strisci può rappresentare un problema. I granuli dei leucociti disintegrati possono essere interpretati come cocci da personale meno esperto e i batteri morti o contaminanti possono essere colorati e portare a interpretazioni erranee.

2 Colorazione Auramina-fenolo - 2 (per specie *Cryptosporidium*)

Introduzione

Questa tecnica di colorazione fluorescente è utilizzata per ricercare le oocisti delle specie *Cryptosporidium* nelle feci. Si deve notare che l'auramina è nota come Auramina O.

Cosiderazioni sulla sicurezza⁴⁻²⁰

Seguire la valutazione locale del COSHH e la valutazione del rischio durante l'esecuzione di tutte le procedure di colorazione.

Metodo⁵⁴

- preparare uno striscio e asciugare all'aria (lo striscio dovrebbe essere di medio spessore)
- fissare con metanolo per 3 min
- ricoprire il vetrino con soluzione auramina-fenolo* e lasciare colorare per 10 min
- sciacquare con acqua di rubinetto
- decolorare il vetrino versando metanolo acido 3% e lasciar riposare per 5 min
- sciacquare con acqua di rubinetto
- colorazione di contrasto del vetrino con 0,1% permanganato di potassio e lasciare per 30 s
- sciacquare con acqua di rubinetto, drenare e asciugare all'aria Non tamponare perché alcuni materiali assorbenti possono essere fluorescenti
- esaminare con obiettivo x 20 e lente oculare x10 con microscopio a fluorescenza a luce incidente. Le lunghezze d'onda del filtro consigliate sono o filtro UV di eccitazione 355 nm e 450 nm di emissione o FITC con eccitazione (690nm) e di emissione (510 nm). Dovrebbero essere esaminati un minimo di 50 campi

* Auramina 0.3g, fenolo 3.0 g, acqua distillata/deionizzata 97mL. Sciogliere il fenolo in acqua con moderato calore. Aggiungere gradualmente auramina e agitare vigorosamente fino a scioglimento. Filtrare e conservare in bottiglia scura tappata⁵⁵.

Sono anche disponibili preparazioni commerciali e, se usate, devono essere rispettate le istruzioni del produttore.

Interpretazione

Risultato positivo

Le oocisti di *Cryptosporidium* (diametro 4-6µm) sono di forma anulare o a ciambella ed emettono fluorescenza verde-gialla (in funzione delle lunghezze d'onda del filtro) con uno sfondo rosso

scuro. Le presunte oocisti possono essere misurate, aumentando l'intensità della luce del campo chiaro e misurandole con un reticolo oculare calibrato.

Risultato negativo

Non osservata fluorescenza. I lieviti non presentano fluorescenza.

Microrganismi controllo di qualità

Controllo positivo

Specie *Cryptosporidium*

Nota: il materiale di controllo positivo può essere ottenuto dalla *Cryptosporidium* Reference Unit.

Controllo negativo

Come controllo negativo può essere utilizzato uno striscio negativo accertato.

Informazione tecnica

La conferma dei risultati della colorazione dovrebbe essere eseguita colorando un nuovo striscio con colorazione di Ziehl-Neelsen modificata.

3 Colorazione Calcofluoro (per Microsporidi)

Introduzione

Il calcofluoro si lega alla chitina nello strato parietale dell'endospora dei microsporidi a cui conferisce una brillante fluorescenza blu-bianca. Questa tecnica di colorazione è utilizzata per la dimostrazione di microsporidi nelle feci.

Considerazioni sulla sicurezza⁴⁻²⁰

Seguire la valutazione locale del COSHH e la valutazione del rischio durante l'esecuzione di tutte le procedure di colorazione.

Metodo⁵⁶

- preparare uno striscio molto sottile e asciugare all'aria
- fissare lo striscio in metanolo per 5 min
- colorare lo striscio con 1-2 gocce di soluzione Calcofluoro (0,5% p/v) e lasciare per 2-3 min
- lavare sotto acqua corrente a lento scorrimento
- colorazione di contrasto con soluzione di blu Evans (0,1%) per 1 min
- lavare con acqua corrente a lento scorrimento
- asciugare all'aria
- aggiungere 1 o 2 gocce di liquido di montaggio (Cytoseal 60) al vetrino e montare un coprioggetto
- esaminare con microscopio a fluorescenza (395-415nm)

Interpretazione

Risultato positivo

Le spore dei microsporidi sono tipicamente di forma ovoidale o piriforme ed emettono fluorescenza brillante blu-bianca. La dimensione delle spore variano in funzione delle specie e vanno da 1-20µm⁵⁷.

Nota: Le cellule di lievito mostrano anche un anello turchese fluorescente ma, a differenza dei microsporidi, presentano il citoplasma arancione dopo colorazione di contrasto

Risultato negativo

Non osservata fluorescenza.

Microrganismi controllo qualità

Controllo positivo

Specie *Microsporidia*

Controllo negativo

Come controllo negativo può essere utilizzato uno striscio negativo accertato.

Informazione tecnica

Le spore fungine possono contenere chitina, ed è richiesta una certa esperienza per differenziare le spore dei microsporidi da quelle dei funghi.

4 Colorazione di Field (per specie di *Plasmodium*)

Introduzione

Questa tecnica è usata per evidenziare le specie *Plasmodium* negli strisci di sangue (striscio sottile e goccia spessa)⁵⁸.

Considerazioni sulla sicurezza⁴⁻²⁰

Seguire la valutazione locale del COSHH e la valutazione del rischio durante l'esecuzione di tutte le procedure di colorazione.

Metodo⁵⁹

Colorazione Rapida per strisci sottili

Questa è una modifica della colorazione originale di Field che consente una colorazione rapida degli strisci sottili fissati. Questo metodo è adatto per i parassiti della malaria.

- preparare uno striscio sottile asciugato all'aria
- fissazione in metanolo per 1 min
- ricoprire il vetrino con 1 ml di colorante B di Field diluito (1 a 4 in acqua tamponata a pH 7.2)
- aggiungere immediatamente un volume equivalente di colorante A di Field non diluito, mescolare accuratamente e lasciare agire il colorante per 1min
- lavare il vetrino con acqua pulita e drenare per asciugare

Colorazione di Field per strisci a goccia spessa

Attenzione: Gli strisci spessi di sangue non sono fissati e le colorazioni non uccidono parassiti, virus o altri agenti patogeni che possono essere presenti nel sangue.

- preparare uno striscio di sangue e lasciare asciugare all'aria. In caso contrario, si verificherà allontanamento del sangue durante il lavaggio del vetrino
- tenere il vetrino con lo striscio spesso asciutto rivolto verso il basso
- immergere il vetrino nel colorante A di Field indiluito per 3 sec
- allontanare il colorante in eccesso toccando un angolo del vetrino contro il lato del contenitore
- lavare delicatamente per circa 3 sec in acqua pulita e agitare delicatamente
- allontanare l'acqua in eccesso
- immergere nel colorante B di Field indiluito per 3 sec e scaricare l'eccesso di colorante
- lavare delicatamente in acqua pulita
- pulire la parte posteriore del vetrino e collocare in posizione verticale in porta vetrini per asciugare lo striscio all'aria
- esaminare con la lente a immersione in olio X100. Durante la ricerca dei parassiti della malaria, dovrebbero essere esaminati sul vetrino 200 campi microscopici per almeno 15 minuti prima di dichiarare negativo il preparato

Nota: Se dopo la colorazione, tutto lo striscio appare giallo-marrone (segno che è stato utilizzato troppo sangue), troppo blu o troppo rosa, non tentare di eseguire l'accertamento. Colorare di nuovo immergendo il vetrino nel colorante A di Field per 1 sec, seguito da un lavaggio delicato in acqua pulita, immergere nel colorante B di Field per 1 sec e, infine, lavare delicatamente in acqua pulita.

Interpretazione

Colorazione di Field per strisci sottili

Risultato positivo

Cromatina di parassita	Rosso scura
Citoplasma di parassita	Blu
Granulazioni di Schüffner/granuli di James	Rossi
Granuli di Maurer (fenditure)	Rosso malva
Pigmento malarico nei globuli bianchi	Marrone-nero

Risultato negativo

Globuli rossi	Grigio pallido - viola-rosa
Reticolociti	Grigio-blu
Nuclei di neutrofili	Viola scuro
Citoplasma delle cellule mononucleari	Blu-grigio
Granuli di eosinofili	Rossi

Colorazione di Field per strisci a goccia spessa

Risultato positivo

Cromatina del parassita	Rosso scuro
Citoplasma del parassita	Blu-malva
Granulazioni di Schüffner	Rosso pallido
Sfondo	Pallido grigio/blu

Nota: Sullo striscio spesso possono anche essere osservati globuli bianchi, piastrine e pigmento della malaria .

Pigmento malaria	Giallo marrone o giallo nero
------------------	------------------------------

Risultato negativo

Nuclei di piccoli linfociti	Viola scuro
Nuclei di neutrofili	Viola scuro
Granuli di eosinofili	Rossi
Citoplasma cellule mononucleate	Blu-grigio
Reticolo dei reticolociti	Blu-grigio

Microrganismi controllo di qualità

Controllo positivo

Specie *Plasmodium*

Controllo negativo

Come controllo negativo può essere utilizzato uno striscio negativo accertato.

Informazione tecnica

La colorazione rapida di Field è un metodo utile per la rapida identificazione di presunte specie parassitarie della malaria. Questo metodo mostra un'adeguata colorazione di tutti gli stadi incluse le granulazioni. Comunque, la colorazione con Giemsa è sempre il metodo di scelta per la differenziazione definitiva delle specie.

Durante la valutazione della goccia spessa andrebbe esaminata la parte terminale dello striscio sul vetrino più vicino al bordo che rappresenta la sede drenante. I margini dello striscio sono migliori rispetto alla parte centrale ove lo striscio può essere troppo spesso o crepato.

5 Colorazione Giemsa (per *Dientamoeba fragilis* e *Blastocystis hominis*)

Introduzione

La colorazione di Giemsa è utilizzata per evidenziare la presenza di *Dientamoeba fragilis* e *Blastocystis hominis* nelle feci.

Considerazioni sulla sicurezza⁴⁻²⁰

Seguire la valutazione locale del COSHH e la valutazione del rischio durante l'esecuzione di tutte le procedure di colorazione..

Metodo

- preparare una diluizione 1 a 10 del colorante Giemsa in acqua tamponata. Questa dovrebbe essere preparata al momento dell'uso. Il colorante Giemsa è disponibile in commercio
- preparare uno striscio fecale e lasciare asciugare all'aria
- fissare in metanolo per 60 sec
- allontanare il metanolo
- ricoprire il vetrino con colorante diluito di Giemsa e lasciar agire per 20-25 min
- far scorrere acqua di rubinetto sul vetrino per allontanare il colorante e per evitare le precipitazioni sullo striscio
- lasciare asciugare all'aria

Interpretazione

Risultato positivo

Nuclei di parassiti e cromatina colorati in rosso

Risultato negativo

Nucleo dei leucociti di colore viola, citoplasma colorato in grigio-bluastro, batteri e lieviti colorati blu scuro.

Nota Il colorante Giemsa non colora le pareti delle cisti di *Pneumocystis*, ma consente di rilevare le forme trofiche.

Microrganismi controllo qualità

Controllo positivo

Dientamoeba fragilis e *Blastocystis hominis*.

Controllo negativo

Come controllo negativo può essere utilizzato uno striscio negativo accertato.

Informazione tecnica

Quando si utilizza questo metodo non è possibile osservare i tipici nuclei frammentati di *Dientamoeba fragilis* che sono spesso coalescenti⁶⁰.

Altro uso della colorazione di Giemsa

La colorazione Giemsa è stata anche utilizzata su strisci di midollo osseo o sangue per la rilevazione di *Histoplasma capsulatum* intracellulare, questo assume colore blu scuro con un alone ialino dovuto alla mancata colorazione della parete cellulare³⁸.

6 Colorazione Giemsa (per le specie *Plasmodium*)

Introduzione

La colorazione Giemsa è utilizzata per rilevare la presenza delle specie *Plasmodium* in strisci sottili e strisci a goccia spessa. Gli strisci a goccia spessa sono circa 30 volte più sensibili di quelli sottili; rilevando circa 20 parassiti per. μL . Sono quindi il metodo più adatto per la rilevazione rapida del

parassita. Lo striscio sottile è richiesto per confermare la specie di *Plasmodium* se questa non è definibile mediante la goccia spessa. Gli strisci sottili sono anche utili per valutare se un paziente con malaria causata da *Plasmodium falciparum* risponde al trattamento nelle aree in cui si sospetta la resistenza ai farmaci⁵⁸.

Considerazioni sulla sicurezza⁴⁻²⁰

Il metanolo è molto infiammabile e tossico. E' noto il pericolo per effetti irreversibili molto gravi da inalazione, contatto con la pelle e per ingestione. I contenitori devono essere chiusi ermeticamente e tenuti lontano dalle fonti termiche.

Seguire la valutazione locale del COSHH e la valutazione del rischio durante l'esecuzione di tutte le procedure di colorazione.

Metodo⁵⁸

Strisci sottili di sangue o midollo osseo

- preparare uno striscio sottile di sangue e lasciare asciugare il vetrino all'aria
- fissare in metanolo per 1-2min
- lavare in acqua distillata
- ricoprire il vetrino o inserirlo in una vaschetta di Coplin contenente Giemsa diluito 1:10 con acqua distillata tamponata a pH 7,2 per 20min. **Il colorante d'uso deve essere di recente preparazione**
- sciacquare in acqua distillata (per rimuovere l'eccesso di colorante ed evitare la deposizione di precipitato sul vetrino)
- drenare e asciugare all'aria in posizione verticale
- esaminare lo striscio con obiettivo a olio per immersione x100. Lo striscio sul vetrino può anche essere montato con DPX o non montato

Striscio sottile per parassiti della malaria

- preparare uno striscio sottile di sangue e lasciare asciugare il vetrino all'aria
- ricoprire il vetrino o inserirlo in una vaschetta di Coplin contenente Giemsa diluito 1:50 a pH 7.2 per 1 ora
- lavare il colorante con acqua distillata (allontanare il colorante dal vetrino per evitare che lo striscio sia ricoperto da un sottile deposito di colorante
- differenziare in acido acetico 1:1.500 entro 30 sec (controllare visivamente ad intervalli con il microscopio. Le sezioni complessivamente devono assumere colore rosa, con nuclei blu e granuli eosinofili rossi). **Questo è applicabile quando si colorano le sezioni di tessuto (midollo osseo).**
- lavare rapidamente in acqua distillata e asciugare all'aria
- esaminare lo striscio utilizzando l'obiettivo ad immersione x100

Interpretazione

Risultato positivo

Cromatina del parassita

Rosso scuro

Citoplasma del parassita	Blu
Granulazioni di Schüffner	Rossi
Granuli di Maurer (fenditure)	Rosso-malva

Risultato negativo

Globuli rossi	Da grigio pallido a malva
Reticolociti	Grigio blu
Nuclei di neutrofili	Viola scuro
Granuli di neutrofili	Viola malva
Granuli degli eosinofili	Rossi
Citoplasma delle cellule mononucleate	Blu-grigio

Microrganismi controllo

Controllo positivo

Specie *Plasmodium*

Controllo negativo

Come controllo negativo può essere utilizzato uno striscio negativo accertato..

Informazione tecnica

Test diagnostici rapidi

I test diagnostici rapidi (RTD - rapid diagnostic tests) sono disponibili come alternative alla microscopia. Questi rilevano tre gruppi principali di antigeni, tra cui proteine 2 specifiche ricche di istidina (HRP2) per *P. falciparum*, plasmodio lattato deidrogenasi (pLDH), e Aldolasi. Questi prodotti sono disponibili in diversi formati come cassette di plastica, carte, strisce a immersione, e formati ibridi cassette-strisce a immersione. Quando si seleziona la microscopia o un metodo d'identificazione RTD si devono considerare diversi fattori quali, prevalenza del parassita, disponibilità di personale qualificato e di risorse, capacità di mantenere la garanzia della qualità in microscopia e per le confezioni dei RDT

pH dell'acqua

E' importante il pH corretto dell'acqua tamponata e di tutte le soluzioni di colorazione. Le soluzioni con pH non corretto impediranno il rilievo di determinate caratteristiche morfologiche (granulazioni) e non forniranno la tipica colorazione nucleare e citoplasmatica del vetrino colorato⁶¹.

Strisci sottili di sangue

L'identificazione a livello di specie, in particolare di *P. ovale* e *P. vivax* e fra le forme anulari di *P. falciparum*, può essere impossibile senza esaminare uno dei vetrini colorati su striscio sottile di sangue.

Eccesso di colorazione Giemsa

L'eccesso di deposizione del colorante sullo striscio può essere fonte di confusione e rendere difficile il riconoscimento dei microrganismi; pertanto i vetrini devono essere risciacquati accuratamente.

7 Lugol a base di iodio (per parassiti)

Introduzione

L'1% di Lugol iodato, quando diluito, è usato per i preparati a fresco per colorare cisti, uova e protozoi. Questo metodo migliora l'osservazione delle loro strutture interne.

Considerazioni sulla sicurezza⁴⁻²⁰

Seguire la valutazione locale del COSHH e la valutazione del rischio durante l'esecuzione di tutte le procedure di colorazione.

Metodo⁶²

- deporre una goccia di soluzione fisiologica (0,85%) sull'un'estremità di un vetrino pulito e aggiungere all'altra estremità una goccia di soluzione diluita di Lugol iodato
- utilizzare un bastoncino per distribuire una piccola porzione di feci nella fisiologica fino a quando la sospensione diventa omogenea e poi diffondere per allestire uno striscio sottile
- utilizzare lo stesso bastoncino per emulsionare una pari quantità di feci nella goccia contenente iodio
ricoprire ogni sospensione con un vetrino, facendo attenzione a evitare di produrre di bolle d'aria
- esaminare con obiettivo a basso ingrandimento

Interpretazione

Risultato positivo

I nuclei dei protozoi assorbono il colorante contenente iodio e si colorano in marrone tenue, mentre il citoplasma rimane incolore.

Nota: I trofozoiti possono essere rilevati solo in preparati recenti umidi prima della concentrazione.

Risultato negativo

N/D

Microrganismi controllo qualità

Controllo positivo

Può essere utilizzato come controllo positivo uno striscio dimostrato positivo.

Controllo negativo

Come controllo negativo può essere utilizzato uno striscio negativo accertato.

Informazione tecnica

Alcuni addetti alle preparazioni preferiscono approntare i campioni in soluzione fisiologica e con colorante iodato su vetrini separati. Se si utilizzano vetrini separati le possibilità di diffusione dei liquidi sul tavolo traslatore del microscopio sono minori.

Per lavorare in modo appropriato con questo metodo, la soluzione di Lugol con iodio 1% dovrebbe essere preparata di recente (10-14 giorni).

La fonte luce del microscopio per le osservazioni a basso ingrandimento dovrebbe essere attenuata perché la maggior parte dei microrganismi non sarebbe rilevata da un'illuminazione

eccessiva. L'illuminazione deve essere regolata in modo che alcuni elementi cellulari delle feci mostrino rifrazione. In queste condizioni d'illuminazione la maggior parte dei protozoi saranno rifrangenti.

8 Colorazione tricromica modificata (per Microsporidi)

Introduzione

Questa tecnica è usata per la ricerca dei microsporidi nelle feci. Il principale vantaggio della colorazione tricromica modificata risiede nella possibilità di una facile differenziazione dei microsporidi dalle cellule di lievito⁵⁶. Il tempo di colorazione è molto più lungo (richiede 60 minuti) per disporre del preparato.

Considerazioni sulla sicurezza⁴⁻²⁰

Seguire la valutazione locale del COSHH e la valutazione del rischio durante l'esecuzione di tutte le procedure di colorazione.

Metodo⁴⁻²⁰

- preparare uno striscio sottile da sospensione di feci liquide non concentrate in formalina al 10% (rapporto 1: 3) e asciugare all'aria
- Nota:** Sono preparati strisci sottili per la difficoltà di ottenere la penetrazione del colorante attraverso la parete delle spore
- fissare lo striscio in metanolo per 5 min
 - ricoprire il vetrino con colorante Chromotrope-base* e lasciare agire per 90 min
 - lavare sotto l'acqua corrente di rubinetto per 1min per rimuovere l'eccesso di colorante
 - sciacquare in alcool acido (0,45% di acido acetico glaciale in alcool etilico) per 10 sec
 - lavare brevemente in alcol 95%
 - disidratare il vetrino successivamente in alcol 95% per 5 min, alcol 100% per 10 min, e in Hemo-De (sostituto dello xilene) per 10 min
 - asciugare all'aria ed esaminare con obiettivo a elevato ingrandimento (x1000 immersione in olio)

* Sciogliere 6g di cromotropo 2R, 0.15g di verde rapido e 0,7 g di acido fosfotungstico in 3 ml di acido acetico glaciale. Lasciare riposare per 30 min, e poi mescolare con 100 ml di acqua distillata.

Interpretazione

Positivo:

Le spore delle specie microsporidi che infettano i mammiferi, compreso l'uomo, tendono ad essere piccole, di dimensioni variabili da 1.0-3.0µm X 1.5- 4.0µm⁶⁴. Sono ovoidali e rifrangenti. Le pareti delle spore si colorano di rosa-rosso brillante. Occasionalmente le spore si colorano presentando una "cintura" rossa che attraversa il centro della spora.

Negativo:

Non si osservano spore nel materiale.

Microrganismi controllo di qualità

Controllo positivo

Specie *Microsporidi*

Controllo negativo

Come controllo negativo può essere utilizzato uno striscio negativo accertato.

Informazione tecnica

Per definire la diagnosi si raccomanda l'osservazione di 100 campi usando obiettivo con olio di immersione e tempo medio di lettura di 10 minuti per vetrino; la lettura di un numero inferiore di campi potrebbe comportare falsi negativi per pazienti che emettono un numero ridotto di spore⁶³.

9 Colorazione di Ziehl-Neelsen modificata a freddo (per specie *Cryptosporidium* e *Isospora*)

Introduzione

Questa tecnica è utilizzata per la ricerca di oocisti delle specie *Cryptosporidium* e *Isospora* nelle feci¹. In alternativa, può essere utilizzata l'auramina-fenolo modificata (consultare la sezione 3).

Cosiderazioni sulla sicurezza⁴⁻²⁰

Seguire la valutazione locale del COSHH e la valutazione del rischio durante l'esecuzione di tutte le procedure di colorazione.

Metodo⁶⁵

- preparare uno striscio di medio spessore e asciugare all'aria
- fissare in metanolo per 3 min e asciugare all'aria
- ricoprire il vetrino con colorante modificato di Kinyoun (3% carbol-fucsina) e lasciare agire per circa 15 min
- sciacquare con acqua di rubinetto
- ricoprire il vetrino con metanolo acido 1% per decolorare e lasciare agire per 15-20 sec
- sciacquare con acqua di rubinetto
- colorazione di contrasto con il 0,4% di verde malachite o alternativo e lasciare per 30 sec
- sciacquare con acqua di rubinetto e asciugare all'aria
- esaminare usando obiettivi x 40 o x 50 e oculari x 10. La morfologia può essere esaminata più da vicino con un obiettivo a maggior ingrandimento

Nota: Le preparazioni commerciali sono disponibili e, se usate, devono essere rispettate le istruzioni del produttore.

Interpretazione

Risultato positivo

Le specie *Cryptosporidium* sono di forma sferica di 4-6µm. Si colorano in rosa-rosso. La colorazione delle oocisti è variabile, e alcune di loro possono apparire prive di colore. Le strutture interne possono prendere la colorazione in modo variabile. Talvolta, ad elevato ingrandimento, può essere osservata la forma a mezzaluna degli sporozoi.

Le specie *Isospora* si colorano di rossa, misurano 32 x 16µm e appaiono come corpi ovali allungati con entrambe le estremità affusolate, contenenti uno zigote granulare o due sporoblasti.

Le oocisti delle specie *Cyclospora* si colorano in rosso rosato, sono sferiche 8-10µm e contengono una morula centrale. La colorazione è variabile e alcune oocisti possono apparire prive di colore. Le oocisti trovate nelle feci non sono di solito sporulanti.

Possono anche colorarsi i lieviti, altro biota e detriti fecali.

Risultato negativo

Parassita non rilevato.

Microrganismi per controllo qualità

Controllo positivo

Specie *Cryptosporidium*. Il materiale di controllo positivo può essere ottenuto dalla *Cryptosporidium*.Reference Unit

Controllo negativo

Come controllo negativo può essere utilizzato uno striscio negativo accertato.

Informazione tecnica

Si deve prestare attenzione perché le spore e gli artefatti possono assumere la colorazione di Ziehl-Neelsen e, a osservatori inesperti, apparire come positivi.

Gli strisci non devono essere preparati troppo spessi perché potrebbero decolorarsi in modo non adeguato.

10 Colorazione Rapida di Field (per *Dientamoeba fragilis* e *Blastocystis hominis*)

Introduzione

Si tratta di una tecnica di colorazione per rilevare la presenza di *Dientamoeba fragilis* e *Blastocystis hominis* nelle feci.

E' stata anche utilizzata per colorare strisci sottili della malaria consentendo l'osservazione di tutte le fasi di sviluppo del *Plasmodium* (consultare la sezione della colorazione di Field) e anche *Giardia*, *Trichomonas* e amebe ma non ha avuto successo per colorare tutte le forme di cisti.

Considerazioni sulla sicurezza⁴⁻²⁰

Seguire la valutazione locale del COSHH e la valutazione del rischio durante l'esecuzione di tutte le procedure di colorazione.

Metodo

- preparare uno striscio e lasciare asciugare all'aria
- fissare in metanolo per 60 sec
- ricoprire il vetrino con colorante B di Field (diluito 1 a 4 con acqua tamponata a pH 6,8-7,2)
- aggiungere immediatamente un volume equivalente di colorante A di Field (non diluito), mescolare e lasciar lasciare agire per 60 secondi
- sciacquare con acqua di rubinetto, scolare e asciugare all'aria
- esaminare con microscopio

Interpretazione

Risultato positivo

I nuclei del parassita e le strutture della cromatina si colorano in rosso.

Risultato negativo

Batteri e lieviti si colorano blu scuro. I nuclei dei leucociti si colorano di viola e il citoplasma in grigio-azzurro.

Microrganismi controllo qualità

Controllo positivo

Dientamoeba fragilis, *Blastocystis hominis*

Controllo negativo

Come controllo negativo può essere utilizzato uno striscio negativo accertato.

Informazione tecnica

Non è possibile osservare i tipici frammenti dei nuclei di *Dientamoeba fragilis* quando si utilizza questo metodo in quanto i contenuti nucleari sono spesso coalescenti⁶⁰.

Traduzione a cura di Roberto Rescaldani, già primario del Laboratorio di Microbiologia e Virologia A.O. San Gerardo dei Tintori - Monza.

I testi originali e le traduzioni sono disponibili sul Web APSI - www.apsi.it - Webmaster Sergio Malandrin, Dirigente di primo livello del Laboratorio di Microbiologia e Virologia A.O. San Gerardo dei Tintori di Monza

APPENDICE

Colorazione Blu di Toluidina/Blu di metilene (colorazione di Wright)

Introduzione

La colorazione di Wright facilita la differenziazione della tipologia delle cellule ematiche. E' utilizzata principalmente per colorare gli strisci di sangue periferico e aspirati midollari. Questa colorazione è costituita da una miscela di eosina e blu di metilene in metanolo. Tuttavia, sono disponibili molte modifiche e pertanto dovrebbero essere rispettate le istruzioni del produttore.

Il blu di metilene è omologo al blu di toluidina O. Questo è stato utilizzato per colorare i campioni leggermente ematici, per rendere i loro nuclei più facilmente visibili. Questo è usato anche per la colorazione degli strisci di sangue in citologia. Un'altra alternativa è la colorazione con blu Nilo, che può essere utilizzata con cellule vive o fissate.

Considerazioni sulla sicurezza⁴⁻²⁰

Seguire la valutazione locale del COSHH e la valutazione del rischio durante l'esecuzione di tutte le procedure di colorazione.

Metodo

- preparare un buon striscio di sangue su un vetrino distribuendolo in modo uniforme e sottile utilizzando il bordo di un altro vetrino.

Nota: Quando si effettua lo striscio, evitare che il sangue raggiunga i bordi estremi del vetrino. Consentire allo striscio di raggiungere i bordi del vetrino aggraverà la tendenza delle grandi cellule ad impilarsi sul margine. Uno striscio con linee ondulate o macchie scure deve essere eliminato, e si deve eseguire un nuovo striscio.

- lasciare asciugare per alcuni minuti.
- immergere il vetrino (striscio di sangue) nel colorante di Wright per 15 - 30 sec. Sono disponibili preparazioni commerciali e si dovrebbero rispettare le istruzioni del produttore
- rimuovere il vetrino e lasciare drenare l'eccesso di colorante dal bordo del vetrino.
- immergere il vetrino in acqua deionizzata o distillata per 5 a 15 sec.

Nota: il tempo di risciacquo è critico e deve essere inferiore al tempo di colorazione.

- drenare l'acqua in eccesso e lasciare asciugare all'aria.
- posizionare il vetrino sotto il microscopio con l'obiettivo ad immersione in olio. Contare i globuli bianchi e registrarne ciascun tipo.

Interpretazione

Leucociti:

Granulare -

Neutrofili polimorfonucleati

nucleo: blu scuro

citoplasma: rosa pallido

granuli: lilla rossastro

Eosinofili

nucleo: blu

citoplasma: blu

granuli: rosso-arancio

Basofili

nucleo: viola o blu scuro

granuli: viola scuro, quasi nero

Monociti non granulari-

nucleo (lobato): viola

citoplasma: blu cielo

Linfociti

nucleo violetto

citoplasma blu scuro

Microrganismi controllo di qualità

N/D

Informazione tecnica/limitazioni

Preparazione striscio di sangue

Se questa è eseguita in modo continuo e uniforme, sul vetrino si realizzerà un effetto graduale di rastremazione del sangue (o "frange"). Questa "sfumatura" del sangue è essenziale per il processo di conteggio ed è la caratteristica principale di un buon striscio di sangue. Se fatto male, le cellule possono essere distorte e sarà impossibile riconoscerle.

Bibliografia

1. Hussey, MaZA. Acid Fast Stain Protocols. ASM MicrobeLibrary. 2013.
2. Kumar VA, Chandra PS. Auramine phenol staining of smears for screening acid fast bacilli in clinical specimens. J Commun Dis 2008;40:47-52.
3. Somoskovi A, Hotaling JE, Fitzgerald M, O'Donnell D, Parsons LM, Salfinger M. Lessons from a proficiency testing event for acid-fast microscopy. Chest 2001;120:250-7.
4. European Parliament. UK Standards for Microbiology Investigations (SMIs) use the term "CE marked leak proof container" to describe containers bearing the CE marking used for the collection and transport of clinical specimens. The requirements for specimen containers are given in the EU in vitro Diagnostic Medical Devices Directive (98/79/EC Annex 1 B 2.1) which states: "The design must allow easy handling and, where necessary, reduce as far as possible contamination of, and leakage from, the device during use and, in the case of specimen receptacles, the risk of contamination of the specimen. The manufacturing processes must be appropriate for these purposes".
5. Official Journal of the European Communities. Directive 98/79/EC of the European Parliament and of the Council of 27 October 1998 on *in vitro* diagnostic medical devices. 7-12-1998. p. 1-37.
6. Health and Safety Executive. Safe use of pneumatic air tube transport systems for pathology specimens. 9/99.
7. Department for transport. Transport of Infectious Substances, 2011 Revision 5. 2011.
8. World Health Organization. Guidance on regulations for the Transport of Infectious Substances 2013-2014. 2012.
9. Home Office. Anti-terrorism, Crime and Security Act. 2001 (as amended).
10. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. The Approved List of Biological Agents. Health and Safety Executive. 2013. p. 1-32
11. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Infections at work: Controlling the risks. Her Majesty's Stationery Office. 2003.
12. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Biological agents: Managing the risks in laboratories and healthcare premises. Health and Safety Executive. 2005.
13. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Biological Agents: Managing the Risks in Laboratories and Healthcare Premises. Appendix 1.2 Transport of Infectious Substances - Revision. Health and Safety Executive. 2008.
14. Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for Safe Work Practices in Human and Animal Medical Diagnostic Laboratories. MMWR Surveill Summ 2012;61:1-102.
15. Health and Safety Executive. Control of Substances Hazardous to Health Regulations. The Control of Substances Hazardous to Health Regulations 2002. 5th ed. HSE Books; 2002.
16. Health and Safety Executive. Five Steps to Risk Assessment: A Step by Step Guide to a Safer and Healthier Workplace. HSE Books. 2002.
17. Health and Safety Executive. A Guide to Risk Assessment Requirements: Common Provisions in Health and Safety Law. HSE Books. 2002.

18. Health Services Advisory Committee. Safe Working and the Prevention of Infection in Clinical Laboratories and Similar Facilities. HSE Books. 2003.
19. British Standards Institution (BSI). BS EN12469 - Biotechnology - performance criteria for microbiological safety cabinets. 2000.
20. British Standards Institution (BSI). BS 5726:2005 - Microbiological safety cabinets. Information to be supplied by the purchaser and to the vendor and to the installer, and siting and use of cabinets. Recommendations and guidance. 24-3-2005. p. 1-14
21. Watt B, Rayner A, Harris G. Mycobacterium. In: Collee JG, Fraser AG, Marmion BP, Simmons A, editors. Mackie & McCartney Practical Medical Microbiology. 14th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1996. p. 329-41.
22. Hanscheid T. The future looks bright: low-cost fluorescent microscopes for detection of Mycobacterium tuberculosis and Coccidia. Trans R Soc Trop Med Hyg 2008;102:520-1.
23. Smith,A, Hussey,M. Gram Stain Protocols. ASMMicrobeLibrary. 2013.
24. Duguid JP. Staining Methods. In: Collee JG, Fraser AG, Marmion BP, Simmons A, editors. Mackie & McCartney Practical Medical Microbiology. 14th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1996. p. 793-812.
25. Barrow GI, Feltham RKA, editors. Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press; 1993. p. 214-8
26. Singh K. Laboratory-acquired infections. Clin Infect Dis 2009;49:142-7.
27. Salisbury D, Ramsay M, Noakes K, editors. Immunisation against infectious disease 2006 - The Green Book. Updated 04 November 2013. 3rd ed. Great Britain: The Stationery Office; 2013. p. 1-514
28. Health Protection Agency. Guidelines for Action in the Event of a Deliberate Release: Anthrax. 2010. p. 1-23.
29. Atlas R, Snyder J. Reagents, Stains, and Media: Bacteriology*. In: Carroll K, Funke G, Jorgensen J, Landry M, Warnock D, editors. Manual of Clinical microbiology. 10th ed. Vol 1. Wahington DC: ASM press; 2011. p. 272-302.
30. Hendrickson DA, Krenz MM. Reagents and Stains. In: Balows A, Hausler WJJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ, editors. Manual of Clinical Microbiology. 5th ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1991. p. 1289-314.
31. Collins CH, Lyne PM, Grange JM, Falkinham JO. Identification methods. In: Collins CH, Lyne PM, Grange JM, Falkinham JO, editors. Collins and Lyne's Microbiological Methods. 8th ed. Arnold; 2004. p. 89-109.
32. Microscopic Examination and Staining of Microorganisms and Appendix 3: Preparation of stains and reagents. In: Baker FJ, Breach MR, editors. Medical Microbiological Techniques. Butterworth Heinemann; 1980. p. 14-509.
33. Dhiraputra C, Chavalittamrong B, Ratanarapee S. Advantage of Sandiford's counterstain in detection of Gram negative bacteria in clinical specimens. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1980;11:267-8.
34. Ashby GK. Simplified Schaeffer spore stain. Science 1938;87:443.
35. Hussey, MaZA. Endospore Stain protocol. ASMMicrobe Library. 2013.

36. Murray SJ, Barrett A, Magee JG, Freeman R. Optimisation of acid fast smears for the direct detection of mycobacteria in clinical samples. *J Clin Pathol* 2003;56:613-5.
37. Hartman B, Koss M, Hui A, Baumann W, Athos L, Boylen T. Pneumocystis carinii pneumonia in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Diagnosis with bronchial brushings, biopsy, and bronchoalveolar lavage. *Chest* 1985;87:603-7.
38. Medically important fungi - A guide to identification. 5th ed. Washington,DC: ASM Press; 2011. p. 1-402
39. Abida Haque. Special Stains Use in Fungal Infections. *Connection* 2010;187-94.
40. Grocott R. A stain for fungi in tissue sections and smears using Gomori's methenamine-silver nitrate technic. *Am J Clin Pathol* 1955;25:975-9.
41. Mahan CT, George HT, Sale E. Rapid methenamine silver stain for *Pneumocystis* and fungi. *Archives of pathology & laboratory* 1978;102:351-2.
42. Khubnani H, Sivarajan K, Khubnani AH. Application of lactophenol cotton blue for identification and preservation of intestinal parasites in faecal wet mounts. *Indian J Pathol Microbiol* 1998;41:157-62.
43. Andama AO, Cattamanchi A, Davis JL, den BS, Worodria W, Huang L. Modified Giemsa method for confirmation of *Pneumocystis pneumonia* in low-income countries. *BMJ Case Rep* 2009;2009.
44. Walker J, Conner G, Ho J, Hunt C, Pickering L. Giemsa staining for cysts and trophozoites of *Pneumocystis carinii*. *J Clin Pathol* 1989;42:432-4.
45. Sato Y, Osabe S, Kuno H, Kaji M, Oizumi K. Rapid diagnosis of cryptococcal meningitis by microscopic examination of centrifuged cerebrospinal fluid sediment. *J Neurol Sci* 1999;164:72-5.
46. Ruchel R, Schaffrinski M. Versatile fluorescent staining of fungi in clinical specimens by using the optical brightener Blankophor. *J Clin Microbiol* 1999;37:2694-6.
47. Cheesbrough M, editor. *Medical Laboratory Manual for Tropical Countries*. Vol II. 2000. p. 45
48. Nunns D, Mandal D, Farrand RJ, O'Neill H, Henshaw G. A comparison of acridine orange, wet microscopy and Gram staining in the diagnosis of bacterial vaginosis. *J Infect* 1997;34:211-3.
49. Begum N, Muazzam N, Shamsuzzaman SM, Chowdhury A, Rashid A, Islam D. Diagnosis of Bacterial Vaginosis by Acridine Orange Staining and its Comparison to Conventional Methods and Association of *Gardnerella vaginalis* with Bacterial Vaginosis. *Bangladesh Journal of Medical Microbiology* 2010;40:37-42.
50. *Flourescence Microscopy - Instruments, Methods, Applications*. Ernst Leitz Wetzlar GmbH; 1972. p. 1-48
51. Rein MF. *Trichomonas Vaginalis*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 5th ed. Vol 2. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2000. p. 2894-8.
52. Levett PN. A comparison of five methods for the detection of *Trichomonas vaginalis* in clinical specimens. *Med Lab Sci* 1980;37:85-8.
53. Greenwood JR, Kirk-Hillaire K. Evaluation of acridine orange stain for detection of *Trichomonas vaginalis* in vaginal specimens. *J Clin Microbiol* 1981;14:699.
54. Nichols G, Thom BT. Screening for *Cryptosporidium* in stools. *Lancet* 1984;1:734-5.

55. Cruickshank R, Mackie TJ. Medical Microbiology - A guide to laboratory diagnosis and control of infection. 11 ed. Edinburgh, Livingstone; 1965.
56. Didier ES, Orenstein JM, Aldras A, Bertucci D, Rogers LB, Janney FA. Comparison of three staining methods for detecting microsporidia in fluids. *J Clin Microbiol* 1995;33:3138-45.
57. Davis LJ, Soave R. Cryptosporidium, Isospora, Cyclospora, Microsporidia and Dientamoeba. In: Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR, editors. Infectious Diseases. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 1998. p. 2442-55.
58. Parasitological Tests. In: Cheesbrough M, editor. District Laboratory Practice in Tropical Countries. Cambridge: Cambridge University Press; 1999. p. 178-309.
59. Moody AH, Fleck SL. Versatile Field's stain. *J Clin Pathol* 1985;38:842-3.
60. Johnson EH, Windsor JJ, Clark CG. Emerging from obscurity: biological, clinical, and diagnostic aspects of Dientamoeba fragilis. *Clin Microbiol Rev* 2004;17:553-70, table.
61. Isenberg HD. Giemsa Stain. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Washington, DC: American Society For Microbiology; 1992. p. 7.8.4.1-7.8.4.6.
62. Microscopic Examination of Fecal Specimens: Direct Smears. In: Isenberg HD, editor. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Vol 1. Washington DC: American Society for Microbiology; 1992. p. 7.3.3.1-7.3.3.3.
63. Weber R, Bryan RT, Owen RL, Wilcox CM, Gorelkin L, Visvesvara GS. Improved light-microscopical detection of microsporidia spores in stool and duodenal aspirates. The Enteric Opportunistic Infections Working Group. *N Engl J Med* 1992;326:161-6.
64. Weber R, Bryan RT, Schwartz DA. Microsporidia. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 5th ed. Vol 2. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2000. p. 2920-33.
65. Current WL. Techniques and laboratory maintenance of Cryptosporidium. In: Dubey JP, Speer CA, Fayer R, editors. *Cryptosporidiosis of man and animals*. CRC Press; 1990. p. 31-51.