

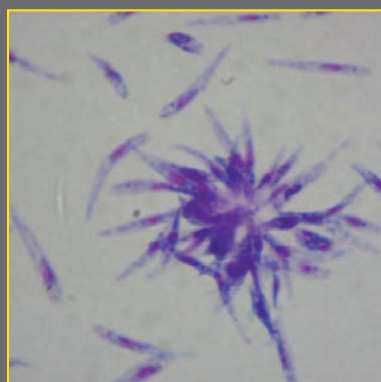
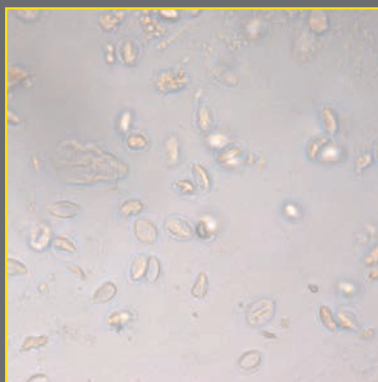
Mappe parassitologiche

11

IL LABORATORIO DI PROTOZOOLOGIA

IL LABORATORIO DI PROTOZOOLOGIA

“La Diagnosi di Laboratorio delle
Malattie da Protozoi”



Maria Grazia Coppola

Series Editor

Giuseppe Cringoli

Maria Grazia Coppola (Fontanarosa, AV) si è laureata in Scienze biologiche e Specializzata con lode in Microbiologia e Virologia a Napoli.

È dirigente biologo di 1° livello presso il Laboratorio di Patologia Clinica dell'Azienda Ospedaliera "D. Cotugno" di Napoli.

Dal 1981 ha avviato, nell'ambito delle attività del Laboratorio il neo settore di Parassitologia, divenendo nel 2004 responsabile della Unità Operativa "Parassitologia".

Ha ricoperto il ruolo di "Cultore della materia" (2002-2007) di Batteriologia e Parassitologia - Dipartimento di Scienza della Vita - Facoltà di Scienze Biologiche, sede di Caserta - della Seconda Università degli Studi di Napoli.

Direttore del 1° e 2° Corso teorico-pratico di Parassitologia (settembre - dicembre 2005 / maggio - giugno 2007) Azienda Ospedaliera "Cotugno" di Napoli.

È stata relatore, docente e moderatore in diversi Convegni e Corsi di formazione in Microbiologia sui temi della diagnostica parassitologia tenutesi a Napoli, Grosseto, Rieti, Salerno, Caserta, Benevento.

Attualmente è docente di Parassitologia presso la Scuola di Specializzazione in Microbiologia e Virologia per Medici e Biologi della Università degli Studi di Napoli "Federico II".

Dall'inizio dell'attività professionale ad oggi, ha edito circa 30 lavori a stampa su riviste italiane e internazionali specializzate.



Università degli Studi di Napoli
Federico II
Facoltà di Medicina Veterinaria



AZIENDA OSPEDALIERA COTUGNO



Indice Generale

Prefazione	pag. 3
Introduzione	“ 5
Presentazione	“ 7
Il Laboratorio di protozoologia	
Premessa	“ 9
Terminologia:	“ 10
Foresi	“ 10
Commensalismo	“ 10
Mutualismo	“ 10
Parassitismo	“ 10
Capitolo Generalità	
I protozoi	“ 12
Dotazione minima strumentale per un laboratorio di protozoologia	“ 14
Le attrezzature minime indispensabili:	“ 14
Microscopi	“ 15
Calibrazione dell'oculare micrometrico	“ 16
Tabella di grandezza dell'oculare microscopico	“ 17
Centrifughe	“ 18
Cappa chimica	“ 18
Cappa a flusso laminare	“ 18
Attrezzature accessorie necessarie	“ 19
Attrezzature accessorie	“ 19
Materiali di consumo	“ 19
Le fasi operative del laboratorio di Protozoologia:	“ 20
Raccolta e trasporto del campione	“ 20
Tabella richiesta esami Parassitologici	“ 21
Tabella prestazioni esami Parassitologici	“ 22
Tecniche diagnostiche per la ricerca ed identificazione dei protozoi	“ 23
Schemi dei trofozoi di flagellati	“ 27
Schemi dei trofozoi di amebe	“ 28
Schemi delle cisti di protozoi	“ 29
Coltura delle Amebe	“ 30
Colture delle Leishmanie	“ 30
Tecniche di biologia molecolare: PCR	“ 31
Saggio immunoenzimatico (ELISA)	“ 33
Immunofluorescenza Diretta ed Indiretta (IFI ed IFD)	“ 34
Test Immunocromatografici (ICT)	“ 34
Le tecniche indirette	“ 35
	III

Le colorazioni permanenti:	pag. 37
Colorazione Tricromica	“ 37
Colorazione Ziehl-Neelsen mod.	“ 39
Colorazione di Weber	“ 40
Colorazione Ematossilina Ferrica	“ 42
Colorazione di May-Grunwald Giemsa	“ 45
Colorazione di Giemsa	“ 45
La sicurezza in Laboratorio	“ 47

Capitolo I

Copros	“ 51
Percorso operativo per l'esame parassitologico del copros	“ 51
Raccolta dei campioni	“ 52
Esame del copros:	“ 54
esame macroscopico	“ 54
esame microscopico diretto:	“ 54
a) soluzione fisiologica	
b) soluzione di Dobell	
c) soluzione tamponata di blu di metilene	
d) carbol-fucsina	
lettura dei preparati	
e) preparazione strisci per colorazioni permanenti	
esame dopo concentrazione	
concentrazione per sedimentazione	“ 60
concentrazione per flottazione	“ 62
concentrazione mediante FLOTAC	“ 64
Ricerca ed Identificazione dei protozoi	“ 72
Flagellati intestinali:	“ 72
<i>Giardia duodenalis</i>	“ 73
Ciclo biologico	“ 73
Esame a fresco	“ 75
Colorazioni di Dobell	“ 76
Colorazione di Giemsa	“ 76
Enterotest	“ 77
Ricerca in Immunofluorescenza (IFD)	“ 77
Saggio immunoenzimatico	“ 78
Test rapido (ICT)	“ 78
Flagellati minori:	“ 79
<i>Chilomastix mesnili</i>	“ 79
<i>Enteromonas hominis</i>	“ 81

<i>Retortamonas intestinalis</i>	pag. 82
<i>Dientamoeba fragilis</i>	“ 83
Genere <i>Trichomonas</i>	“ 84
<i>Trichomonas hominis</i>	“ 84
Genere <i>Entamoeba</i>	“ 86
<i>Entamoeba histolytica</i>	“ 87
Ciclo biologico	“ 87
Esame a fresco	“ 90
Colorazioni di Dobell	“ 91
Colorazione tamponata di blu di metilene	“ 91
Esame dopo concentrazione	“ 92
Colorazioni permanenti:	“ 92
Colorazione Tricromica interpretazione	“ 93
Colorazione Ematossilina ferrica interpretazione	“ 93
Metodi indiretti:	“ 94
Emoagglutinazione Indiretta (IHA)	“ 94
Immunofluorescenza Indiretta (IFI)	“ 94
ELISA	“ 95
Coltura	“ 96
<i>Entamoeba hartmanni</i>	“ 98
<i>Entamoeba coli</i>	“ 99
Genere <i>Iodamoeba</i>	“ 102
<i>Iodamoeba butschlii</i>	“ 102
Genere <i>Endolimax</i>	“ 103
<i>Endolimax nana</i>	“ 103
Phylum Ciliophora	“ 104
<i>Balantidium coli</i>	“ 104
Ciclo biologico	“ 104
Diagnosi di laboratorio	“ 105
<i>Incertae sedis</i>	“ 106
<i>Blastocystis hominis</i>	“ 106
Phylum Apicomplexa	“ 107
Generalità	“ 107
Coccidi	“ 107
Genere <i>Cryptosporidium</i> :	“ 108
<i>Cryptosporidium</i> spp.	“ 108
Ciclo biologico	“ 108
Diagnosi di laboratorio:	“ 109
Carbolfucsina	“ 109
Ziehl-Neelsen modificato	“ 109

Immunofluorescenza Diretta (IFD)	pag.112
Test Immunocromatografico	“ 113
Enterotest	“ 114
Genere <i>Isoospora</i> :	“ 115
<i>Isoospora belli</i>	“ 115
Ciclo biologico	“ 115
Diagnosi di laboratorio:	“ 116
Esame a fresco	“ 116
Ziehl-Neelsen modificato	“ 116
Genere <i>Cycloospora</i> :	“ 117
<i>Cycloospora cayetanensis</i>	“ 117
Diagnosi di laboratorio:	“ 117
Esame a fresco	“ 117
Ziehl-Neelsen modificato	“ 117
Genere <i>Sarcocystis</i> :	“ 118
<i>Sarcocystis</i> spp.	“ 118
Ciclo biologico	“ 118
Diagnosi di laboratorio:	“ 119
Esame a fresco	“ 119
Ziehl-Neelsen modificato	“ 119
Phylum Microspora*	“ 120
I Microsporidi:	“ 120
Ciclo biologico	“ 121
<i>Enterocytozoon bienewisi</i>	“ 123
<i>Encephalitozoon</i> spp.	“ 123
<i>Nosema</i> spp.	“ 124
<i>Septata intestinalis</i>	“ 124
<i>Pleistophora</i> spp.	“ 124
Manifestazione cliniche	“ 125
Raccolta dei campioni	“ 125
Diagnosi di laboratorio:	“ 125
Colorazione di Weber	“ 126
Calcofluor	“ 127
Giemsa	“ 127
Refertazione e registrazione dei risultati	“ 128

* Attualmente questi microrganismi vengono considerati funghi

Capitolo II

Sangue e sistema reticolo endoteliale	pag.131
Raccolta del campione	“ 132
Ricerca ed identificazione dei protozoi	“ 133
Genere <i>Plasmodium</i>	“ 135
Generalità	“ 135
Distribuzione geografica	“ 136
Il vettore	“ 137
Ciclo biologico:	“ 138
Fase intraepatica	“ 139
Fase eritrocitaria	“ 140
Classificazione	“ 140
Forme di resistenza alla malaria	“ 141
Segni clinici	“ 142
Raccolta del campione	“ 143
Diagnosi di laboratorio	“ 144
Diagnosi microscopica	“ 145
Diagnosi differenziale di specie	“ 146
Schema delle forme di plasmodio	“ 147
Tabella delle caratteristiche di specie	“ 148
Limiti di sensibilità dell'esame microscopico	“ 149
Test Immunocromatografico (ICT)	“ 150
Test molecolari	“ 151
Immunofluorescenza Indiretta (IFI)	“ 152
Metodi indiretti:	“ 153
Immunofluorescenza Indiretta (IFI)	“ 153
<i>Plasmodium falciparum</i>	“ 154
<i>Plasmodium vivax</i>	“ 156
<i>Plasmodium ovale</i>	“ 158
<i>Plasmodium malariae</i>	“ 160
Genere <i>Babesia</i> e <i>Theileria</i>	“ 162
Ciclo biologico	“ 163
Raccolta del campione	“ 164
Diagnosi di laboratorio	“ 165
Diagnosi microscopica	“ 165
Test molecolari	“ 166
Metodi indiretti:	“ 167
Immunofluorescenza Indiretta (IFI)	“ 167
Emoflagellati	“ 168
Generalità	“ 168

Genere <i>Trypanosoma</i>	pag.170
Tripanosomiasi americana	“ 170
Distribuzione geografica	“ 170
Ciclo biologico	“ 171
Tripanosomiasi africana	“ 172
Distribuzione geografica	“ 172
Ciclo biologico	“ 173
Raccolta del campione	“ 174
Diagnosi di laboratorio	“ 174
Esame a fresco	“ 174
Colorazione di Giemsa	“ 175
Ricerca dal prelievo in EDTA	“ 175
Esame del buffy-coat	“ 175
Esame del liquido cefalo rachidiano	“ 176
Metodi indiretti:	“ 176
Emoagglutinazione Indiretta (IHA)	“ 176
Immunofluorescenza Indiretta (IFI)	“ 177
Genere <i>Leishmania</i>	“ 178
Generalità	“ 178
Distribuzione geografica della Leishmaniosi viscerale	“ 179
Distribuzione in Italia	“ 188
Il vettore	“ 181
Ciclo biologico	“ 182
Segni clinici	“ 182
Raccolta del campione	“ 183
Diagnosi di laboratorio	“ 183
Immunofluorescenza Indiretta (IFI)	“ 184
Diagnosi microscopica Diretta	“ 185
Coltura	“ 186
Refertazione e registrazione dei risultati	“ 188

Capitolo III

Liquido di lavaggio broncoalveolare (Bal), broncoaspirato(Bas) ed espettorato . . .	“ 191
Raccolta del campione	“ 193
Espettorato	“ 193
Espettorato Indotto (EI)	“ 193
Lavaggio Broncoalveolare (BAL)	“ 194
Tabella delle caratteristiche dei campioni	“ 194
Preparazione dei campioni	“ 195
Ricerca ed identificazione dei protozoi	“ 196

Genere <i>Pneumocystis</i> *	pag. 198
<i>Pneumocystis jirovecii</i> :	“ 198
Generalità	“ 198
Ciclo biologico	“ 200
Segni clinici	“ 201
Diagnosi di laboratorio	“ 201
Colorazione di blu di toluidina	“ 202
Colorazione di Gram Weigert	“ 204
Colorazione di May Grunwald Giemsa	“ 205
Immunofluorescenza Indiretta (IFI)	“ 206
Genere <i>Toxoplasma</i>	“ 208
<i>Toxoplasma gondii</i>	“ 208
Diagnosi di laboratorio	“ 208
Colorazione di May Grunwald Giemsa	“ 209
Immunofluorescenza Indiretta (IFI)	“ 209
Genere <i>Cryptosporidium</i>	“ 211
<i>Cryptosporidium</i> spp	“ 211
Diagnosi di laboratorio	“ 211
Colorazione di Ziehl-Neelsen mod	“ 212
Immunofluorescenza Diretta (IFD)	“ 213
Refertazione e registrazione dei risultati	“ 214

Capitolo IV

Tessuti vari	“ 217
Generalità	“ 217
Raccolta del campione	“ 218
Preparazione del campione	“ 218
Ricerca ed identificazione dei protozoi	“ 219
Genere <i>Toxoplasma</i>	“ 220
<i>Toxoplasma gondii</i>	“ 220
Ciclo biologico	“ 221
Toxoplasmosi acquisita	“ 224
Toxoplasmosi congenita	“ 225
Toxoplasmosi di riattivazione	“ 225
Raccolta del campione di Bal	“ 226
preparazione del campione	“ 226

* Attualmente questi microrganismi vengono considerati funghi

Raccolta del campione di Aspirato linfonodale	pag.227
preparazione del campione	“ 227
Raccolta e preparazione del campione di liquor	“ 227
Diagnosi di laboratorio	“ 228
Colorazione di May Grunwald Giemsa	“ 228
Immunofluorescenza Indiretta (IFI)	“ 229
Test molecolari	“ 230
Biopsia cutanea	“ 231
Leishmaniosi cutanee	“ 231
Diagnosi di laboratorio	“ 233
Coltura	“ 233
Aspirato linfonodale	“ 234
Diagnosi di laboratorio	“ 234
Biopsato e/o aspirato duodenale	“ 235
Diagnosi di laboratorio	“ 235
Biopsia muscolare	“ 237
Ricerca microsporidi	“ 237
Ricerca <i>Trypanosoma cruzi</i>	“ 238
Amebe a vita libera	“ 239
Ciclo biologico	“ 240
Genere <i>Naegleria</i>	“ 241
Diagnosi di laboratorio	“ 241
Coltura	“ 241
Genere <i>Acanthamoeba</i>	“ 242
Diagnosi di laboratorio	“ 242
Colorazioni permanenti:	“ 243
Colorazione Tricromica	“ 243
Coltura	“ 243
Genere <i>Trichomonas</i>	“ 244
<i>Trichomonas vaginalis</i>	“ 244
Ciclo biologico	“ 244
Raccolta dei campioni	“ 245
Esame a fresco	“ 246
Colorazione di Giemsa	“ 247
Coltura	“ 247
Refertazione e registrazione dei risultati	“ 248
Bibliografia	“ 251
Indice analitico	“ 251

Maria Grazia Coppola



IL LABORATORIO DI PROTOZOOLOGIA
“La Diagnosi di Laboratorio delle Malattie da Protozoi”

Prefazione

Antonio Giordano
Giuseppe Cringoli

Introduzione

Fabio Rossano

Presentazione

Luigi Gradoni

Il laboratorio di protozoologia. Così Maria Grazia Coppola ha voluto intitolare questo Suo testo, caratterizzandolo con la modestia che la contraddistingue, del Suo agire quotidiano, e caricando ancor di più questa scelta con il sottotitolo “ la diagnosi di laboratorio delle Malattie da Protozoi”.

Ma questo testo è di più, è un vero strumento di lavoro che non si esaurisce nel suo tecnicismo. Esso può diventare un caposaldo; attraverso la descrizione delle tecniche si riapre il capitolo delle zoonosi, capitolo ultimamente accantonato in forza di una troppo ottimistica convinzione di tutta la civiltà occidentale di aver già superato il problema attraverso i nostri stili di vita e grazie ai nostri determinanti della salute. Purtroppo la storia ci insegna che su ogni fenomeno sociale se si abbassa la guardia, a seguito di fallaci, o troppo ottimistici, convincimenti, il fenomeno riprende e si ripropone. Questo è il caso delle zoonosi. Il dinamismo sociale della nostra epoca, le nuove modalità di mobilità di uomini e merci, l'aumentata presenza di animali di compagnia- anche esotici- nelle abitazioni, i fenomeni sociali collegati all'immigrazione ed al lavoro degli immigrati, spesso utilizzati in condizioni di profondo disagio ambientale, hanno determinato e determinano un'importante riproposizione delle malattie da protozoi e per esse delle conseguenti zoonosi.

Questo testo ci invita a considerare che il fenomeno esiste; che il fenomeno è diagnosticabile; che attraverso la diagnosi si possono e si debbono produrre analisi di contesto; che le analisi epidemiologiche di contesto debbono indurre a valutazioni, ad azioni sanitarie e anche ad azioni sociali per individuare nuovi e, in qualche caso diversi, determinanti della salute.

È questo, in fondo lo scopo di questo strumento, che poi è lo scopo implicito di ogni valida pubblicazione sanitaria: poche volte, però, un testo e le sue ricadute sanitarie e sociali sono così apprezzabili ed evidenti come in questo caso. Ed è per questo che ringrazio la Dottoressa Coppola per questo lavoro, La ringrazio a nome dell'Azienda che dirigo, ma anche a nome mio personale di privato cittadino e mi propongo di utilizzare questo testo, ogni qual volta è possibile, quale riferimento esemplificativo per dimostrare le validità e l'importanza sociale delle azioni sanitarie.

Antonio Giordano
Medico Chirurgo
Direttore Generale
Azienda Ospedaliera “D.Cotugno”

Il parassitismo è un fenomeno antico che si perde nella notte dei tempi.

Da sempre l'uomo ha subito l'azione di organismi parassiti che per millenni sono stati considerati come la conseguenza di una punizione divina. La terapia era basata su sacrifici, processioni, esorcismi e preghiere e la profilassi su talismani e riti propiziatori, nonché su divieti religiosi. Le prime testimonianze scritte sulle malattie da parassiti le troviamo nel papiro veterinario di Kahun, il più antico documento medico esistente - circa duemila anni avanti Cristo.

La parassitologia è la branca medica che ha dominato tutto il mondo antico fino alla definitiva confutazione della generazione spontanea, con Redi e Spallanzani, alla invenzione del microscopio, con Galileo ed alla nascita della microbiologia con Pasteur. Oggi gli organismi che provocano infezioni e/o infestazioni - infestazioni nell'uomo e negli animali sono inquadrati in raggruppamenti zoologici differenti che comprendono virus, batteri, protozoi, elminti, artropodi e miceti.

Le infezioni da protozoi da sempre costituiscono un importante problema sanitario sia per l'uomo che per gli animali e negli ultimi anni l'interesse nei confronti di questi organismi sta notevolmente crescendo sia per la loro stabilita endemicità nei Paesi in via di sviluppo che per la loro (ri)-emergenza nei Paesi industrializzati. I cambiamenti climatici, la globalizzazione, il progressivo aumento dei flussi di viaggiatori internazionali impongono che gli operatori sanitari del terzo millennio e di una società globalizzata siano pronti ad affrontare vecchie e nuove problematiche diagnostico-terapeutiche inerenti alla protozoologia.

Da qui nasce l'importanza di poter disporre di un manuale di tecniche di laboratorio completo, esaustivo e di facile consultazione. Questo libro dedicato al "Laboratorio di Protozoologia" si configura come un ricco compendio per la diagnosi di laboratorio delle più comuni infezioni protozoarie dell'uomo. Molti dei protozoi trattati sono agenti di zoonosi a sottolineare sempre più il moderno concetto di *Uomo + Animale: One World, One Health* (un mondo, una salute) sostenuto dalle più importanti organizzazioni sanitarie ed umanitarie, quali la *World Health Organization* (WHO), l'*Office International des Epizooties* (OIE) e la *Food and Agriculture Organization* (FAO).

Siamo grati a Maria Grazia Coppola per "aver aperto i suoi cassetti" ed aver messo a disposizione la sua decennale esperienza di laboratorista in questo manuale che rappresenta un valido strumento per tecnici di laboratorio, studenti dei corsi di laurea e specializzazione in scienze biomediche, per medici, biologi, veterinari, infettivologi, epidemiologi e per tutti coloro che si occupano della protozoologia, branca fondamentale dell'affascinante mondo della parassitologia.

Giuseppe Cringoli

Professore Ordinario di Parassitologia e Malattie Parassitarie
Facoltà di Medicina Veterinaria
Università degli Studi di Napoli Federico II

La Parassitologia è senza dubbio il ramo delle discipline microbiologiche e zoologiche che più di tutte va espandendosi, a causa del numero sempre crescente di spostamenti umani che si osservano per tutto il globo.

Anche l'Italia risulta investita da tale fenomeno: non sono più infrequenti nel Paese parassitosi rare sia nelle grandi metropoli che nei piccoli centri urbani.

L'inizio ufficiale della parassitologia in Italia è segnato dall'illustre nome di Francesco Redi, che nell'anno 1684, pubblicò le *“Osservazioni intorno agli animali viventi che si trovano negli animali viventi”*.

L'etimologia greca del termine “parassita” indica il connubio fra παρά – presso - e σιτος – cibo- ovvero “colui che mangia insieme con”. Risulta evidente la modificazione del significato del sostantivo dal periodo ellenico ma anche pre-ellenico, all'epoca contemporanea: nell'accezione greca il sostantivo indicava un commensale, in quella attuale, il termine indica una forma simbiotica in cui il parassita vive provocando danni all'ospite.

Il parassitismo è una simbiosi di tipo antagonistico, in cui una specie trae vantaggio da un'altra e nello stesso tempo la danneggia. Il danno è variabile in entità e durata, ma esiste sempre l'importantissima tendenza del parassita a tenere in vita il suo ospite. Il parassita quindi tende al miglior adattamento con quest'ultimo, sfruttandolo ma non causandogli danni che possano compromettere in maniera definitiva la sua fitness (in ciò si differenzia dalla predazione, dove il rapporto ospite-parassita è di breve durata, culminando con la morte della preda).

L'adattamento è perciò il fulcro della vita parassitaria. L'ospitato si adatta modificando sia morfologicamente che funzionalmente il suo organismo nella nuova nicchia. Un esempio che elucida tale concetto è rappresentato dall'intestino dei Platelmini, o “vermi piatti”, che, per molti studiosi, è da considerarsi come un vero e proprio “intestino rovesciato”, poiché espone all'ospite un tegumento ripiegato simulante una struttura a microvilli, che aumenta enormemente l'interfaccia di assorbimento delle sostanze nutritive dell'ospite.

Oltre questo adattamento di tipo morfo-funzionale, vi è anche un adattamento più fine come quello biochimico, dove si instaura nel parassita una progressiva perdita della capacità di sintetizzare molecole che vengono invece sottratte già pronte dall'ospite.

Infine è possibile annoverare un adattamento definito come fenomeno di “mimesi molecolare”, dove il parassita elude la risposta difensiva dell'ospite mimetizzandosi molecolarmente, ossia incorporando molecole proprie dell'ospite in modo da divenire non riconoscibile da parte del suo sistema immunitario.

Tali modificazioni, quindi, sia macroscopiche che molecolari, portano necessariamente al fenomeno di specificità d'ospite, che nei parassiti è molto accentuato.

Questi descritti non sono altro che alcuni dei tanti e complessi aspetti della vita di relazione fra un parassita ed un ospite. Tale complessità è tangibile sia a livello teorico per quanto riguarda il vero e proprio studio di relazioni fra organismi, che a livello diagnostico, determinando la necessità di avere strumenti validi che possano aiutare nello studio dei diversi aspetti della parassitologia.

Il testo della dott.ssa Coppola risponde egregiamente alla necessità di avere un supporto completo di cognizioni e tecniche da utilizzare a fini diagnostici, indicando

nozioni teoriche e precise descrizioni tecniche fondamentali per lo studio di questa affascinante disciplina.

Si evince la passione e la competenza ottenute in anni di esperienza, maturatasi con lo spirito critico e con la giornaliera militanza, in un campo difficile e di appartenenza a pochi operatori.

Sono perciò convinto che questo testo incontrerà il favore di quanti si avvicinano alla parassitologia e li aiuterà certamente sia a superare i problemi di tutti i giorni che ad arricchire le loro conoscenze.

Rivolgo quindi a Maria Grazia Coppola i miei più sentiti complimenti e gli auguri più sinceri di successo.

Fabio Rossano

Professore Ordinario di Microbiologia e Microbiologia Clinica
Direttore della Scuola di Specializzazione di Microbiologia e Virologia
Facoltà di Medicina e Chirurgia
Università degli Studi di Napoli Federico II

Questo manuale pratico per la diagnosi delle malattie protozoarie nell'uomo costituisce un'opera originale nel panorama dei pochi testi e manuali di parassitologia medica disponibili in Italia e citati in bibliografia.

Prima di tutto, si rivolge esclusivamente ai Protozoi: ciò ha permesso un approfondimento ed un livello di dettaglio notevole per quanto riguarda i protocolli diagnostici e le immagini schematiche o prese al microscopio. Chiunque potrà apprezzare le meticolose "ricette" con cui preparare un terreno di coltura, un sistema di colorazione, oppure eseguire un saggio immunologico. Sono sicuro che pagine fotocopiate del manuale, rigorosamente inserite in buste di plastica trasparente, si ritroveranno sui banconi di parecchi laboratori. Numerose microfotografie ripetute a diverso ingrandimento sono state prodotte dall'Autrice direttamente "sul campo". Esse appaiono molto realistiche e depurate da effetti di abbellimento che caratterizzano molto spesso le immagini reperibili su Internet.

Secondo: l'organizzazione generale dei vari capitoli non segue la canonica trama "filogenetico-evolutiva" degli organismi trattati, dagli Zoomastigophorea (emoflagellati) ai Ciliophora (balantidi), tipica dei principali testi universitari di parassitologia; è invece suddivisa per "campione diagnostico". Così, i capitoli sono identificati separatamente (persino dal colore della bandella, un'ottima idea) per campione di feci (qui elegantemente nominate "copros"), sangue e reticolo-endotelio, campioni bronchiali e di espettorato, tessuti solidi ed essudati. Ciò fornisce un elevato valore pratico di consultazione per chi si trovi fra le mani un determinato campione. Il rovescio della medaglia è costituito dalle inevitabili ripetizioni; per esempio, alcuni protocolli sono ripetuti per *Leishmania* quando il campione è costituito da reticolo-endotelio (aspirato di midollo osseo) oppure da pelle (biopsia cutanea). Altri esempi li ritroviamo per *Toxoplasma* o *Cryptosporidium*, entrambi caratterizzati da più organi e tessuti colpiti. Tuttavia questo è un compromesso necessario per l'aspetto pratico dell'opera.

Terzo: l'Autrice si fa carico, molto responsabilmente, di inserire nel manuale alcuni organismi rimasti "orfani" in quanto la comunità scientifica, su basi molto solide, li ha "declassati" (almeno per me, protozoologo; per altri forse "innalzati") da Protozoi a Funghi. Mi riferisco ai Microsporidi ed a *Pneumocystis*. Sarò malevolo, ma la comunità dei parassitologi sembra che abbia tirato un sospiro di sollievo quando si è liberata di questi agenti, molto difficili da manipolare ed identificare. Il risultato è che i relativi protocolli diagnostici stanno sparendo dalle nuove edizioni di testi di parassitologia, senza che qualcun altro abbia preso il testimone.

Quarto: la parte speciale è preceduta da un utile capitolo illustrato sulle dotazioni, attrezzature, protocolli generali e modalità di refertazione indispensabili perché un laboratorio di diagnostica protozoaria possa definirsi tale. Ciò richiede un piccolo inciso. La scienza e la pratica in campo protozoologico si discostano parecchio da quelle che caratterizzano altri agenti infettivi. Soprattutto la batteriologia medica si giova da decenni di tecnologie standardizzate ed automatizzate, dai terreni di crescita ai kit immunodiagnostici, fino ai test di sensibilità ai farmaci. Invece, per la particolare natura biologica dei "nostri" microrganismi eucarioti (a tutti gli effetti animali complessi), gran parte delle procedure di manipolazione e identificazione è di natu-

ra prettamente “artigianale”. Di più: ogni approccio in qualche misura standardizzabile per un organismo, si discosta sensibilmente da quello applicabile per altri organismi (in pratica, ogni protozoo ha il suo protocollo!). Solo negli ultimi anni sono stati messi a punto alcuni kit diagnostici di discreta affidabilità, ma questi riguardano solo saggi immunologici sviluppati per alcuni protozoi agenti di importanti patologie. Tutti i terreni di coltura per protozoi coltivabili vanno preparati “in casa”. Analogamente, saggi di farmacoresistenza (che potrebbero essere molto utili nel campo della malaria, amebiasi, leishmaniosi, ecc.) o non sono disponibili del tutto, oppure richiedono dei mesi per poter fornire una risposta.

Pertanto, come correttamente riporta l’Autrice del manuale, questa “nostra” scienza medica è una vera e propria arte, fatta di esperienza e dedizione, e che non si può improvvisare mettendo a rischio la salute dei pazienti.

Luigi Gradoni

Past President, Società Italiana di Protozoologia

Docente incaricato di Parassitologia presso l’Università di Roma Tre

Direttore dell’ex Reparto di Protozoologia e

Direttore del Reparto di Malattie trasmesse da vettori & Sanità Internazionale

Istituto Superiore di Sanità

PREMESSA

In questo libro vengono illustrate le metodiche utilizzate per la diagnosi di laboratorio delle più comuni malattie protozoarie; accanto agli aspetti bio-morfologici, di ciascun protozoo trattato, vengono riportati suggerimenti pratici per una proficua diagnosi di laboratorio:

le procedure adottate per la raccolta, la conservazione e le modalità di invio in laboratorio di ogni campione biologico;

le procedure adottate per il trattamento del campione;

le tecniche di colorazione utilizzate;

le osservazioni microscopiche, le caratteristiche morfologiche e tintoriali che sono proprie di ciascun protozoo;

e infine le tecniche di diagnosi indiretta di possibile impiego, come i saggi sierologici di immunofluorescenza, emoagglutinazione, ELISA, ecc.

Il libro si compone di quattro capitoli, ognuno dedicato ad uno o più campioni biologici, di un particolare distretto anatomico umano ed ai protozoi che possono colonizzare quel distretto e quindi possono essere riscontrati in quel particolare campione.

Nel **capitolo generalità**, è descritta la dotazione minima indispensabile per un laboratorio di Protozoologia e le descrizioni dei principi generali su cui si basano le tecniche di ricerca ed identificazione dei vari protozoi;

il **I capitolo**, “Copros”, presenta i protocolli diagnostici per la ricerca dei protozoi nel campione di copros, viene esposta la posizione tassonomica, i cicli biologici, le caratteristiche morfologiche, con schemi illustrativi, alcuni dei quali tratti dal sito web di Centers for Disease Control and Prevention, e le immagini microscopiche dei protozoi riscontrabili in questo campione;

il **II capitolo**, “Sangue e Sistema reticolo endoteliale”, presenta i protocolli diagnostici per il trattamento del campione biologico al fine di individuare con successo i protozoi reperibili, vengono esposti i cicli biologici, le caratteristiche morfologiche, con schemi illustrativi, tratti dal sito web di Centers for Disease Control di Atlanta, le affinità tintoriali e le immagini microscopiche dei protozoi riscontrabili;

il **III capitolo**, “Liquido di lavaggio broncoalveolare (BAL), broncoaspirato (BAS) ed Espettorato indotto” tratta dei protocolli diagnostici utilizzati per il trattamento dei campioni, i cicli biologici, le caratteristiche morfologiche, le affinità tintoriali e le immagini microscopiche dei protozoi riscontrabili nell'apparato bronco-alveolare;

infine il **IV capitolo**, “Tessuti ed essudati vari” tratta dei protocolli diagnostici per la ricerca dei protozoi, occasionalmente, presenti nella cute, linfonodi, cornea, liquor, muscoli e tamponi di essudati vaginali ed uretrali, i cicli biologici, le caratteristiche morfologiche, le affinità tintoriali e le immagini microscopiche dei protozoi riscontrabili in questi tessuti.

La terminologia

È opportuno conoscere alcune definizioni generali, che possono essere utili nella lettura del testo.

La Parassitologia può essere considerata un capitolo dell'Ecologia nel senso che essa studia le interrelazioni tra tutti gli esseri viventi e il loro ambiente.

Nelle associazioni che intercorrono tra due specie diverse, animali o vegetali che vivono in relazione tra loro una o entrambe le specie possono trarre benefici dall'associazione e una o nessuna delle due può risultarne danneggiata; queste relazioni sono dette simbiotiche.

Classicamente vengono considerate quattro forme di associazioni simbiotiche

- FORESI
- COMMENSALISMO
- MUTUALISMO
- PARASSITISMO

- FORESI

Associazioni in cui il commensale si lascia trasportare aderendo alla superficie esterna dell'ospite per approfittare delle molteplici occasioni alimentari, quindi è un trasporto meccanico dell'ospite senza interazioni e dipendenze metaboliche.

- COMMENSALISMO

Associazione in cui si ha beneficio per un simbionte ed indifferenza per l'altro, si distingue in:

ECTOCOMMENSALISMO:

il commensale vive sulla superficie del corpo dell'ospite e si nutre di sostanze catturate dall'ospite.

ENDOCOMMENSALISMO:

Il commensale vive all'interno dell'ospite e si nutre di sostanze ingerite dall'ospite.

- MUTUALISMO

Associazione in cui si ha beneficio per entrambi i simbionti i quali non possono vivere indipendentemente.

- PARASSITISMO

È una simbiosi antagonista in cui un organismo, il parassita, vive in un altro organismo di specie diversa, l'ospite, e trae i suoi mezzi di sussistenza da esso, è, pertanto, una associazione in cui si ha danno per un simbionte e beneficio per l'altro. Per definizione, quindi, i parassiti sono dei patogeni, ma non sempre danneggiano irreparabilmente l'ospite: ciò si risolverebbe in un danno per i parassiti stessi. D'altronde, l'ospite non si comporta passivamente ma, attraverso meccanismi di difesa, controlla il numero e gli effetti dannosi del parassita.

Si ritiene che nessun ospite è suscettibile a tutti i parassiti e nessun parassita può infettare tutti gli ospiti; pertanto oggi si è portati a ritenere che il potere patogeno non sia una caratteristica intrinseca di un parassita ma scaturisca dall'interazione ospite-parassita.

Per quanto riguarda il parassita, se consideriamo la sede da esso scelta, possiamo distinguere:

Ectoparassiti

Parassiti che vivono sulla superficie del corpo dell'ospite, ad es. gli acari, i pidocchi.

Endoparassiti

Parassiti che vivono all'interno del corpo dell'ospite che possono essere intracellulari, come i plasmodi della malaria, o extracellulari come la *Giardia* ecc.

Se consideriamo il grado di adattamento al parassitismo, possiamo distinguere:

Parassiti obbligati, quelli che non possono condurre vita libera, ma devono effettuare una o più fasi del proprio ciclo biologico nell'ospite.

Gran parte dei protozoi umani appartengono a questa categoria.

Parassiti facoltativi, quelli che conducono indifferentemente vita libera e vita parassitaria;

Parassiti accidentali, quelli che normalmente svolgono il proprio ciclo biologico nell'ambiente libero, ma capitati accidentalmente in un vivente, svolgono il loro ciclo vitale producendo danni all'ospite, come es. *Acanthamoeba*.

Se consideriamo la necessità del parassita di svolgere il ciclo biologico in un solo o più ospiti, possiamo distinguere:

Parassita monoxeno viene definito il parassita che può completare il suo ciclo biologico in un solo ospite;

Parassita eteroxeno (dixeno, polixeno) viene definito il parassita che compie il suo sviluppo, in tempi successivi, in due o più ospiti appartenenti a specie diverse.

Se consideriamo, infine, l'antichità dell'adattamento al parassitismo possiamo distinguere:

Parassiti antichi quelli che hanno acquisito habitat parassitario da molte generazioni, in termini di centinaia di migliaia di anni. Pertanto l'adattamento del parassita all'ospite, e dello stesso ospite al parassita, per fenomeni di mutazione e reciproca selezione è molto avanzato.

Conseguenza per la specie ospite è che i danni prodotti dal parassita sono compatibili con la sopravvivenza ed anzi, in alcuni casi, diventano di scarso rilievo

Parassiti recenti quelli che non si sono adattati ancora all'ospite, e quindi non hanno ancora "imparato" a ledere poco l'ospite per meglio e più a lungo utilizzare la nicchia fornita da quest'ultimo, il quale a sua volta non ha ancora "imparato" a difendersi con successo.

Conseguenza per l'ospite è un danno estremo che può condurre alla morte e che, quindi, conduce alla morte del parassita stesso.

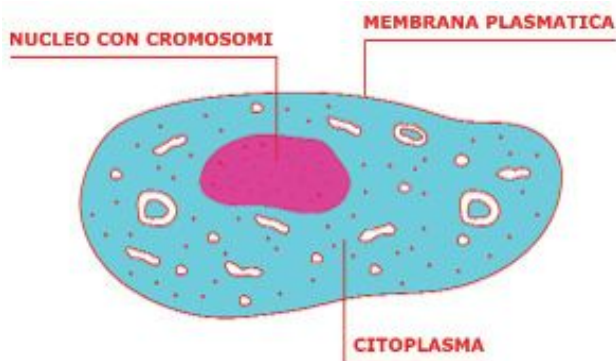
Per quanto riguarda l'ospite si distinguono due categorie:

Ospite definitivo nel quale il parassita compie la riproduzione sessuata del suo ciclo biologico;

Ospite intermedio nel quale il parassita compie una riproduzione asessuata del suo ciclo.

I PROTOZOI

Come è fatto un protozoo



Schema della struttura del Protozoo

I protozoi compongono un sottoregno animale dei Protisti (protozoa, dal greco *pròtos* 'primo' e *zòon* 'animale'), sono organismi unicellulari eucarioti, il cui DNA è contenuto in un nucleo delimitato da membrana, ed eterotrofi; mancano di strutture plastidiche come i cloroplasti.

I protozoi sono costituiti, essenzialmente, di uno o più nuclei e di citoplasma delimitato da una membrana cellulare dalla quale, spesso, partono degli organelli di moto.

La strategia evolutiva dei protozoi è stata quella di sviluppare organelli deputati alla nutrizione, locomozione, riproduzione sì che molti di essi sono caratterizzati da strutture e funzioni molto complesse e differenti.

Il nucleo sferico o discoidale è avvolto da una membrana a due strati e contiene DNA e RNA. Molti protozoi parassiti non possiedono capacità biosintetiche e dipendono dall'ospite per il rifornimento degli steroidi, basi puriniche e pirimidiniche, la loro nutrizione è basata sulla demolizione enzimatica ed assimilazione di molecole complesse; intere cellule possono essere ingerite attraverso un'apertura orale (*Balantidium coli*) o per fagocitosi o pinocitosi attraverso vacuoli digestivi.

La riproduzione può avvenire sia per via sessuata che asessuata: in molte specie di protozoi la mitosi seguita dalla scissione binaria è l'unica forma di moltiplicazione.

I protozoi sono di piccole dimensioni; vanno da $1\mu\text{m}$ (*Enterocytozoon bieneusi*, attualmente considerato un fungo) a $70\mu\text{m}$ (*Balantidium coli*), grazie alle piccole dimensioni e alla distribuzione ubiquitaria si sono adattati a vivere negli ambienti più diversi e molti di loro sono parassiti facoltativi e/o obbligati.

Negli ultimi anni, in conseguenza dell'immigrazione di numerosi soggetti extraeuropei nel nostro territorio, dello spostamento di persone, per motivi di lavoro o di turismo, in zone classicamente endemiche per patologie parassitarie e infine a causa dell'aumentato numero di pazienti con patologie croniche ed immunodepressive si è avuta una maggiore attenzione nei confronti delle infezioni parassitarie.

Le malattie da protozoi sono più frequenti nelle comunità sovrappopolate, con basso livello igienico, in cui il contagio diretto con il copros ed altri escreti è più facile e nei luoghi dove abbondano i vettori di protozoi patogeni.

Negli immigrati dai paesi in via di sviluppo si possono diagnosticare le più svariate parassitosi al momento dell'arrivo nel nostro paese, ma, generalmente, in pochi anni la loro prevalenza si riduce fino ad esaurirsi, va però tenuto conto delle eventuali visite effettuate al paese d'origine.

Anche in Italia, l'uomo, è esposto a numerose parassitosi endemiche: la leishmaniosi viscerale colpisce, in Campania, ogni anno decine di persone; nella popolazione scolastica di una zona depressa della Calabria, fu trovata una percentuale pari al 97% di individui affetti da parassitosi intestinale; furono reperite diverse specie di protozoi: *Entamoeba histolytica*, *Chilomastix mesnili*, *Giardia duodenalis* ed altre specie ritenute commensali.

La comparsa dell'AIDS ha contribuito ad ampliare ed aggravare il problema della patologia infettiva opportunistica; nell'Aids, infatti, sono numerose le infezioni secondarie provocate da protozoi che trovano condizioni favorevoli di sviluppo in pazienti che presentano un deficit dell'immunità cellulo mediata.

Molti microrganismi, facilmente tenuti sotto controllo da un organismo con difese immunitarie integre, esaltano la loro virulenza in caso di immunodeficienze sia patologiche che iatrogene, rientrando nell'ambito dei cosiddetti patogeni "facoltativi", o, con termine più abusato, patogeni "opportunisti".

Le infezioni indotte da protozoi opportunisti nel paziente immunocompromesso rappresentano, per la crescente incidenza e la natura degli agenti eziologici in causa, l'aspetto più interessante della odierna patologia infettiva.

L'ultima revisione effettuata dai Centers for Disease Control and Prevention, in tema specifico di infezioni parassitarie correlate all'Aids segnala come indicativo di sindrome conclamata i quadri clinici provocati da 4 agenti eziologici protozoari: *Pneumocystis* spp. (attualmente considerato un fungo affine ai lieviti), *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium* spp. e *Isospora belli*.

In ragione a quanto esposto sopra c'è ora un ridestarsi d'interesse per la moderna parassitologia umana in Italia; al fine di rispondere al crescente numero di richieste da parte dei clinici e degli infettivologi, in particolare, il Laboratorio di Parassitologia nel corso di questi ultimi anni, ha attivato e messo a punto dei protocolli diagnostici sempre più sensibili e specifici per ottenere una corretta e rapida diagnosi delle patologie parassitarie umane.

DOTAZIONE MINIMA DI UN LABORATORIO DI PROTOZOOLOGIA

L'attività lavorativa del parassitologo è in gran parte dedicata all'osservazione microscopica dei preparati (a fresco, dopo concentrazione, dopo colorazione, in immunofluorescenza, ecc), pertanto è fondamentale, nel Laboratorio di Protozoologia, possedere una buona dotazione strumentale; innanzitutto ottimi microscopi, alcuni dei quali a fluorescenza; sistemi che consentono un'adeguata concentrazione del campione in esame come, per esempio il sistema FLOTAC per l'esame del copros che offre ottima sensibilità e specificità, tanto da far superare la necessità di esaminare 3 campioni prelevati in giorni diversi e che può essere standardizzato sui parassiti da ricercare.

Fondamentale è l'adeguata esperienza professionale dei componenti dell'equipe, questa viene ottenuta ed incrementata con l'osservazione microscopica continua e con la partecipazione ad un attento controllo di qualità interno ed esterno.

Il controllo di qualità mette i partecipanti in grado di monitorare le proprie performances al fine di mantenere ed incrementare la propria efficienza.

LE ATTREZZATURE MINIME INDISPENSABILI sono:

- Microscopi
- Centrifughe
- Cappa chimica
- Cappa a flusso laminare
- Attrezzature accessorie necessarie
- Altre attrezzature
- Materiali di consumo



Microscopi ottici

• MICROSCOPI

I requisiti minimi che i microscopi devono possedere sono:

1. Obiettivi 10x, 40x, 100x
2. Oculari: almeno due di cui, almeno uno, deve avere la scala graduata
3. Microscopio a fluorescenza



Microscopio ottico e a fluorescenza

Gli accessori utili, di cui può essere dotato il microscopio, ma non indispensabili, sono:

- Filtri aggiuntivi per fluorescenza a diverse lunghezze d'onda
- Accessori per osservazioni a contrasto di fase ed in campo scuro
- Accessori per fotocamera ottica e/o digitale
- Accessori per telecamera ottica e/o digitale

CALIBRAZIONE DELL'OCULARE MICROMETRICO

La calibrazione dell'oculare si effettua mediante l'uso di un vetrino micrometrico e di un oculare micrometrico.

Il vetrino micrometrico è un vetrino portaoggetti su cui è inciso un segmento di linea, in genere di 1 mm di lunghezza, suddiviso in intervalli di 100 e 10 μm .

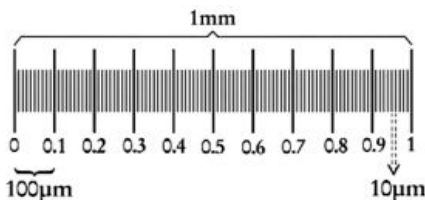
L'oculare micrometrico presenta, inciso sulla lente, un segmento di linea suddiviso in 100 parti ma non è calibrato, occorre quindi calibrarlo per ciascun obiettivo (10x, 40x, 100x).

La procedura per effettuare la calibrazione dell'oculare con scala graduata è la seguente:

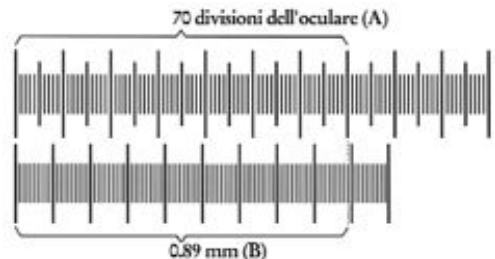
- 1) Togliere uno dei due oculari del microscopio e sostituirlo con l'oculare micrometrico
- 2) Porre il vetrino micrometrico sul piano portaoggetti del microscopio
- 3) Utilizzando l'obiettivo a piccolo ingrandimento (10x) mettere a fuoco la scala micrometrica incisa sul vetrino
- 4) Ruotare l'oculare micrometrico in modo che le due scale appaiano fra di loro parallele
- 5) Agendo sul vetrino micrometrico, far coincidere le linee iniziali delle due scale
- 6) Determinare il numero (A) di divisioni dell'oculare micrometrico che corrisponde ad una determinata lunghezza (B) sul vetrino micrometrico
- 7) Calcolare a quanto corrisponde una divisione dell'oculare micrometrico
- 8) Ripetere le operazioni dei punti da 3 a 7 per ciascun obiettivo del microscopio
- 9) Registrare, su una tabellina, i valori di una divisione dell'oculare per ciascun obiettivo



Oculare



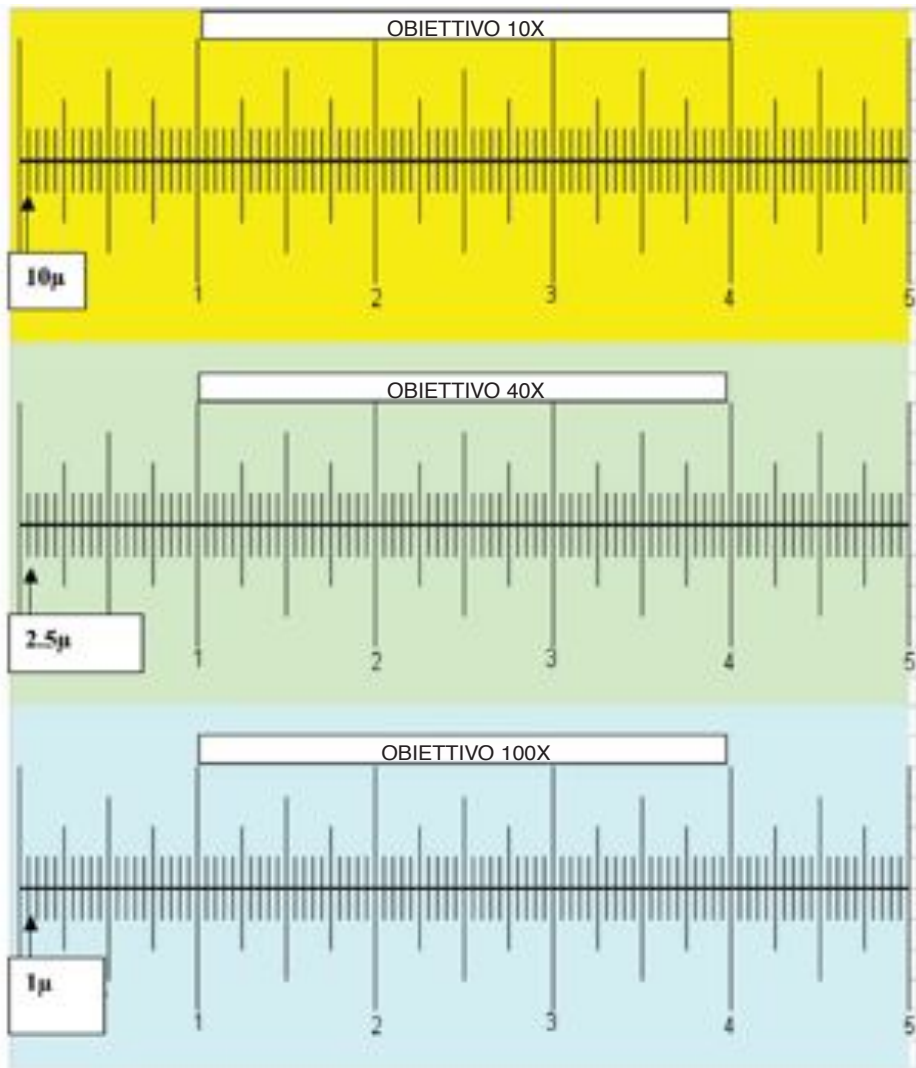
Vetrino



Esempio di calibrazione

Tabella C

La **tabella C**, che illustra quanto sopra detto, è utile da tenere in vista, sul tavolo del microscopio, per misurare i protozoi, evidenziati durante l'osservazione microscopica e conoscere con esattezza la loro grandezza.



Dalla calibrazione si ottiene che, per ciascun obiettivo utilizzato, ogni segmento della scala dell'oculare corrisponde ad una specifica grandezza;

- Con obiettivo 10x ogni segmento corrisponde a 10μ ;
- Con obiettivo 40x ogni segmento corrisponde a 2.5μ ;
- Con obiettivo 100x ogni segmento corrisponde a 1μ .

- **CENRIFUGHE**

Nel Laboratorio, per le normali procedure da eseguire, è sufficiente:

- normale centrifuga con indicatore e regolatore di r.p.m. e con impostazione dei tempi di centrifugazione;
- centrifuga da banco per micropiastre con indicatore di r.p.m. e timer.

Può essere utile la dotazione di una citocentrifuga per la preparazione adeguata dei vetrini per le ricerche speciali (Ricerca di *Pneumocystis*, ecc.).



Centrifuga



Adattatore per provette



Adattatore per piastre microtiter

- **CAPPA CHIMICA**

Per evitare il rischio di esposizioni a contaminanti chimici volatili come etere, xilene, alcool ecc. è consigliabile che l'operatore lavori sotto cappa di aspirazione che convoglierà all'esterno, attraverso un filtraggio, l'aria aspirata.

- **CAPPA A FLUSSO LAMINARE**

Tutte le operazioni che comportano la manipolazione dei campioni biologici devono essere eseguite sottocappa per ridurre al minimo i rischi di contaminazione dei campioni con l'ambiente esterno ed il rischio di infezione per gli operatori.

I filtri della cappa vanno periodicamente controllati ed eventualmente sostituiti da personale specializzato.



Cappa a flusso laminare

- Le attrezzature necessarie sono, inoltre:
 Frigocongelatore per congelare sieri, reagenti ecc.
 Frigotermostato per incubare, a temperature standard, eventuali colture.
 Termostato per incubare a 37°C le ricerche di antigeni o anticorpi in immunofluorescenza, o ELISA.
 Bagnomaria per scomplementare i sieri in esame a 56°C.
 Agitatore vortex per fluidificare i campioni di espettorato o BAL o/e campioni di copros.
 Sistema informatico per accettazione, registrazione e refertazione.



Frigo-termostato a 23°C per la coltura di *Leishmania* spp.

- Le altre attrezzature sono quelle di un normale laboratorio di analisi, cioè:
 Diluitori
 Dispensatori
 Preparatori automatici
 Micropipette automatiche
 Vetrini portaoggetto e coprioggetto
 Vetrini per immunofluorescenza con 1, 2 o più pozzetti
 Pipette, tamponi ovattati ecc.
 Tutti i materiali di consumo devono essere di buona qualità.

Le fasi operative

Le fasi operative del Laboratorio di Protozoologia sono:

- A) RACCOLTA E TRASPORTO DEI CAMPIONI
- B) TECNICHE DIAGNOSTICHE PER LA RICERCA ED IDENTIFICAZIONE DEI PARASSITI
- C) REFERTAZIONE E REGISTRAZIONE DEI RISULTATI

La diagnosi Parassitologica si effettua attraverso l'esecuzione di queste 3 fasi che hanno la stessa valenza; la **raccolta** del campione da analizzare deve essere accurata, così il **trasporto** del campione in laboratorio, quindi le **tecniche** da adottare saranno appropriate a ciascun campione da analizzare, infine l'**identificazione** e la **refertazione** devono essere raggiunte con certezza ed espresse in modo chiaro.

A) RACCOLTA E TRASPORTO DEI CAMPIONI

Per la corretta raccolta ed il trasporto dei campioni è utile fornire ai pazienti e/o ai reparti di degenza istruzioni dettagliate; il campione deve essere accompagnato dalla richiesta del clinico compilata correttamente in ogni sua parte, che riporta informazioni anamnestiche, soprattutto su eventuali viaggi effettuati dal paziente (vedi tab. A). Inoltre è utile fornire ai reparti di degenza ed agli ambulatori un elenco completo degli esami eseguibili nel laboratorio, (vedi tabella B), i tempi medi, minimi e massimi di esecuzione degli esami, l'eventuale necessità di prenotazione, la tecnica diagnostica utilizzata per ciascun esame, ecc.

La raccolta del campione biologico sarà adeguata a ciascun campione biologico da analizzare; sarà, quindi, dettagliatamente descritta nei successivi capitoli.



Contenitore per urine e coprosi



Contenitore per Bal ed espettorato

**RICHIESTA DI ESAMI
PARASSITOLOGICI E/O SIEROLOGICI**

Data Reparto

Paziente Cartella Clinica

Domicilio Data di nascita

Nazionalità In Italia da

Viaggio in HIV

MATERIALE INVIATO

<input type="checkbox"/> COPROS	<input type="checkbox"/> URINE	<input type="checkbox"/> TAMPONE VAGINALE
<input type="checkbox"/> ESPETTORATO	<input type="checkbox"/> BAL	<input type="checkbox"/> BAS
<input type="checkbox"/> SANGUE VENOSO	<input type="checkbox"/> SANGUE PERIFERICO	<input type="checkbox"/> ASP. SPLENICO
<input type="checkbox"/> ASP. LINFONODALE	<input type="checkbox"/> MIDOLLO OSSEO	<input type="checkbox"/> LIQUOR
<input type="checkbox"/> BIOPSIA EPATICA	<input type="checkbox"/> BIOPSIA DUODENALE	<input type="checkbox"/> BIOPSIA

ESAMI RICHIESTI

PARASSITOLOGIA

SIEROLOGIA

<input type="checkbox"/> RICERCA AMEBA	<input type="checkbox"/> RICERCA AB ANTI-AMEBA
<input type="checkbox"/> RICERCA GIARDIA	<input type="checkbox"/> RICERCA AB ANTI-IDATIDE
<input type="checkbox"/> RICERCA CRYPTOSPORIDIO	<input type="checkbox"/> RICERCA AB ANTI-LEISHMANIA
<input type="checkbox"/> RICERCA ELMINTI	<input type="checkbox"/> RICERCA AB ANTI-TRYPANOSOMA
<input type="checkbox"/> RICERCA PNEUMOCYSTIS	<input type="checkbox"/> RICERCA AB ANTI-SCHISTOSOMA
<input type="checkbox"/> RICERCA PLASMODIO	<input type="checkbox"/> RICERCA AB ANTI-PLASMODIUM
<input type="checkbox"/> RICERCA LEISHMANIA	<input type="checkbox"/> RICERCA AB ANTI-ASCARIDE
<input type="checkbox"/> RICERCA MICROSPORIDI	<input type="checkbox"/> RICERCA AB ANTI-CISTICERCO
<input type="checkbox"/> RICERCA CICLOSPORA	<input type="checkbox"/> RICERCA AB ANTI-TOXOCARA
<input type="checkbox"/> RICERCA TRYCOMONAS	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> RICERCA ECHINOCOCCO	<input type="checkbox"/> COLTURA AMEBA
<input type="checkbox"/> RICERCA SCHISTOSOMA	<input type="checkbox"/> COLTURA LEISHMANIA

Tabella per la richiesta di esami parassitologici

Tabella B

prestazione	metodo	prenotazione	tempo di esecuzione
Esame Parassitologico del copros:	a fresco a fresco e dopo concentrazione	no	1-4 giorni
Ricerca coccidi: Cryptosporidium, Cyclospora, Isospora e Sarcocystis	Carbolfucsina Ziehl-Neelsen mod. ed immunofluorescenza	no	1-2 giorni 1-5 giorni
Ricerca Microsporidi	Weber mod	no	3-5 giorni
Enterotest	a fresco a fresco e dopo concentrazione	si	1-4 giorni
Esame Parassitologico delle urine: Ricerca uova di Schistosoma	a fresco e dopo concentrazione	no	1-3 giorni
Esame Parassitologico dell'aspirato cistico: Ricerca Echinococco ed Entamoeba	a fresco e dopo concentrazione	si	1-3 giorni
Esame Parassitologico del liquido cefalorachidiano: Ricerca Toxoplasma, Trypanosoma ed Entamoeba	a fresco immunofluorescenza e colorazioni specifiche	no no	1 giorno 4-5 giorni
Esame Parassitologico del Secreto Vaginale: Ricerca Trichomonas vaginalis	a fresco colturale	si no	1 giorno 3-5 giorni
Esame Parassitologico Biopsia midollo osseo e/o aspirato slenico: Ricerca Leishmania	May Grunwald-Giemsa coltura	no si	1-2 giorni 7-30 giorni
Esame Parassitologico Lavaggio Broncoalveolare, Broncoaspirato ed Espettorato: Ricerca Pneumocystis, Cryptosporidio Toxoplasma e Microsporidi	Giemsa ed IFA Ziehl-Neelsen ed IFA Weber	no no no	1-5 giorni
Esame Parassitologico del Sangue: Ricerca Plasmodium e Trypanosoma	May Grunwald-Giemsa a fresco, Giemsa e IFA	no no	1-2 giorni 1-4 giorni
Ricerca Enterobius Vermicularis	Scotch test	no	1 giorno

Elenco degli esami eseguibili nel laboratorio di parassitologia

B) TECNICHE DIAGNOSTICHE PER LA RICERCA ED IDENTIFICAZIONE DEI PROTOZOI

Il Laboratorio di Parassitologia, al pari di tutte le altre strutture di diagnosi sia pubbliche che private, in base alle normative per l'accreditamento, deve, necessariamente, essere dotato di un manuale delle procedure dove vengono schematizzate e raccolte tutte le tecniche di ricerca che gli operatori del settore impiegano routinariamente per l'esame dei campioni biologici.

Le tecniche diagnostiche vengono sperimentate e scelte sulla base delle esigenze della struttura in cui il laboratorio svolge la sua attività.

La raccolta delle metodiche deve essere sempre disponibile per consentire ad operatori non abituali, che per motivi contingenti ne avessero bisogno (per esempio per la ricerca di *Plasmodium* in emergenza), di poter operare secondo gli schemi adottati dal laboratorio.

La raccolta delle metodiche deve essere periodicamente aggiornata, in particolare quando intervengono modificazioni nella fornitura dei reagenti, ed integrata da nuove tecniche eventualmente adottate.

Le tecniche prescelte devono essere eseguite da tutti gli operatori senza immotivate e non concordate variazioni personali. Eventuali variazioni vanno fatte solo dopo aver verificato l'effettiva ottimizzazione della tecnica in esame e comunicate a tutti i componenti dell'equipe.

Nel Laboratorio di Parassitologia vengono eseguite, prevalentemente, tecniche di ricerca ed identificazione dirette, che consistono in:

- 1) Esame macroscopico**
- 2) Esame microscopico diretto**
- 3) Esame microscopico dopo concentrazione e/o colorazione**
- 4) Esami colturali**
- 5) Tecniche di biologia molecolare: PCR**
- 6) Saggio immunoenzimatico (ELISA)**
- 7) Immunofluorescenza diretta (IFD) e indiretta (IFI)**
- 8) Test immunocromatografici (ICT)**

Per utilizzare con successo le metodologie di diagnosi diretta "le osservazioni macroscopiche e microscopiche", punti 1,2,3 delle tecniche è necessario che il Parassitologo tenga ben presente i seguenti punti:

- **Capacità professionale dei componenti dell'equipe**
 - **Tempi di osservazione dei preparati**
 - **Metodo di osservazione dei campioni al microscopio**
 - **Schemi e tavole iconografiche dei parassiti**
 - **Allestimento di preparati stabili**
 - **Risoluzione dei casi dubbi**
 - **Partecipazione a VEQ (Valutazione esterna di qualità)**
- **Capacità professionale** dei componenti dell'equipe:

La diagnostica parassitologica è fondata prevalentemente sull'individuazione e sul riconoscimento microscopico dei parassiti nei materiali biologici.

L'attività lavorativa del Parassitologo è perciò in gran parte dedicata all'osservazione microscopica dei preparati (a fresco, dopo concentrazione, dopo colorazione, in immunofluorescenza, ecc.); in ciò essa si differenzia notevolmente da quella del Batteriologo e del Virologo, che utilizzano in gran parte tecniche diagnostiche sierologiche (prevalentemente automatizzate) e/o tecniche di identificazione indirette (prove biochimiche, sieroagglutinazione, ecc)

Il Parassitologo deve, necessariamente, conoscere il ciclo biologico e le modalità di trasmissione dei protozoi, queste conoscenze sono di estrema importanza per la scelta, raccolta, trasporto e trattamento del campione biologico.

Deve, necessariamente, conoscere la morfologia, la grandezza e le affinità tintoriali del parassita da ricercare, perchè la sua attività si fonda quasi esclusivamente sull'osservazione microscopica dei preparati, opportunamente trattati.

Le partecipazioni a corsi, convegni, congressi; lettura di libri e riviste sono importanti per un continuo aggiornamento;

i contatti con centri di riferimento (per esempio Istituto Superiore di Sanità), ecc sono utili per risolvere i casi dubbi.

- **Tempi di osservazione** dei preparati:

I tempi di osservazione, al microscopio, dei campioni preparati devono essere prolungati, specialmente nella ricerca di parassiti che sono patogeni anche se presenti in bassa concentrazione nei campioni biologici (trofozoiti e cisti di alcune specie di protozoi intestinali, amastigoti di *Leishmania* in biopsie di midollo osseo ed aspirati splenici, ecc.)

- **Metodo di osservazione** dei campioni

Il metodo di ricerca, al microscopio, deve essere aggiustato sulla grandezza del **parassita da ricercare:**

- la ricerca di *Plasmodium* e *Leishmania* richiede l'utilizzo dell'obiettivo 100x,
- i protozoi intestinali, invece, vanno ricercati con obiettivo 40x.

- **Schemi e tavole**

Durante la lettura del preparato al microscopio è fondamentale avere a disposizione tavole e schemi riportanti le caratteristiche morfologiche dei parassiti per consentire una valutazione corretta dei preparati che si stanno osservando.

Gli schemi, illustrati nei vari capitoli, riportano le caratteristiche interne di ciascun parassita (il nucleo e gli organelli citoplasmatici) e la grandezza delle varie forme che il parassita assume nel suo ciclo biologico.

Gli allegati A,B e C riportano le caratteristiche delle forme vegetative e cistiche dei protozoi intestinali.

- **Allestimento di preparati stabili**

Si allestiscono, frequentemente, preparati stabili: strisci del campione biologico su vetrino, per le numerose colorazioni permanenti che si possono eseguire, ciascuna delle quali mette in evidenza le proprietà tintoriali e le caratteristiche morfologiche che sono proprie di ciascun parassita; le metodiche di colorazione sono, dettagliatamente, riportate di seguito. I campioni di copros, vengono comunemente fissati in Formalina al 5% o al 10%, SAF, PVA, per conservare per molto tempo il campione e poi processarlo attraverso la tecnica di concentrazione che il Laboratorio ha adottato.

L'allestimento dei preparati stabili è utile, non solo a scopi didattici, specialmente per i parassiti di non frequente riscontro, che possono, così, essere conservati a lungo ed osservati periodicamente.

- **Risoluzione dei casi dubbi**

È utile stabilire contatti con centri di riferimento riconosciuti per risolvere dubbi interpretativi. Talora può essere necessario inviare campioni e/o preparati stabili a tali centri per avere conferma di diagnosi difficili o anche per tipizzare un parassita isolato in coltura. (Per es. coltura di *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Entamoeba* ecc.)

- **Partecipazione a VEQ**

La partecipazione ad un programma di Valutazione Esterna di Qualità è il metodo ottimale per verificare il livello di esperienza raggiunto e per correggere eventuali errori, è un utile strumento per incrementare tale livello aggiornando le proprie conoscenze; il materiale informativo allegato ai risultati è completo e dettagliato. La principale funzione della VEQ è quella di mettere i partecipanti in grado di monitorare le proprie performances al fine di mantenere ed incrementare la propria efficienza.

Consente, inoltre, di visualizzare parassiti mai riscontrati in precedenza, ma che, dato l'incremento di presenze di extracomunitari nelle nostre regioni e l'aumento

dei viaggi (per turismo o lavoro) in paesi dove sono frequenti parassitosi rare o assenti nelle nostre regioni, dobbiamo conoscere per poter successivamente riconoscere.

Nel Laboratorio di Parassitologia dell'Ospedale D. Cotugno la VEQ è iniziata da circa 10 anni e comprende sia la parassitologia intestinale, sia quella ematica. Sporadicamente ci è stato richiesto di analizzare anche campioni biologici diversi (urine, liquido cistico, midollo osseo, aspirato splenico, espettorato, ecc.).

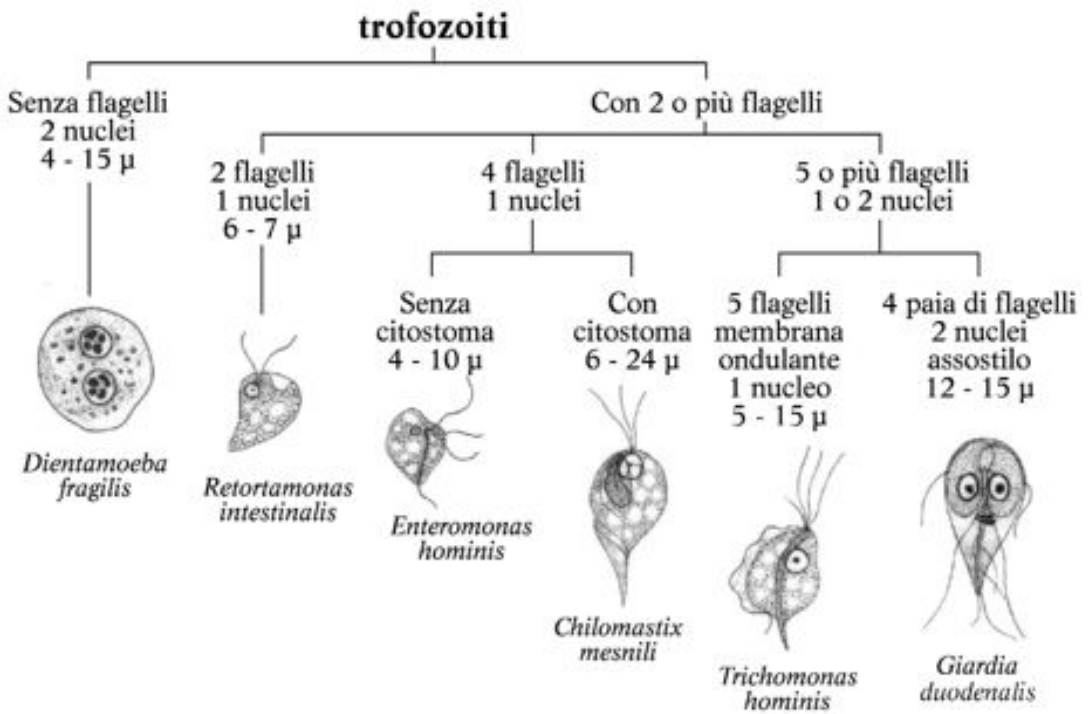
Nostro referente è "The Consultant Parasitologist, Department of Clinical Parasitology – Hospital for Tropical Diseases" con sede a Londra.

Ci pervengono 8 spedizioni annue di campioni da analizzare; ogni spedizione è costituita da almeno un campione ematico e da uno a tre campioni di copros. I campioni di copros consistono in sospensioni di copros fissate in opportuno conservante o in strisci fissati e/o colorati; quelli ematici sono strisci di sangue colorati con Giemsa o altra colorazione specifica.

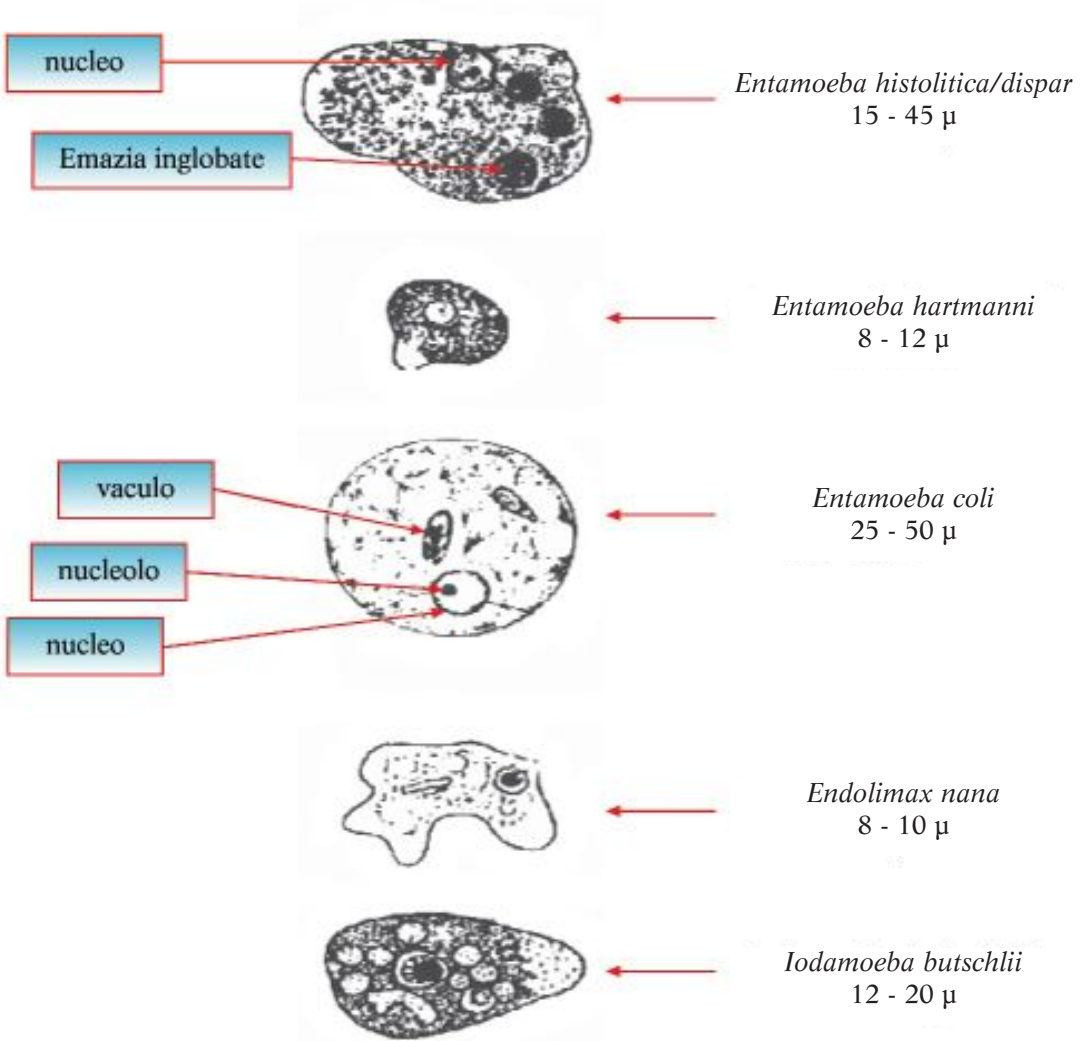
Ci viene richiesto di analizzare ciascun campione con le tecniche normalmente utilizzate nel nostro laboratorio e di inviare su appositi moduli, entro date prestabilite, i risultati ottenuti per posta, per fax o per via telematica.

Talvolta i campioni possono essere volutamente privi di parassiti.

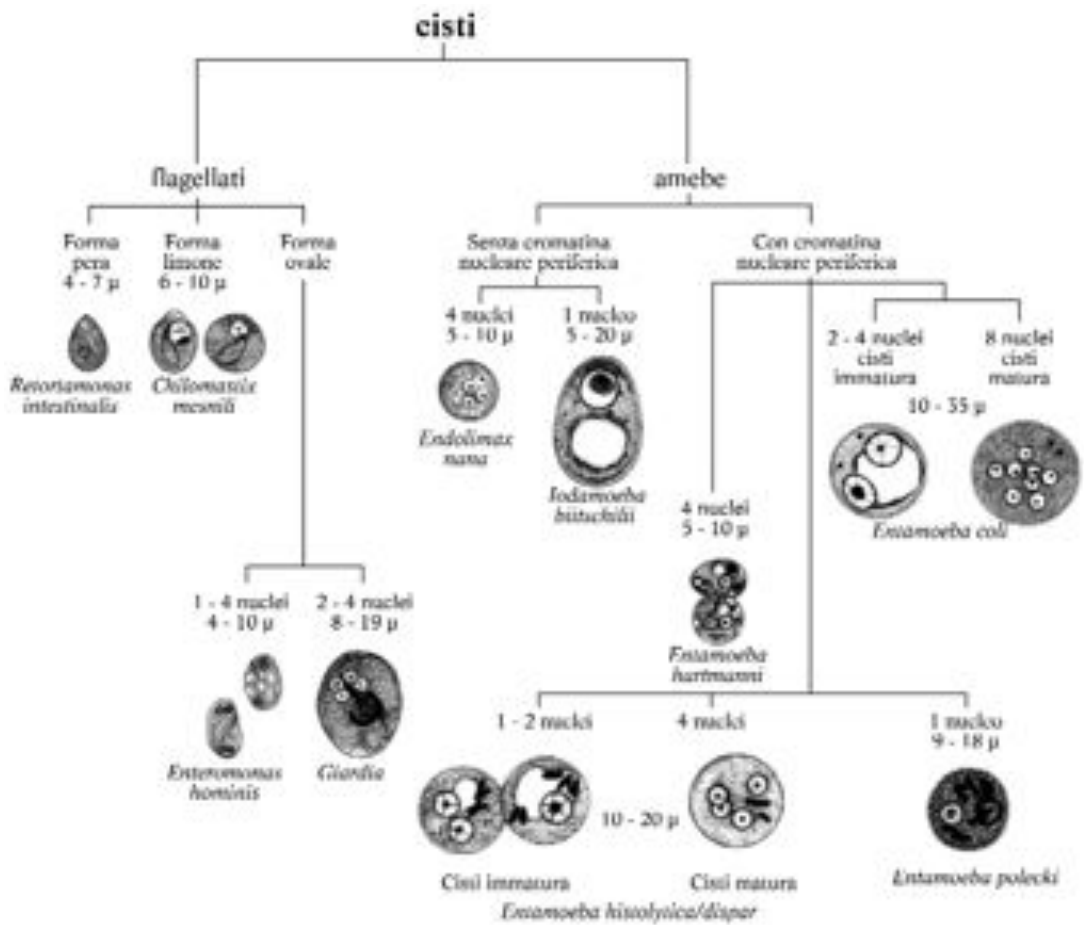
I trofozoiti dei protozoi flagellati



I trofozoiti di amebe



Le cisti di protozoi



4) Esami colturali:

si possono allestire con successo le colture in vitro per l'isolamento delle amebe e delle leishmanie.

COLTURA DI AMEBE sec. ROBINSON

Terreno per l'isolamento primario e per il mantenimento di amebe intestinali. Sono stati allestiti molti tipi di terreno per questi protozoi, tutti di tipo difasico, quello considerato migliore è il mezzo di coltura sviluppato da Robinson.

Il requisito principale del terreno di coltura per l'isolamento delle Amebe è che il mezzo deve essere arricchito con batteri, amido di riso e proteine rappresentate generalmente da siero.

La descrizione dettagliata dell'allestimento del terreno è rimandata al I capitolo "Esame parassitologico del Copros".

COLTURA DI *LEISHMANIA*:

TERRENO DI TOBIE MODIFICATO DA EVANS (EMTM)

Terreno per l'isolamento primario e per il mantenimento di *Leishmania*.

Le leishmanie possono essere isolate abbastanza facilmente sia da uomo che da cane e flebotomo.

Nel 1904 Roger per primo dimostrò la possibilità di coltivare in vitro ceppi di *Leishmania*.

Da allora, molti terreni di coltura sono stati preparati, ma oggi quelli più comunemente usati sono i terreni difasici, cioè quelli costituiti da una parte liquida e una parte solida, quest'ultima con l'aggiunta di sangue fresco di coniglio intero citratato e defibrinato ed inattivato per 30' a 56°C

In questo terreno, incubato a 23°C, le leishmanie si moltiplicano nella forma promastigote.

La descrizione dettagliata dell'allestimento di questa coltura in vitro è rimandata al II capitolo "Esame parassitologico del Sangue e Sistema reticolo endoteliale".



Parte solida del terreno di Tobie modificato da Evans (EMTM)

5) Tecniche di biologia molecolare dirette: PCR

Per diagnostica molecolare in Parassitologia si intende solitamente la possibilità di identificare un organismo in base ad una o più sequenze geniche specifiche.

La diagnostica molecolare si rivela spesso, ma non sempre, più sensibile e/o più specifica dei metodi tradizionali e si ricorre sempre più ad essa quando il microrganismo è difficilmente od affatto coltivabile, quando cresce molto lentamente in vitro (*Leishmania* spp), quando la sua manipolazione può essere troppo pericolosa per l'operatore e/o per la comunità (come ad esempio per antrace e, più in generale, per tutti gli altri agenti di classe A potenzialmente implicati in attacchi bioterroristici, con particolare riguardo ai virus delle febbri emorragiche), quando infine il costo di una diagnosi tradizionale è più elevato di quello di una diagnosi molecolare.

Presenta inoltre il vantaggio di poter in particolari casi essere effettuata direttamente sul campione, di non avere la necessità di attendere che il microrganismo cresca e neppure che il microrganismo sia vivo al momento del processamento del campione.

Molte delle tecniche correntemente usate in un laboratorio di diagnostica si basano sull'amplificazione mediante PCR (Polymerase Chain Reaction) degli acidi nucleici, sia di specifici frammenti di DNA che di RNA dopo trascrizione in cDNA attraverso l'uso di una trascrittasi inversa.(RT-PCR).

Una volta amplificati questi frammenti possono essere analizzati in vari modi: dimensione dei frammenti, analisi delle sequenze, riamplicazione con una seconda coppia di primer o ibridizzazione con sonde marcate. L'analisi può essere sia qualitativa che quantitativa, attraverso i vari formati delle tecniche di Real-time PCR. Un metodo molto usato per l'identificazione è l'analisi della sequenza di particolari parti del genoma (per esempio, 16S o 23S rRNA).

In generale, i metodi di diagnostica molecolare a fronte di innegabili vantaggi, presentano alcuni punti critici: richiedono un diverso grado di competenze tecniche da parte degli operatori, sono più costosi per quanto riguarda le apparecchiature e, in generale, l'interpretazione dei risultati richiede un più elevato livello di competenze. E ancora: i metodi basati sul DNA non distinguono fra microrganismi vivi e morti; i metodi basati sull'amplificazione dell'RNA (RT-PCR) possono identificare i microrganismi vivi (ma non le spore) e sono molto più complessi da utilizzare dei metodi tradizionali. Inoltre questi metodi se usati direttamente sul campione, non permettono che il microorganismo possa essere ulteriormente processato. Per altri metodi come il microarray, la limitazione è data dalla necessità di costruire un database il più ampio e completo possibile perché possa essere utilizzato fruttuosamente.

Tuttavia con l'introduzione di queste nuove metodiche, la diagnostica ha avuto cambiamenti in termini di sensibilità e rapidità impensabili solo pochi anni fa.

La PCR è una tecnica che prevede l'amplificazione di una sequenza di DNA di cui si conoscono gli estremi: in particolare per realizzarla si ha bisogno di:

- 1) Sequenza da amplificare.
- 2) NTP (nucleosidi trifosfati, come ATP, CTP, GTP, TTP).
- 3) Primer (Sequenze complementari agli estremi della sequenza da amplificare).
- 4) Taq polimerasi (una DNA polimerasi estratta da un batterio termofilo, in grado di non denaturarsi ad alte temperature).
- 5) Soluzione Buffer (i tamponi necessari per la reazione di elongazione).

Un tipico ciclo di PCR:

La PCR avviene in una serie di cicli composti da tre fasi:

1. **Denaturazione** al calore di uno stampo di DNA che deve essere copiato (94 - 99 °C)
2. **Appaiamento** (*annealing*) di coppie di primer (30 - 65 °C)
3. **Estensione** da parte della Taq polimerasi a partire dai primer appaiati (65 - 72 °C)

I “prodotti lunghi” originati in questo modo fungeranno da stampi per l’uno o l’altro degli oligonucleotidi durante i cicli successivi, e l’estensione di questi oligonucleotidi dalla polimerasi produrrà molecole di una lunghezza definita, corrispondente a quella della sequenza di interesse.

Queste molecole fungeranno anch’esse come stampi per l’uno o per l’altro oligonucleotide producendo altre molecole di grandezza definita. In questo modo si svilupperà una reazione a catena che porterà all’accumulo di uno specifico DNA in maniera esponenziale rispetto al numero di cicli di reazione, cioè la loro quantità sarà, linearmente proporzionale, al numero di cicli effettuati.

La PCR è una tecnica ancora in sperimentazione, quindi non viene utilizzata dai laboratori per le identificazioni routinarie: il principale problema della tecnica di PCR è la contaminazione dei prodotti di amplificazioni che può causare la presenza di falsi positivi a partire da sequenze aspecifiche.

Pertanto il laboratorio per effettuare analisi in PCR deve essere attrezzato con stanze separate dalle altre operazioni, vetreria dedicata e massima sterilità dei materiali. Infine gli alti costi dei reattivi rendono questa nuova tecnica ancora di difficile impiego.

In Parassitologia viene impiegata, da laboratori di referenza altamente specializzati, per identificare plasmodi malarici e *Babesia* nei campioni ematici, *Leishmania* in aspirato midollare e sangue, *Toxoplasma* in liquor e/o broncoaspirato e sangue, *Pneumocystis jirovecii* in espettorato, liquido di lavaggio broncoalveolare o broncoaspirato.

6) Saggio Immunoenzimatico (ELISA)

(Saggio di immunoassorbimento con enzima coniugato (ELISA, "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay").

Questo test viene impiegato in Protozoologia per la ricerca diretta dell'antigene specifico di *Entamoeba*, *Giardia* e *Cryptosporidium* dal campione di copros.

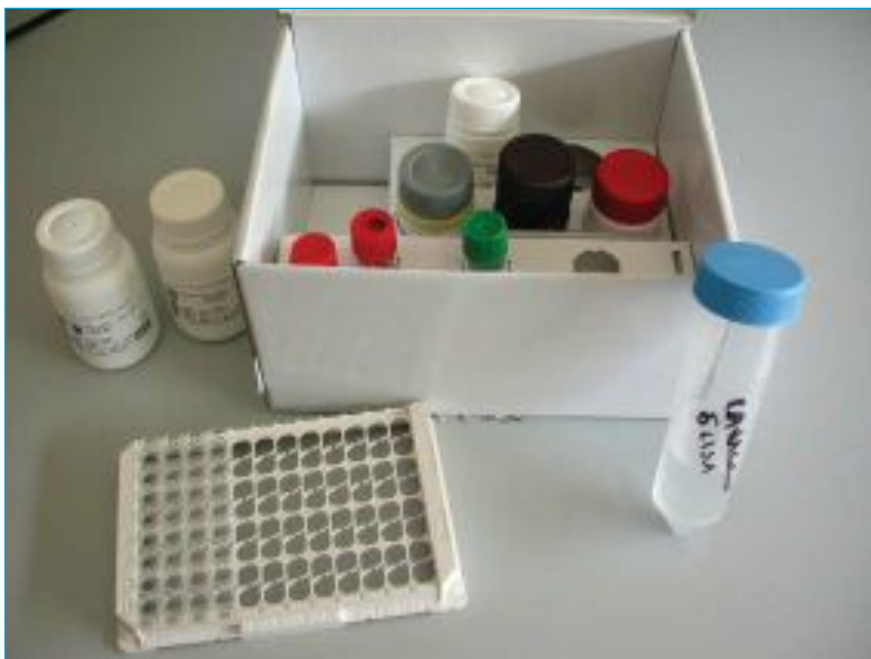
I pozzetti di reazione, sensibilizzati con anticorpi specifici, si cimentano col campione biologico, opportunamente trattato e si incuba per alcune ore (2-6 h) a 37° C.

Se nel campione testato, sono presenti antigeni, questi si legheranno ai pozzetti sensibilizzati.

L'aggiunta dell'anticorpo specifico coniugato con un enzima (fosfatasi alcalina, perossidasi) e la successiva aggiunta, dopo i necessari lavaggi, del substrato colorimetrico specifico per l'enzima, darà origine, nel caso di responso positivo, ad una modificazione dello spettro di assorbimento del substrato con la possibilità di registrare l'assorbimento a una data lunghezza d'onda.

La caratteristica dell'ELISA è la sua versatilità, cioè la sua abilità nel determinare antigeni di diverse morfologie e dimensioni.

Gli svantaggi principali dei test ELISA sono l'impossibilità di osservare la reazione direttamente come nell'IFD e/o IFI.



Reagenti per test in ELISA

7) Immunofluorescenza Diretta (IFD) e Indiretta (IFI)

Sostanze fluorescenti come la fluoresceina o la rodamina possono essere legate agli anticorpi senza che questo legame alteri la proprietà dell'anticorpo di legare l'antigene specifico.

Questi complessi "anticorpo-fluoresceina_antigene-specifico" possono essere visualizzati al microscopio a luce ultravioletta perchè intensamente fluorescenti.

Si utilizzano due test in immunofluorescenza;

test diretto o immunofluorescenza diretta (IFD) quando l'anticorpo diretto contro l'antigene specifico è coniugato direttamente con il fluorocromo ed applicato direttamente sul campione da analizzare;

test indiretto o immunofluorescenza indiretta (IFI) quando viene applicato sul campione da analizzare prima l'anticorpo specifico contro l'antigene da ricercare, poi, dopo l'incubazione e il lavaggio, sul pozzetto di reazione, viene posto un siero anti-immunoglobuline coniugate con fluorocromi.

In commercio sono disponibili anticorpi monoclonali fluorescinati diretti contro vari antigeni di *Giardia*, *Cryptosporidium* quindi si effettuerà un'immunofluorescenza diretta IFD; mentre per la ricerca del *Plasmodium*, *Pneumocystis*, *Entamoeba* e *Toxoplasma*, si effettuerà un'immunofluorescenza indiretta IFI.

Sia con l'impiego dell'IFD che dell'IFI i protozoi, eventualmente presenti, nel campione analizzato, appariranno, osservati al microscopio a fluorescenza, di colore verde mela sul fondo nero-marrone.

La caratteristica dell'IFD e dell'IFI è la sua versatilità, cioè la sua abilità nel determinare antigeni di diverse morfologie e dimensioni e osservare direttamente i parassiti in microscopia a fluorescenza.

La criticità offerta dall'osservazione microscopica è un valido ausilio per evitare i falsi positivi, inoltre la possibilità di evidenziare anche uno solo dei protozoi presenti, reso fluorescente dalla reazione, nel campione analizzato, aumenta la sensibilità della ricerca.

8) Test Immunocromatografici (ICT)

Questi test sono basati su una reazione cromogenica.

Sono test rapidi che offrono un'alta sensibilità dell'esame e ciò li rende molto utili come screening al letto del paziente per escludere o diagnosticare tempestivamente la malattia.

La positività del test è evidenziabile ad occhio nudo perché il legame antigene-anticorpo formerà una banda colorata ben visibile sulla membrana di reazione.

In parassitologia si impiegano essenzialmente per la ricerca di *Plasmodium*, su prelievo periferico o venoso e di *Giardia* e *Cryptosporidium* in campioni di copros.

Questi test saranno trattati dettagliatamente nei capitoli dedicati ai protozoi interressati.

Si rende, comunque, necessaria la conferma con metodi tradizionali, cioè l'esame microscopico che richiede una lettura e una interpretazione effettuata da personale esperto.

Nel Laboratorio di Protozoologia, possono essere eseguite tecniche indirette di ricerca, cioè ricerche degli anticorpi eventualmente prodotti, dal paziente in esame, a seguito di un processo patologico a carico di organi o tessuti indotto dal protozoo. In questi casi, si ricorre all'impiego di antigeni specifici protozoari che legheranno gli anticorpi eventualmente presenti nel siero del paziente.

Questo legame (antigene protozoario-anticorpo specifico prodotto) può essere evidenziato con tecniche di:

- **IFI (Immunofluorescenza Indiretta)**

In commercio sono disponibili vetrini, multi-pozzetto, in cui sono fissati organismi interi di *Leishmania*, *Giardia*, *Cryptosporidium*, *Plasmodium*, *Trypanosoma*, Amebe e *Toxoplasma*.

Si pone nei pozzetti con l'antigene un'aliquota della diluizione scalare effettuata al siero del paziente, dopo l'incubazione e i lavaggi, si pone l'antisiero coniugato con fluoresceina.

Se presenti gli anticorpi nel campione analizzato, i protozoi sul pozzetto del vetrino appariranno di colore verde mela sul fondo nero-marrone.

- **Emoagglutinazione (IHA)**

Test di emoagglutinazione indiretta su micropiastra per la determinazione qualitativa e semiquantitativa di anticorpi specifici; la negatività del test sarà evidenziata dalla sedimentazione degli eritrociti che formeranno, sul fondo della micropiastra, un bottone a margini netti, al contrario la positività sarà evidenziata dalla presenza di una sospensione omogenea.

Il titolo anticorpale presente nel siero in esame corrisponderà alla più alta diluizione in cui si osserva ancora l'emoagglutinazione.

In commercio sono disponibili diversi kit per l'emoagglutinazione contenenti emazie sensibilizzate con antigeni specifici; si possono ricercare così, in Protozoologia, anticorpi anti-Ameba, anti-*Trypanosoma* ecc., si raccomanda, nell'acquisto di questi test, che l'antigene specifico presente nel kit sia legato ad emazie umane e non ad emazie animali perché in quest'ultimo caso nell'esecuzione del test si possono osservare false reazioni di agglutinazione.

- **Saggio immunoenzimatico (ELISA)**

La tecnica rileva il complesso antigene-anticorpo mediante enzyme-linked immunosorbent assay).

PROCEDURA:

- Adsorbimento dell'antigene sul fondo di una vaschetta di reazione (provetta, piastra Petri, pozzetto di una piastra multi-pozzetto in genere 96) per ELISA.
- Un'aliquota delle soluzioni da analizzare, per la ricerca dell'anticorpo specifico, viene aggiunta alla vaschetta di reazione.
- Dopo l'incubazione, per permettere la formazione dell'eventuale complesso antigene-anticorpo, la soluzione viene rimossa.
- Incubazione con anticorpo secondario per la rivelazione del complesso antigene-anticorpo primario.

- Allontanamento dell'anticorpo secondario in eccesso. L'anticorpo secondario formerà un complesso con l'anticorpo primario a sua volta associato all'antigene (specifico). L'anticorpo secondario è modificato e porta legato un enzima (tipicamente perossidasi o fosfatasi alcalina).
- Rilevazione del complesso antigene-anticorpo: aggiunta del substrato dell'enzima coniugato all'anticorpo secondario.

Si sceglie un substrato sintetico per cui il prodotto della reazione con l'enzima coniugato all'anticorpo secondario è colorato (tipicamente: giallo per la fosfatasi alcalina o rosso marrone per la perossidasi). La presenza del complesso antigene-anticorpo primario viene rilevata attraverso lo sviluppo del colore. L'intensità del colore dipenderà (a parità di tempo di incubazione) dal numero di complessi presenti, fornendo una misura indiretta del titolo.

RISULTATI di un test ELISA:

L'assenza del colore giallo indica l'assenza del complesso antigene-anticorpo primario nel campione analizzato; l'intensità del colore nei diversi pozzetti della piastra ELISA è proporzionale al numero di complessi antigene-anticorpo (primario) formati e quindi alla concentrazione dell'anticorpo (in grado di legare l'antigene primario) nel campione analizzato.

- **Immunoblotting** (Western blotting)

L'antigene viene precedentemente separato mediante elettroforesi su gel di poliacrilamide in condizioni denaturanti. Le proteine vengono successivamente trasferite su membrana di nitrocellulosa. La membrana viene successivamente bloccata per saturare i siti ancora attivi.

Partendo dal lato destro ed utilizzando un bisturi affilato tagliare la membrana in strisce di circa 3-4 mm servendosi di una piastra microtiter come righello.

Inserire le strisce nell'apposito vassoio e idratare immediatamente con 2 ml di tampone PBS

- Diluizione sieri. Diluire i sieri 1/20 in 2 ml di tampone di diluizione (PBS Tween 20, 1% estratto di lievito) utilizzando tubi da 10 ml (100µl di siero in 2 ml di tampone).
- Anticorpo primario: dispensare i sieri diluiti in ogni canale seguendo la numerazione riportata sul vassoio.
- Incubare per 1 ora in agitazione a temperatura ambiente
- Lavaggio: Svuotare il vassoio contenente le strisce e lavare le strisce
- Anticorpo secondario: dispensare il coniugato. Incubare per 20' in agitazione a temperatura ambiente, Lavaggio.
- Sviluppo: dispensare il substrato (4 cloronaftolo).

Incubare per alcuni minuti fino a quando non compaiono nei sieri positivi bande colorate in grigio-viola.

Stoppare la reazione svuotando il contenuto e lavando ripetutamente con acqua.

Questa tecnica, in Parassitologia, viene impiegata come test di conferma, se dai test in immunofluorescenza, emoagglutinazione ecc., comunemente impiegati per la diagnosi, si ottengono risultati dubbi o debolmente positivi che necessitano di un test di conferma per l'esatta interpretazione del risultato.

LE COLORAZIONI PERMANENTI

Le colorazioni che, più comunemente, vengono impiegate nel Laboratorio di Parassitologia per la ricerca dei protozoi, nel campione biologico prelevato dal sito di elezione, sono:

COLORAZIONE TRICROMICA: Utile per la sicura identificazione di protozoi (quali le amebe).

ZIEHL-NEESEN MOD.: Colorazione indispensabile per l'individuazione di *Cryptosporidium*. Utile anche per la ricerca di *Isospora* e *Cyclospora*

COLORAZIONE DI WEBER MOD.: Necessaria per la ricerca di *Microsporidium*

COLORAZIONE CON EMATOSSILINA FERRICA: Utile per la sicura identificazione di protozoi quali le amebe.

COLORAZIONE MAY-GRUNWALD GIEMSA: Utile per la sicura identificazione di molti protozoi come quelli ematici e del sistema reticolo-endoteliale.

COLORAZIONE TRICROMICA

Utile per la sicura identificazione di protozoi (quali le amebe).

COMPOSIZIONE DEI COLORANTI

1. Soluzione A (Iodio-Etanolio) - vaschetta n° 2.
Questa soluzione deve essere usata solo con il materiale fissato in PVA Fixative.
 - a. Preparare una soluzione concentrata, aggiungendo ad alcool etilico al 70% cristalli di iodio fino ad ottenere una soluzione satura di colore scuro.
 - b. Diluire una parte di soluzione concentrata con etanolo al 70%, fino ad ottenere la soluzione di lavoro di color "tè".
2. Soluzione B (alcool etilico-acido) - vaschetta n° 6.
Aggiungere 0.5 ml di acido acetico glaciale a 99,5 ml di alcool etilico al 90%.
3. Trichrome Stain (pronto per l'uso) - vaschetta n° 5.
4. Alcool etilico al 70% - vaschette n° 1, n° 3, n° 4.
5. Alcool etilico al 95% - vaschette n° 7, n° 8, n° 9.

COLORAZIONE

Porre i vetrini asciutti in una rastrelliera, oppure inserirli individualmente in vaschette per colorazioni, riempite di colorante o di alcool. Tenere tutte le vaschette ben chiuse, onde prevenire l'evaporazione.

1. Porre i vetrini in alcool etilico al 70% per almeno 5' (vaschetta n° 1).
2. Porre i vetrini in soluzione A (alcool etilico-iodio) per 10' (vaschetta n° 2).
3. Porre i vetrini in alcool etilico al 70% per almeno 3'-5' (vaschetta n° 3).
4. Trasferire i vetrini e porli nuovamente in alcool etilico al 70% fresco (vaschetta n° 4) per 3'-5'.
5. Trasferire i vetrini nel Trichrome Stain per 10' (vaschetta n° 5).
6. Trasferire i vetrini nella soluzione B (alcool etilico-acido) per 3" o fino a quando il colorante inizia a diffondere (vaschetta n° 6).
7. Lavare in alcool etilico al 95% (vaschetta n° 7).
8. Porre i vetrini in alcool etilico al 95% fresco per 5' (vaschetta n° 8).
9. Trasferire nuovamente i vetrini in alcool etilico al 95% fresco per ulteriori 5' (vaschetta n° 9).
10. Trasferire i vetrini in xilolo per 5' (vaschetta n° 10).
11. Trasferire vetrini in xilolo fresco per ulteriori 5'(vaschetta n° 11).
12. Togliere i vetrini e montarli con coprioggetto utilizzando un mezzo di montaggio appropriato.

INTERPRETAZIONE

La colorazione tipica del Trichrome Stain, con vetrini perfettamente fissati e colorati in modo opportuno, è la seguente:

Il citoplasma di cisti e trofozoiti appare blu-verde, con una pallida sfumatura.

La cromatina nucleare, i micro e macronuclei, gli eritrociti ingeriti ed i batteri appaiono di color rosso o rosso-porpora.

Il materiale ingerito, come muffe o lieviti, si colora di solito in verde; non sono rare, però, variazioni di tonalità.

Le uova e le larve si colorano in rosso.

Il materiale di fondo si colora in verde chiaro.

COLORAZIONE DI ZIEHL-NEELSEN MOD.

La parete delle oocisti dei coccidi, come quella di alcuni batteri, come i micobatteri, ha la particolare capacità di assumere stabilmente il colorante fucsina che non viene più allontanato in seguito al trattamento con acido ed alcool.

Per questa ragione i microrganismi che presentano tale caratteristica, vengono chiamati acido-alcool resistenti.

La colorazione per l'acido-resistenza modificata da Kinyoun viene chiamata "metodo a freddo" in quanto impiega un detergente tensioattivo, il dimetilsolfossido DMSO, che aggiunto alla fucsina facilita la penetrazione di questa all'interno della parete del parassita, senza dover ricorrere necessariamente al riscaldamento del colorante.

COMPOSIZIONE DEI COLORANTI:

1) Soluzione Fucsina	Fucsina basica	0.3%
	Fenolo	5%
	Alcool etilico 95°	10%
2) Soluzione Alcool-Acido	Alcool etilico 95°	97%
	Acido cloridrico	3%
3) Soluzione colorazione di contrasto	Verde malachite	0.3%

PREPARAZIONE DEL COLORANTE:

1) Soluzione Fucsina:

sciogliere 3 grammi di fucsina basica in 10ml di Alcool etilico al 95%.

Aggiungere 90ml di una soluzione acquosa di fenolo al 5%;

2) Soluzione Alcool-Acido:

aggiungere 3ml di Acido cloridrico concentrato, lentamente (a goccia a goccia) a 97 ml di Alcool etilico al 95%, in quest'ordine.

Fare attenzione perché la soluzione può diventare molto calda!

3) Soluzione di verde malachite:

sciogliere 3ml di verde malachite in 100ml di acqua distillata, oppure 3ml di blu di metilene in 100ml di acqua distillata.

COLORAZIONE

- Si preparano strisci del campione su vetrino portaoggetto.
- Il preparato viene lasciato asciugare per 24 h.
- Fissazione in metanolo per 10'.
- Deposare sul preparato la fucsina per 15'-20'.
- Lavare con acqua di fonte, quindi asciugare su carta assorbente.
- Aggiungere il decolorante (soluzione di acido acetico in alcool etilico) per 15"-30".
- Lavare con acqua di fonte e lasciar asciugare.
- Deposare il colorante di contrasto (sol. di verde malachite) per 2'-5'.
- Lavare con acqua di fonte e lasciar asciugare.

INTERPRETAZIONE

Osservare al microscopio con obiettivo 10x e 40x, le oocisti si colorano in rosso più o meno intenso su sfondo verde, (blu se si utilizza il Bleu di metilene come colorante di contrasto).

COLORAZIONE TRICROMICA DI WEBER MODIFICATA (CHROMOTROPE 2R) PER MICROSPORIDI

COMPOSIZIONE DEI COLORANTI

1) Colorante tricromico modificato (reperibile pronto in commercio)

Chromotrope 2R	6.0 g
Fast green FCF	0.15 g
Acido fosfortungstico $H_3[PO_4(W_{12}O_{36})] \cdot 5H_2O$	0.7 g
Acido acetico (CH_3COOH)	3 ml
Acqua distillata	100 ml

Aggiungere l'acido acetico alle polveri, agitare in modo da imbibirle e lasciar riposare per 30 minuti. Aggiungere quindi l'acqua e sciogliere agitando. La soluzione si conserva almeno per un anno al buio.

2) Soluzione decolorante alcool-acida

Alcool etilico al 90%	995.5 ml
Acido acetico (CH_3COOH)	4.5 ml

Porre l'alcool in un contenitore pulito ed aggiungere lentamente l'acido acetico.
ATTENZIONE: l'acido acetico è altamente corrosivo.

- 3) Alcool etilico al 95%
- 4) Alcool etilico assoluto
- 5) Xilene

Preparazione dei vetrini:

- 1) Agitare molto bene il campione di copros fissato in formalina al 10% (rapporto copros-formalina 1:3).
- 2) Identificare un vetrino con Nome e Cognome del paziente e preparare uno striscio con 10 µl di sospensione coprologica.

COLORAZIONE

1) Colorare con la soluzione tricromica modificata per 90'.
2) Decolorare con la soluzione alcool-acida per 10".
3) Lavare brevemente con alcool etilico al 95%.
4) Immergere i vetrini in alcool etilico al 95% per 5'.
5) Immergere i vetrini in alcool assoluto per 10'.
6) Immergere i vetrini nello xilene per 10'.
7) Scolare l'eccesso di xilene, adagiare il vetrino su carta bibula, porre 2-3 gocce di liquido di montaggio e coprire con un coprioggetto.

INTERPRETAZIONE

Leggere il preparato con un obiettivo a 100x.

Le spore dei microsporidi appaiono come corpi rotondeggianti di 0.8-2 µ di diametro, di color rosa, contenenti un nucleo più scuro; talvolta nel citoplasma si osserva un'area incolore.

COLORAZIONE EMATOSSILINA FERRICA

Nel 1975, Spencer e Monroe hanno descritto una modificazione della colorazione con Ematossilina Ferrica. Questa colorazione può essere usata sia con campioni freschi, sia con campioni conservati in PVA Fixative o SAF Fixative. Due metodi di base sono stati proposti per la colorazione permanente dei parassiti intestinali nei campioni di copros: la colorazione tricromica di Wheatley e quella con Ematossilina Ferrica. Entrambi hanno ottenuto una generale approvazione. Nonostante che la colorazione tricromica di Wheatley sia molto utilizzata, la colorazione con Ematossilina Ferrica rimane alla base della parassitologia diagnostica intestinale. Pur essendo accettata come metodo standard, la colorazione con Ematossilina Ferrica ha posto parecchi problemi: per esempio il lungo tempo richiesto per portare a termine la colorazione, le difficoltà incontrate per ottenere dettagli nucleari e citoplasmatici ben differenziati e la notevole esperienza necessaria per ottenere risultati uniformi. Le soluzioni messe in atto per superare tali problemi sono consistite nella differenziazione con Allume Ferrico, nella revisione dei tempi delle fasi critiche della colorazione, nell'uso di soluzioni riscaldate, nell'omissione dell'uso di mordenzanti e nell'impiego di ematossilina resa acida mediante l'aggiunta di acido fosfotungstico. Tali soluzioni hanno rimediato, in parte alle carenze della metodica originale; ma nel contempo, hanno sacrificato o la qualità, o la facilità di esecuzione. Il metodo proposto da Spencer e Monroe è leggermente più lungo rispetto alla tricromica di Wheatley, ma offre un'eccellente differenziazione delle strutture, inclusioni nucleari e citoplasmatiche; fornisce, inoltre un buon contrasto fra gli elementi dei parassiti ed il materiale di fondo, garantendo risultati ripetitivi.

COMPOSIZIONE DEI COLORANTI

Ematossilina Ferrica Soluzione di Lavoro:

1. Mescolare insieme la Soluzione A (Soluzione madre di ematossilina in alcool etilico) e la Soluzione B (soluzione di sali di ferro) in parti uguali (rapporto 1:1).
2. Questa soluzione di lavoro si conserva per 7 giorni. (Nota: Prima dell'uso, saggiare la soluzione di lavoro per verificare se è ancora utilizzabile: aggiungere poche gocce di soluzione ad acqua di rubinetto alcalina. Se si evidenzia un rapido viraggio al blu, è utilizzabile; se persiste il colore marrone, è necessario preparare soluzione fresca.)

Ammoniaca/Etanolo al 50% ed Ammoniaca/Etanolo al 70%

1. Aggiungere a 50 ml di Etanolo al 50%, 3-5 gocce di ammoniaca.
2. Aggiungere a 50 ml di Etanolo al 70%, 3-5 gocce di ammoniaca.

Preparazione dei vetrini

Lievi variazioni devono essere adottate nella preparazione degli strisci, nei tempi e nelle sequenze di colorazione in funzione del fissativo usato (se usato).

A. Materiale fresco non conservato

1. Non appena il campione perviene al laboratorio, stenderne uno strato di spessore variabile (sottile e spesso) sopra ad un vetrino portaoggetti pulito. Se necessario diluire le feci in soluzione fisiologica.
2. Porre i vetrini in fissativo di Schaudinn, prima che gli strisci si seccino.
3. I vetrini devono rimanere a riposo nel fissativo di Schaudinn per almeno un'ora per un adeguato fissaggio. È possibile prolungare il fissaggio anche per una notte.
4. Procedere alla colorazione iniziando dal punto 1 della "colorazione".

B. Materiale conservato in SAF Fixative (Sodio-Acetano-Formalina)

1. I campioni di copros raccolti in SAF Fixative devono essere lasciati fissare per almeno 30'.
2. Mescolare bene il campione di copros raccolto nel liquido conservante.
3. Concentrare il materiale per filtrazione e centrifugazione.
4. a) Su un vetrino portaoggetti pulito depositare 2-3 gocce di Mayer's Albumin.
b) Aggiungere una piccola quantità di sedimento alla Mayer's Albumin. Utilizzando un bastoncino di legno, mescolare e stendere la miscela albumina/campione sul vetrino in modo che vi rimanga adeso uno strato di spessore variabile (sottile e spesso). Lasciare asciugare i vetrini a temperatura ambiente, lontano da fonti di calore.
5. Procedere alla colorazione, iniziando dal punto 3 della "colorazione".

C. Materiale conservato in PVA Fixative (Alcool-Polivinilico)

1. I campioni di copros raccolti in PVA Fixative devono essere lasciati fissare per almeno 30 minuti.
2. Agitare vigorosamente il campione raccolto nel liquido conservante.
3. Stendere, senza strisciare, 2 o 3 gocce del campione su 1/3 - 1/2 della superficie di un vetrino portaoggetti pulito.
4. Far asciugare il vetrino per una notte a temperatura ambiente. In via alternativa lo si può porre per alcune ore a 37°. Il vetrino dovrà essere perfettamente asciutto, onde prevenire il distacco del materiale, durante la colorazione.
5. Procedere alla colorazione iniziando dal punto 1 della "colorazione".

COLORAZIONE

1. Porre i vetrini in alcool etilico al 70% per 5'. (I vetrini possono essere lasciati in etanolo per parecchie ore, se necessario anche per una notte).
2. Trasferire i vetrini in alcool etilico al 70% contenente lo Iodio di D'Antoni (soluzione color porto) per 2-5', al fine di rimuovere il cloruro di mercurio presente.
3. Porre i vetrini in alcool etilico al 70% per 10'.
4. Trasferire i vetrini in una vaschetta contenente acqua di rubinetto alcalina per 10'.
5. Porre i vetrini nella vaschetta contenente Ematossilina Ferrica - Soluzione di lavoro per 10'.
6. Sciacquare i vetrini in acqua distillata per 1'.
7. Porre i vetrini in Acido Picrico (Soluzione C) per circa 10'.
8. Sciacquare con acqua corrente per 20'.
9. Trasferire i vetrini nella vaschetta contenente etanolo al 50% addizionato con ammoniaca per 10'.
10. Porre, quindi, i vetrini nella vaschetta contenente etanolo al 70% addizionato con ammoniaca per 10'.
11. Porre i vetrini in etanolo all'85% per 10'.
12. Trasferire i vetrini in etanolo al 95% per 10'.
13. Trasferire, ulteriormente, i vetrini in etanolo al 100% oppure in carboxilolo (1 parte di Fenolo, sciolto a bagno maria + 3 parti di xilolo) per 10'.
14. Porre i vetrini in xilolo per 10'.
15. Trasferire i vetrini e porli in xilolo fresco per ulteriori 10'.
16. Togliere i vetrini ed, ancora umidi, montarli con coprioggetto, utilizzando un mezzo di montaggio appropriato.

INTERPRETAZIONE

La colorazione tipica ottenuta Con Iron Hematoxylin Stain Set, con vetrini perfettamente fissati e colorati in modo opportuno, è la seguente:
il citoplasma dei protozoi si colora in blu-grigio. Le inclusioni citoplasmatiche assumono un'intensa colorazione blu-nerastra.

COLORAZIONE DI MAY-GRUNWALD GIEMSA

- 1) Versare sul vetrino ben asciugato circa 2 ml di May-Grunwald (soluzione pronta per l'uso) per **3'.**(tempo critico)
- 2) Aggiungere, senza allontanare il colorante, un'eguale quantità di acqua distillata per 5'-10'.
- 3) Lavare con acqua distillata.
- 4) Aggiungere il Giemsa diluito 1/20 con acqua distillata (il colorante deve essere diluito al momento dell'uso, o al massimo, essere stato diluito da 6 ore) per 20'-30'.

Nota: controllare che il pH dell'acqua distillata sia neutro; in caso contrario (spesso l'acqua distillata tende ad essere debolmente acida) utilizzare acqua tamponata o, se non disponibile, acqua di rubinetto. Il pH influenza la colorazione: utilizzando diluenti acidi la colorazione tenderà al rosa, mentre utilizzando coloranti alcalini la colorazione tenderà verso l'azzurro.

COLORAZIONE DI GIEMSA

La colorazione di Giemsa può essere effettuata utilizzando varie concentrazioni di colorante. Le più usate sono le concentrazioni al 10% e al 3%. Ovviamente, a seconda della concentrazione, variano i tempi di colorazione. Di routine, è preferibile utilizzare la concentrazione al 3% in quanto, più sono lunghi i tempi di colorazione, migliore è la qualità dei risultati. Al contrario, in caso di urgenza, è consigliabile utilizzare la concentrazione al 10% che necessita di tempi più brevi.

COMPOSIZIONE DEI COLORANTI:

Soluzione al 10%

Colorante di Giemsa	10 ml
Acqua tamponata pH 7.2	90 ml

Soluzione al 3%

Colorante di Giemsa	3 ml
Acqua tamponata pH 7.2	97 ml

COLORAZIONE

Lasciare asciugare il vetrino per almeno 18 ore a temperatura ambiente (3-4 ore a 37°C) prima di procedere alla colorazione.

- | |
|---|
| 1) Immergere i vetrini in una vaschetta per colorazioni contenente la soluzione di Giemsa al 10% o al 3%. |
| 2) Colorare per 15-20 minuti se si usa la soluzione al 10%, per 50-60 minuti se si usa la soluzione al 3% |
| 3) Lavare i vetrini immergendoli in una vaschetta contenente acqua di fonte per 2'-3'. |
| 4) Porre i vetrini ad asciugare tenendoli in posizione verticale. |

INTERPRETAZIONE

I vetrini vanno osservati al microscopio ottico con obiettivo 100x (ad immersione con olio di legno di cedro o simile).

Lo sfondo del preparato deve apparire privo di detriti grossolani e gli eritrociti di colore rosa grigiastro.

I parassiti, qualora presenti, si colorano nella parte nucleare in rosso porpora e il citoplasma in azzurro pallido.

La colorazione viene impiegata per la ricerca dei plasmodi malarici, *Babesia*, *Theileria*, Tripanosomi, cluster di *Pneumocystis*, *Leishmania* e *Toxoplasma* le cui caratteristiche saranno descritte nei capitoli dedicati.

Dal punto di vista della sicurezza va ricordato che il copros può contenere:

- a) le forme infettanti di alcuni parassiti (ad es. larve di *Strongyloides stercoralis*, cisti di Amebe e cisti di *Giardia duodenalis*, oocisti di *Cryptosporidium*);
- b) batteri patogeni come *Salmonelle* o *Shigelle*;
- c) virus patogeni come virus dell'epatite e *Rotavirus*.

Il sangue va sempre manipolato con grande cautela, utilizzando sempre i guanti e camice chiuso perché può essere di soggetti sieropositivi all'*HIV* o comunque contenere qualsiasi microrganismo potenzialmente patogeno.

L'espettorato o Bal va sempre lavorato sotto cappa a flusso laminare perché gli aerosol che si sviluppano dalla manipolazione possono essere altamente infetti, soprattutto per la possibile presenza del bacillo di *Koch*.

Nell'impiego di molti composti chimici utilizzati sia per le colorazioni che per le concentrazioni, xilene, etere, formalina ecc. si possono sviluppare aereosol altamente tossici e nocivi per la salute dell'operatore pertanto si raccomanda l'uso di una cappa di aspirazione (cappa chimica) per le routinarie procedure di laboratorio.



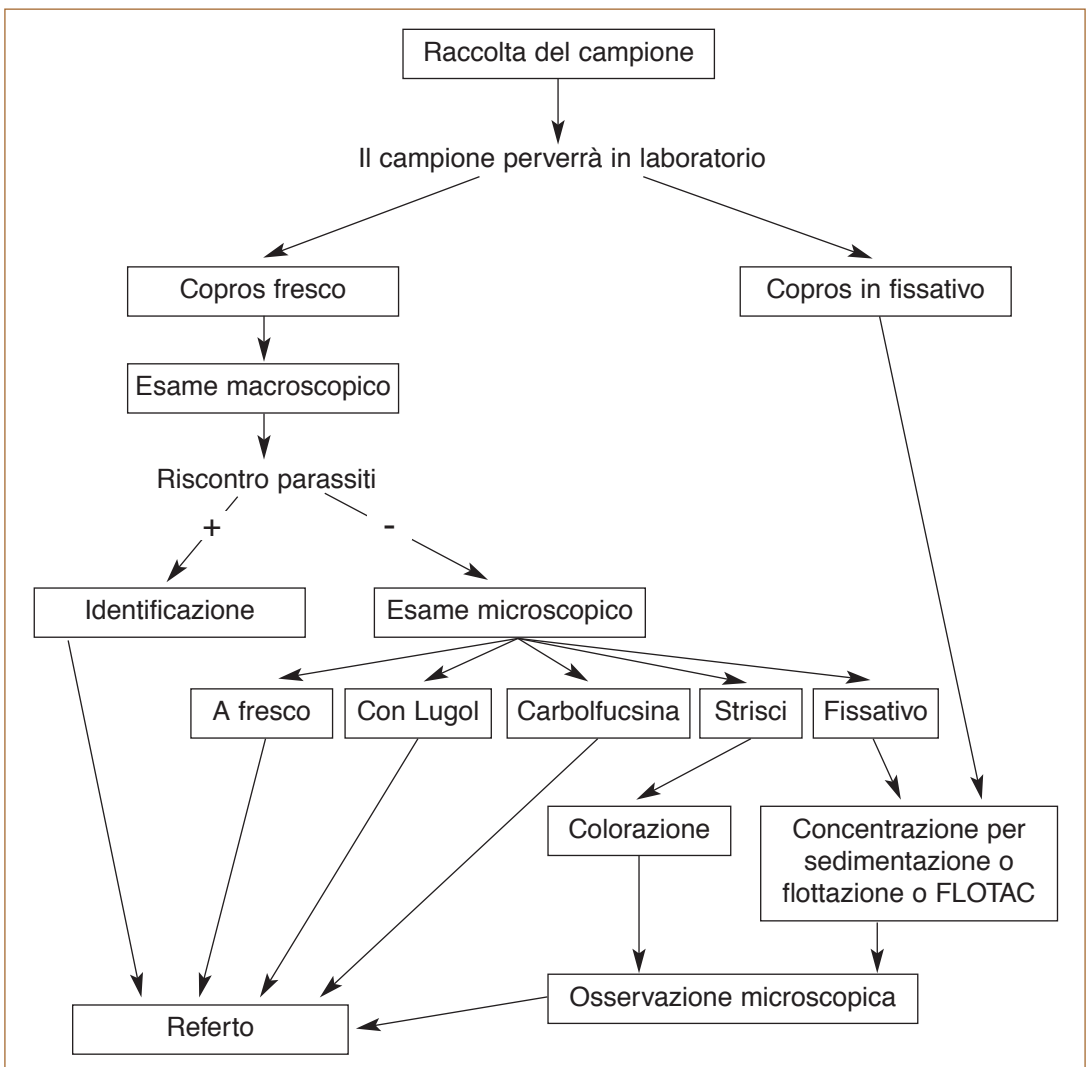
Dispositivi per la protezione individuale



Cappa a flusso laminare

Capitolo I

I campioni di copros possono contenere trofozoi ed oocisti e cisti di protozoi, larve e uova di elminti; raramente possono contenere vermi adulti o segmenti di essi. Mentre questi ultimi sono di solito visibili a occhio nudo, i trofozoi, le cisti, le larve e le uova sono visibili solo al microscopio. Per potere procedere alla corretta identificazione del genere e della specie del protozoo il campione biologico deve essere opportunamente preparato ed esaminato. In letteratura sono descritte numerose procedure analitiche con diverse tecniche che consentono di pervenire alla diagnosi di laboratorio; di seguito è rappresentato un percorso analitico che descrive le varie tecniche utilizzabili e che, applicato integralmente, può essere considerato efficace ai fini della diagnosi di laboratorio. Seguirà l'analisi delle singole fasi del percorso, dalla raccolta del campione all'identificazione del protozoo ed alla refertazione del risultato.



Percorso analitico per l'esame parassitologico del copros

RACCOLTA DEL CAMPIONE

La raccolta del campione, prima tappa del percorso analitico, troppo spesso sottovalutata, è parte integrale delle tecniche parassitologiche: la quantità di campione prelevato, la modalità di raccolta e di conservazione, influenzano notevolmente l'accuratezza dell'esame del copros, in quanto la diagnosi microscopica può essere effettuata solo se il campione è stato raccolto in maniera adeguata.

Buona norma sarebbe fornire al paziente chiare istruzioni, possibilmente scritte, sul particolare regime dietetico consigliato nel giorno precedente la raccolta, cioè evitare legumi essiccati verdi, frutta e verdura a cuticola resistente (pesche, albicocche, pomodori), pere, fragole, fichi e carote ed evitare farmaci lassativi.

Istruire il paziente come raccogliere il campione in un contenitore adatto e come trasportarlo in laboratorio.

Nei programmi epidemiologici è sufficiente analizzare un solo campione, ma nella pratica diagnostica è consigliabile esaminare almeno tre campioni di copros raccolti in giorni diversi (alcuni elementi parassitari non vengono emessi quotidianamente, per cui un singolo esame potrebbe rivelarsi falsamente negativo). Il copros deve essere emesso su una superficie asciutta e pulita; non deve essere contaminato con urine né tanto meno essere recuperato dal water, va raccolto, quindi, su una padella da letto, un sacchetto di plastica posto in un cestino, un foglio di carta resistente o di cartone, posizionato sotto il copriwater.

Va, quindi, trasferito in un contenitore di plastica pulito;

il contenitore deve essere chiuso ermeticamente, etichettato con i dati anagrafici del paziente, la data e l'ora di raccolta ed inviato al laboratorio nel più breve tempo possibile. In ambiente ospedaliero il campione deve essere accompagnato da una richiesta che riporti, oltre i dati suddetti, anche informazioni cliniche ed anamnestiche, soprattutto quelle riguardanti eventuali viaggi in paesi tropicali, effettuati dal paziente in esame.

Sarebbe necessario che il medico che richiede l'esame parassitologico indichi anche il parassita da ricercare (per confermare il sospetto diagnostico); ciò avviene, purtroppo, raramente, con il conseguente rischio che il laboratorista trascuri di effettuare indagini mirate per procedere con generici esami routinari (più dispendiosi sia economicamente che come impegno lavorativo e meno efficaci per la diagnosi).



Contenitori per la raccolta del campione

Il campione deve essere esaminato appena giunto in laboratorio: se ciò, per motivi contingenti, non fosse possibile, occorre conservarlo in flaconi contenenti sostanze conservanti:

Formalina al 5%

Formalina al 10%

SAF (sodio acetato formalina)

MIF (mertiolato iodio formalina)

PVA (polivinil alcool)

Per la conservazione si stemperano circa 2 grammi di copros fresche in uno di questi conservanti o fissativi; utilizzando questi flaconi bisognerà aggiungere al liquido la quantità di copros sufficiente a portare il livello del liquido fino ad una linea di demarcazione posta sull'esterno del contenitore. Il campione inviato in fissativo può essere osservato dopo i processi di concentrazione (trofozoiti e larve perdono la mobilità, per cui è superflua l'osservazione microscopica diretta).



Contenitori per la raccolta, conservazione in fissativo (a), omogenizzazione e filtrazione del campione di copros (b)



Fill-FLOTAC: Contenitore per la raccolta, misurazione, conservazione in fissativo o sottovuoto, omogenizzazione e filtrazione del campione di copros

Esame macroscopico

Appena il copros giunge in laboratorio occorre esaminarlo e registrarne la consistenza. Evidenziare anche l'eventuale presenza di muco e sangue.

La consistenza può essere un utile guida nella ricerca dei protozoi; nel copros acquoso e diarroico, più raramente in quello soffice, è possibile ritrovare trofozoiti; mentre nel copros formato e soffice si possono osservare le forme cistiche. Se si ricevono, pertanto, contemporaneamente parecchi campioni, devono essere esaminati per prima quelli contenenti muco e sangue, quindi quelli acquosi e diarroici, lasciando per ultimi i campioni soffici e formati.

Nel caso il campione giunge in laboratorio già in un contenitore con conservante queste informazioni devono essere riportate sul contenitore stesso e/o sul foglio di richiesta che accompagna il campione.

Esame microscopico

Un esame microscopico completo prevede:

- 1) l'esame microscopico diretto a fresco e
- 2) dopo concentrazione.

Può essere utile, talvolta, procedere alla colorazione di preparati di strisci di copros con diverse tecniche che variano secondo il tipo di parassita che si sospetta sia presente nel campione.

1) Esame microscopico diretto

L'esame diretto è tecnicamente molto semplice da eseguire; le principali difficoltà riguardano l'interpretazione dei risultati (tutti i laboratori dovrebbero essere in grado di eseguirlo se l'osservatore ha una competenza sufficiente).

È buona norma utilizzare 3 diversi tipi di preparati:

- a) preparato con soluzione fisiologica;
- b) con soluzione di Dobell (soluzione di Lugol diluita 1:5);
- c) con carbolfulxina.

Per accelerare i tempi, è consigliabile preparare contemporaneamente anche almeno uno striscio di copros da sottoporre ad eventuali colorazioni specifiche.

È opportuno procedere anche alla fissazione di una aliquota di copros in un adatto fissativo, per poter avere disponibile il campione da esaminare per concentrazione. La concentrazione successiva sarà effettuata secondo la metodica adottata dal laboratorio.

- a) Il preparato con soluzione fisiologica viene utilizzato per l'esame preliminare del copros, principalmente per ricercare uova e larve di elminti, trofozoiti e cisti protozoari. Con questo tipo di preparato si possono evidenziare anche le emazie e i leucociti.

Esecuzione:

2-3 grammi di copros vengono stemperate in 1-2 ml di soluzione fisiologica; una goccia del campione diluito viene deposta su un vetrino portaoggetti e si ricopre con vetrino coprioggetto, evitando la formazione di bolle d'aria.



Densità ottimale del preparato per la lettura al microscopio

La densità del preparato con soluzione fisiologica deve essere tale da permettere la lettura di caratteri stampati attraverso il preparato stesso.

L'osservazione microscopica si esegue prima con obiettivo 10x e poi con obiettivo 40x, si esegue in tempi brevi per poter osservare l'eventuale presenza di strutture mobili (ciglia o flagelli) e i movimenti propri di taluni parassiti (amebe o larve).

- b) Il preparato con soluzione di Dobell è utilizzato per colorare i vacuoli di glicogeno ed i nuclei delle cisti eventualmente presenti. Con questo tipo di preparato è generalmente possibile effettuare la diagnosi di specie delle cisti, perché il Lugol rende più visibili i nuclei dei protozoi.

Esecuzione:

utilizzare il campione di copros stemperato in soluzione fisiologica; una goccia della sospensione viene posta su vetrino portaoggetti. Si aggiunge ad essa una goccia della soluzione di Dobell; si mescolano il campione con il colorante e si ricopre con vetrino coprioggetto.

L'osservazione microscopica si esegue prima con obiettivo 10x e poi con obiettivo 40x.

SOLUZIONE DI DOBELL (soluzione di Lugol 1:5)

Iodio in cristalli	1 g
Potassio ioduro	2 g
Acqua distillata	100 ml

Sciogliere lo iodio ed il potassio ioduro in circa 20 ml di acqua agitando in continuazione e portare quindi a volume.

La soluzione si conserva, in un contenitore scuro, a temperatura ambiente per parecchi mesi.

N.B. Gli autori anglosassoni preferiscono usare una soluzione doppiamente concentrata utilizzando quindi 2g di iodio e 4g di potassio ioduro in 100 ml di acqua.

In alternativa è possibile utilizzare la soluzione di Lugol per la colorazione di Gram diluendola 1:5 in acqua distillata.

c) Soluzione tamponata di blu di metilene

La soluzione di blu di metilene viene utilizzata quando, all'osservazione microscopica del preparato con soluzione fisiologica, vengono visti trofozoiti amebici, o quando, comunque, si sospetta la loro presenza nel campione analizzato.

La soluzione viene preparata con:

Soluzione A:

Acido acetico (CH ₃ COOH)	1.2 ml
Acqua distillata	98.8 ml

Porre l'acqua in un contenitore pulito ed aggiungere lentamente l'acido acetico. Miscelare i due reagenti e portare a pH 3.6, utilizzando soluzioni basiche a pH noto.

Soluzione B:

Sodio acetato (CH ₃ COONa)	1.6 g
Acqua distillata	100 ml

Sciogliere il sodio acetato in acqua distillata agitando accuratamente e conservare in contenitore pulito.

La soluzione di lavoro viene preparata con:

Soluzione A	46.3 ml
Soluzione B	3.7 ml
Blu di metilene per colorazione	0.5 g
Acqua distillata	50 ml

Aggiungere all'acqua le soluzioni A e B e miscelare bene. Unire il blu di metilene e agitare fino a completo scioglimento

Si procede come i preparati con soluzione fisiologica e con soluzione di Dobell ponendo però sul vetrino **una grande goccia** di soluzione tamponata di blu di metilene.

Attendere 5 - 10 minuti prima di esaminare il vetrino per permettere al colorante di penetrare nei trofozoiti.

Il blu di metilene sovracolora i trofozoiti in circa 30 minuti, quindi il preparato va esaminato entro questo lasso di tempo.

Questo tipo di preparato va effettuato solamente con copros fresco e non può essere utilizzato con campioni conservati in cui i trofozoiti sono stati fissati.

- d) Il preparato con carbolfulxina viene utilizzato per la ricerca dei coccidi; è una colorazione estemporanea che in pochi minuti consente di escludere la presenza di coccidi nel campione se non si osservano forme sospette. La positività della colorazione non implica, però la presenza certa dei coccidi che va confermata con colorazioni più specifiche (alcune spore di miceti possono somigliare alle oocisti di *Cryptosporidium*).

Esecuzione:

deporre su un vetrino una goccia della sospensione di copros; si aggiunge una goccia di carbolfulxina; si mescola e si striscia in modo da ottenere bande sottili alternate a bande spesse. Si lascia asciugare per poco tempo e quindi si copre con coprioggetto.

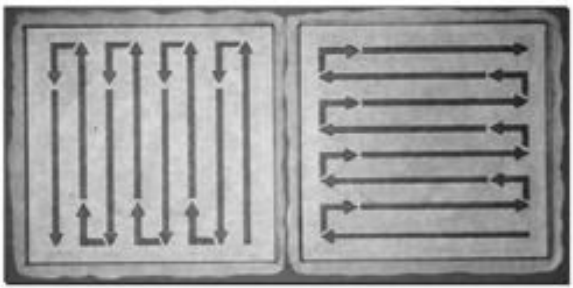
Si osserva al microscopio con obiettivo 20x e 40x;

in caso di sospetta presenza di *Cryptosporidium* si osserverà la presenza di formazioni tondeggianti di 5 - 6µ incolori in campo rosso e si procederà alle colorazioni specifiche: la colorazione di Kynioun e l'immunofluorescenza.

Per effettuare l'immunofluorescenza deporre su un vetrino con pozzetto 20 µl di sospensione di copros, lasciar asciugare il campione per alcune ore, fissare con acetone e procedere con la tecnica di immunofluorescenza diretta specifica per *Cryptosporidium*, quindi osservare il preparato al microscopio a fluorescenza.

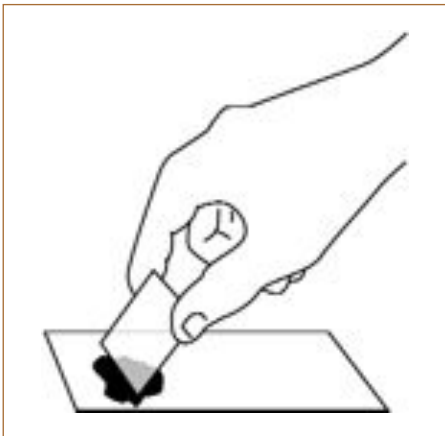
La lettura dei preparati è la parte più delicata dell'esame a fresco. È buona norma esaminare interamente il preparato utilizzando un obiettivo a 10x, regolando l'intensità luminosa e la distanza del condensatore in modo da poter osservare distintamente i detriti di copros presenti nel campo. Iniziare l'osservazione a partire da un angolo del preparato e continuare sistematicamente da un lato all'altro o dall'alto in basso fochettando continuamente.

In presenza di organismi o di materiale sospetto, passare ad un obiettivo a maggior ingrandimento, regolando l'intensità luminosa e la distanza del condensatore, per osservare i dettagli morfologici; misurare con la scala graduata, di cui deve essere dotato il microscopio, le dimensioni degli elementi sospetti e confrontarle con quelle riportate su tavole iconografiche di riferimento.



Modalità di lettura del vetrino al microscopio

- e) Preparare, inoltre, almeno uno striscio di materiale di copros, deponendo su un vetrino una goccia della sospensione di copros che si striscia in modo da ottenere bande sottili alternate a bande spesse; è consigliabile eseguire la colorazione di Kynioun (per la ricerca dei coccidi) in ogni caso, e utilizzare eventuali altri strisci per altri tipi di colorazione.



Striscio

2) Esame dopo concentrazione

Il copros, pervenuto in laboratorio, viene conservato in opportuno fissativo:

a) nel caso si utilizzano kits del commercio già muniti di fissativo, la quantità di copros da aggiungere al fissativo deve essere tale da far salire il livello del liquido fino ad una demarcazione segnata sul contenitore: in genere si pongono nel fissativo 1 - 2 grammi di campione;

b) altrimenti il fissativo da aggiungere al copros deve essere almeno in rapporto di 1:4. La scelta del fissativo, deve essere fatta in base alle caratteristiche del parassita da ricercare e alle metodiche utilizzate per evidenziarlo.

La formalina 5% può essere considerato il fissativo che meglio si adatta alla esecuzione delle tecniche di concentrazione mediante sedimentazione, flottazione e/o tecniche FLOTAC.

Il SAF (Sodio acetato + formalina) può essere considerato il fissativo che meglio si adatta alle colorazioni specifiche per i coccidi.

Il PVA è il fissativo più adatto per la ricerca delle Amebe.

In commercio sono disponibili comunque anche fissativi “ecologici”, privi di formalina e altre sostanze tossiche, che vanno però affiancati da opportuni coloranti preparati espressamente per questi.

Le tecniche di concentrazione consentono di evidenziare i parassiti, eventualmente presenti nel campione in basso numero, che non sono stati riscontrati con l'esame a fresco.

La concentrazione può essere ottenuta per **flottazione** (utilizzo di liquidi più densi degli elementi parassitari da ricercare) o per **sedimentazione** (utilizzo di liquidi meno densi degli elementi parassitari da ricercare) o utilizzando un sistema innovativo denominato **FLOTAC** che consente la flottazione per centrifugazione e traslazione della porzione apicale della sospensione di copros, utilizzando diverse soluzioni flottanti, specifiche per i diversi parassiti da ricercare.

La **Sedimentazione** è la concentrazione con formalina etere o con formalina etil-acetato. La tecnica che utilizza formalina ed etere o etil-acetato è quella che raccomanda l'O.M.S., perché permette di evidenziare uova e larve di elminti e cisti di protozoi.

In commercio sono disponibili kits già pronti che contengono tutto il materiale monouso ed i reagenti necessari, nonché la metodica da seguire per concentrare i campioni di copros.

Di seguito si riportano le metodiche consigliate, più utilizzate, per la concentrazione del copros:

- **Concentrazione per Sedimentazione**
- **Concentrazione mediante Flottazione**
- **Concentrazione mediante FLOTAC**

CONCENTRAZIONE PER SEDIMENTAZIONE (RIDLEY)

- 1) Con una palettina di legno stemperare 2 o 3 g di copros in flaconi di SAF Fixative fino ad ottenere una sospensione omogenea, attendere 30' perché il fissativo agisca ed agitare energicamente il flacone.
- 2) Aggiungere 4 gocce di soluzione mucolitica nel flacone (con campioni molto mucosi si possono aggiungere fino ad 8 gocce di soluzione mucolitica)
- 3) Tappare e agitare bene per qualche secondo.
- 4) Inserire un imbutino a maglie da 250 μm in una provetta.
- 5) Filtrare almeno 3 ml di sospensione di copros trattata come descritto precedentemente (punto 1) senza esercitare azioni meccaniche per favorire la filtrazione. Nel caso di copros acquoso filtrare un volume maggiore (fino a 10-12 ml).
- 6) Eliminare l'imbuto e aggiungere alla provetta soluzione fisiologica (in via alternativa si può utilizzare acqua di rubinetto oppure soluzione di formalina al 10%) fino a riempirla.
- 7) Centrifugare per 2' a 500 g (1800-2000 r.p.m. nelle comuni centrifughe da banco)
- 8) Decantare il surnatante e conservare il sedimento (circa 1 ml).
(Una parte del sedimento può essere usato per la ricerca del *Cryptosporidium* attraverso l'allestimento di strisci su vetrini per colorazioni permanenti)
- 9) Risospendere il sedimento in 9 ml di formalina al 10%.
- 10) Aggiungere 3 ml di acetato di etile, tappare la provetta, agitare per circa 30" invertendo più volte la provetta, quindi togliere il tappo (durante l'agitazione si forma una pressione positiva all'interno della provetta, prestare quindi la massima attenzione al momento di togliere il tappo, in quanto si può formare un aerosol di materiale di copros. Operare tenendo la provetta lontana dal corpo).
- 11) Centrifugare per 2' a 500 g (1800-2000 r.p.m. nelle comuni centrifughe da banco).

Dopo la centrifugazione sono visibili 4 distinti strati dall'alto verso il basso (vedi fig.1)

- a) strato di acetato di etile o solvente
- b) strato di detriti di copros
- c) strato acquoso poco colorato (formalina)
- d) sedimento (0.25 - 0.5 ml)

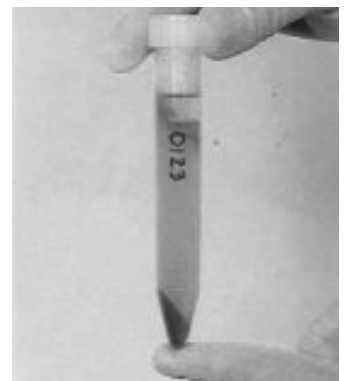


Fig. 1 - Strati ottenuti dalla centrifugazione

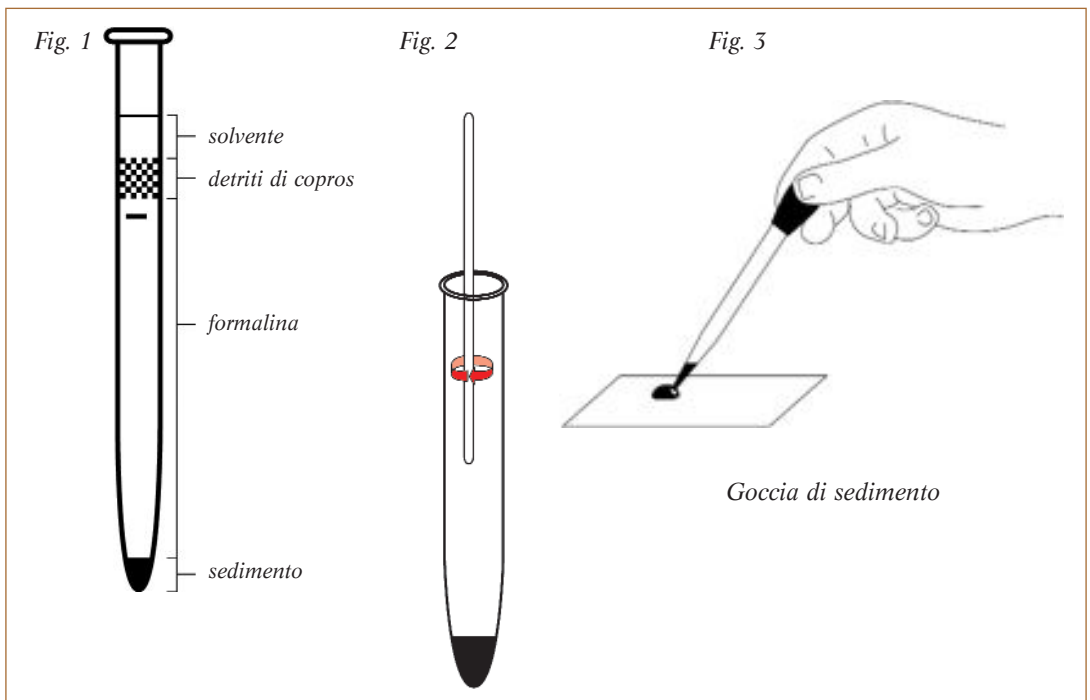
- 12) Allontanare con un bastoncino di legno lo strato dei detriti di copros e decantare gli strati superficiali trattene-ndo il sedimento. Prima di riportare la provetta in posizione verticale, asciugarne bene le pareti con dei tamponcini di cotone in modo da allontanare i residui di acetato di etile e dello strato acquoso (vedi fig.2)



Fig. 2 - Pulizia dei residui dalla provetta

- 13) Allestire un preparato microscopico depositando parte della metà superiore del sedimento, dove sono concentrati gli elementi parassitari, su un vetrino portaoggetti e aggiungere una goccia di Lugol diluito 1:5 (vedi fig.3)

Osservare al microscopio il vetrino munito di coprioggetto a 100x e 400x .



Schema illustrativo dei passaggi più significativi della sedimentazione

CONCENTRAZIONE MEDIANTE FLOTTAZIONE (Faust)

Le soluzioni flottanti a base di solfato di zinco, raccomandate per la ricerca di cisti di protozoi e di alcune uova di elminti nel copros sono:

- A.) ZINCO SOLFATO (P.s. 1.20) per campioni conservati in formalina
- B.) ZINCO SOLFATO (P.s. 1.18) per campioni non conservati

La flottazione con Solfato di Zinco, descritta da Faust et al., può essere effettuata A) sia su campioni fissati e conservati in Formalina B) sia su campioni non conservati, avendo l'avvertenza di usare, nell'uno o nell'altro caso, soluzioni di Solfato di Zinco a differente densità:

- A.) campioni raccolti in Formalina soluzioni di solfato di zinco a peso specifico 1.20;
- B.) campioni non conservati soluzioni di solfato di zinco a peso specifico 1.18.

La flottazione con Solfato di Zinco consente la separazione delle cisti protozoarie e di alcune uova di elminti, sfruttando la diversa densità delle soluzioni. Gli elementi dei parassiti, con densità inferiore a 1.18-1.20, affiorano nella parte superiore della sospensione e vengono recuperati per mezzo di un vetrino coprioggetto o di un'ansa. I detriti di copros, viceversa, rimangono sul fondo della provetta.

A. Trattamento dei campioni conservati in Formalina Neutra.

(La miscela campione/conservante deve rimanere a riposo per almeno 30 minuti, per un adeguato fissaggio).

1. Mescolare bene la miscela campione conservante, quindi, in una provetta a fondo tondo di 16x100 mm, filtrarla, attraverso uno strato di garza grezza, posta in un imbuto di carta. Riempire la provetta con il filtrato, fino a circa 1 cm dal bordo superiore.
2. Centrifugare per 3' a 2000-2200 r.p.m.. Il sedimento dovrebbe risultare di circa 1.0-1.5 cm.
3. Decantare il surnatante ed asciugare i residui acquosi con un tamponcino o con carta bibula.
4. Aggiungere al sedimento la soluzione di Zinco Solfato al 33% - P.s. 1.20 fino ad 1 cm dal bordo della provetta.
5. Introdurre nella provetta due bastoncini di legno e mescolare perfettamente il sedimento impaccato sul fondo.
6. Centrifugare immediatamente la sospensione a 1500-1800 r.p.m. per 1-5 minuti.
7. Togliere lentamente la provetta dalla centrifuga, senza agitare e riporla in un portaprovette. Non muovere il menisco superiore del liquido nella provetta, che contiene, ora, gli eventuali parassiti. Lasciare riposare la provetta per 1 minuto per permettere alla soluzione di stabilizzarsi.
8. Su un vetrino portaoggetti pulito depositare, in posizioni distinte, una goccia di Lugol diluito 1:5 ed una goccia di soluzione fisiologica. Utilizzando un'ansa metallica perfettamente ricurva, prelevare un'ansata dal menisco superiore e

trasferirla sul vetrino, vicino alla goccia di Lugol. Ripetere l'operazione, depositando, in questo caso, il contenuto dell'ansa vicino alla goccia di soluzione fisiologica. (Eseguendo i prelievi toccare con molta cautela il menisco superiore della sospensione senza penetrare all'interno della stessa).

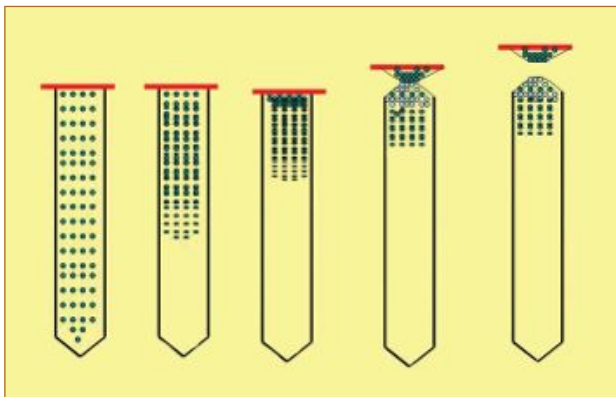
9. Servendosi della parte posteriore dell'ansa, mescolare il campione prima con la goccia di soluzione fisiologica, quindi con quella di Lugol. Coprire entrambi i preparati, depositando due vetrini coprioggetto.
10. Esaminare al microscopio, entro 20 minuti, con obiettivo 10 e 40x.

Flambare l'ansa metallica. prima di procedere ai prelievi da eventuali altri campioni.

B. Trattamento dei campioni non conservati

Per i campioni freschi non conservati in fissativo, si procede con:

1. Trasferire 2 g. circa, di campione in una provetta a fondo tondo (16x100 mm), contenente circa 8ml di acqua di rubinetto. Mescolare accuratamente. Aggiungere ulteriore acqua fino ad 1-2 cm dal bordo della provetta.
2. Centrifugare a 2000-2200 r.p.m. per 1 minuto. Il sedimento dovrebbe risultare di circa 1.0-1.5 cm.
3. Decantare il surnatante ed asciugare i residui acquosi con un tamponcino o con carta bibula.
4. Aggiungere, al sedimento, la soluzione di Zinco Solfato al 33% P.s. 1.18 fino ad 1 cm dal bordo della provetta.
5. Proseguire come descritto precedentemente dal punto 5 (trattamento dei campioni conservati in Formalina Neutra).

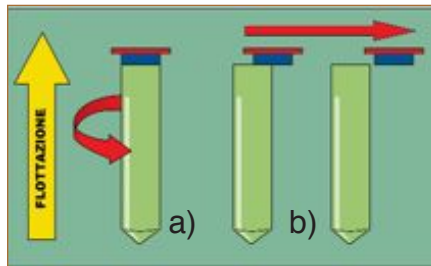


Flottazione in provetta

TECNICHE FLOTAC (Cringoli - *Parassitologia*, 2006)

Le tecniche FLOTAC sono nuove metodiche copromicroscopiche quali-quantitative multivalenti, altamente sensibili e accurate che utilizzano il FLOTAC.

Queste tecniche, basate sulla flottazione in centrifuga e successiva traslazione della porzione apicale della sospensione, consentono di evidenziare e contare direttamente gli elementi parassitari (EP = uova, larve, oocisti e cisti) presenti in 0,5 - 1 g. di copros ed espressi come uova per grammo copros (UPG), larve per grammo copros (LPG), oocisti per grammo copros (OPG) e cisti per grammo copros (CPG).



a) Flottazione per centrifugazione; b) Traslazione della porzione apicale

Il FLOTAC è stato progettato per: (1) eseguire la flottazione in centrifuga, (2) traslare la parte apicale della sospensione dopo flottazione, (3) esaminare il tutto al microscopio.

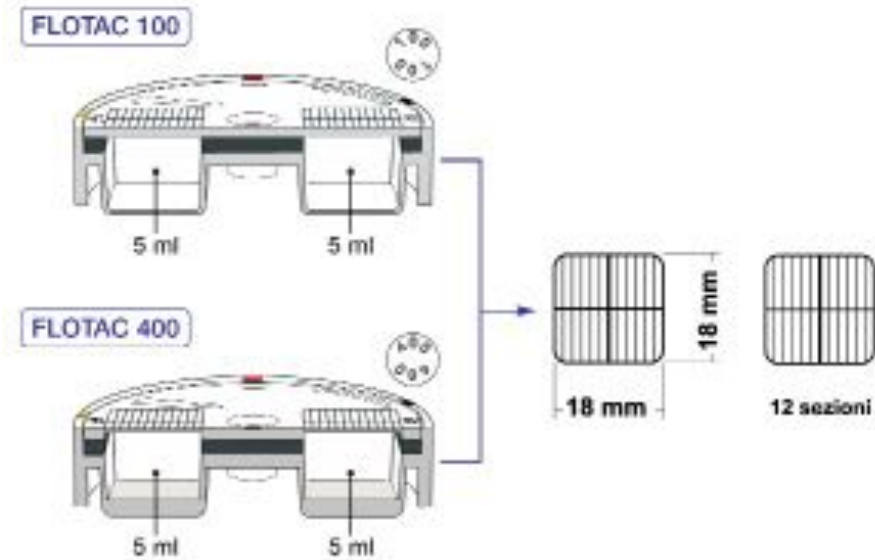
Il FLOTAC è di forma circolare e si compone di tre elementi: Base, Disco traslazione e Disco lettura che, nell'insieme, delimitano due camere flottazione di 5 ml cadauna, con due reticoli di 18 x 18 mm, ogni reticolo contiene 12 linee equidistanti.



Componenti FLOTAC

Vi sono due versioni del FLOTAC: FLOTAC-100, che permette un ingrandimento massimo di 100X e FLOTAC-400, che permette un ingrandimento massimo di 400X.

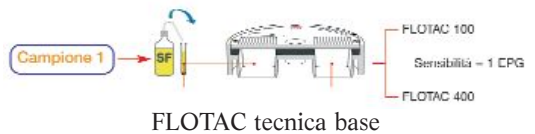
Il FLOTAC-400 è un ulteriore sviluppo e perfezionamento del FLOTAC-100 ed è necessario per la diagnosi dei protozoi intestinali.



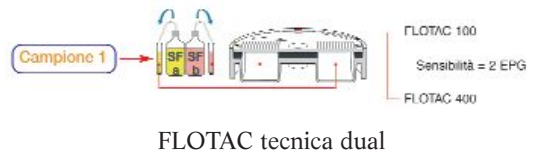
Schema FLOTAC-100 e FLOTAC-400

Il FLOTAC-100 ed il FLOTAC-400 sono entrambi utilizzati nelle tecniche base, dual, double e pellet.

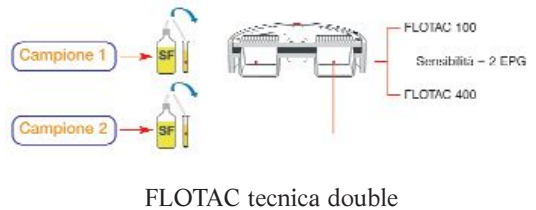
Tecnica base (*FLOTAC basic technique*) - prevede, durante l'esame del campione, l'utilizzo di una sola soluzione flottante (SF), la più efficiente per l'EP di interesse. Questa tecnica è particolarmente indicata per la messa in evidenza e per la enumerazione di livelli bassi o molto bassi di EP di una sola specie parassita (infezioni monospecifiche naturali o sperimentali) o di EP di parassiti differenti, ma che hanno lo stesso comportamento (in termini di flottazione) nei riguardi della SF scelta. Con la tecnica base, l'unità di riferimento sono le due camere (volume totale 10 ml).



Tecnica dual (*FLOTAC dual technique*) - prevede l'impiego di 2 SF complementari (in termini di peso specifico e/o capacità flottante), utilizzate in parallelo sullo stesso campione. Queste tecniche sono particolarmente indicate per screening diagnostici e per studi epidemiologici con campioni contenenti EP appartenenti a specie e/o generi parassitari diversi per i quali sono necessarie SF differenti, che facciano affiorare con la massima efficienza gli EP di interesse. Con la tecnica dual, l'unità di riferimento è la singola camera di flottazione (volume 5 ml).



Tecnica double (*FLOTAC double technique*) - prevede l'esame in parallelo di due campioni diversi provenienti da due ospiti differenti con uno stesso FLOTAC, destinando una camera di flottazione ad un campione e l'altra camera di flottazione all'altro campione, utilizzando una stessa SF. Con la tecnica double, l'unità di riferimento è la singola camera di flottazione (volume 5 ml).



Tecnica pellet - le tecniche FLOTAC di cui sopra partono da un campione di copros a peso noto.

Le tecniche pellet sono state sviluppate per campioni di copros fissati il cui peso all'interno del fissativo non è noto e/o per i campioni di copros umani, per i quali, si è osservato, che pur campionando un peso noto di copros nell'adatto fissativo, dopo omogeneizzazione e filtrazione del campione, il volume finale risultava assai variabile, ciò dipende dalla diversità di alimenti utilizzati dall'uomo e dalla soggettiva capacità di digerirli e degradarli.

In questo caso, un peso di riferimento standard, è il "pellet" ottenuto dopo filtrazione e centrifugazione del campione di partenza (vedi steep 7a della tecnica pellet routine) e processare una quantità di pellet tale da assicurarsi una sufficiente sensibilità per gli EP da ricercare e una chiara osservazione microscopica del flottato, priva di grossolani detriti di copros che potrebbero interferire con l'identificazione degli EP eventualmente presenti nella camera di lettura.

Soluzioni Flottanti - Per le tecniche copro microscopiche basate sulla flottazione le SF hanno un ruolo primario. Di solito, nei manuali di diagnostica parassitologica e nella letteratura scientifica, si fa riferimento solo al peso specifico (PS) (o densità) delle varie Soluzioni Flottanti (SF) facendo intendere che l'efficienza in termini di affioramento degli EP aumenta con l'aumentare del PS delle diverse SF.

In realtà gli EP non sono "elementi inerti" nel senso che flottano solo in funzione del peso specifico.

A tutt'oggi non sono note le interazioni che si stabiliscono fra i vari elementi all'interno di una sospensione in flottazione (costituenti della SF + EP + eventuale fissativo + sostanze derivanti dall'alimentazione dell'ospite), ma:

1. è la norma che SF di uguale PS, utilizzate con la stessa tecnica, non garantisce gli stessi risultati nei riguardi dello stesso EP;
2. è frequente che una SF molto efficiente per un dato EP, con una data tecnica, non garantisce gli stessi risultati se si cambia tecnica;
3. è frequente che una SF molto efficiente per un dato EP in un campione esaminato a fresco, con una data tecnica, non garantisce gli stessi risultati se cambia la modalità di conservazione del campione (es. congelamento, fissazione in formalina 5%, formalina 10% o in altro fissativo);
4. può anche verificarsi che una SF molto efficiente per un dato EP, con una data tecnica, non garantisce gli stessi risultati se l'ospite cambia regime alimentare.

Da tutto ciò emerge che per le tecniche copromicroscopiche basate sulla flottazione, ciascun EP deve essere considerato "a sé" nei riguardi della SF, della tecnica e della modalità di conservazione del campione, nel senso che quanto acquisito per un dato EP non è automaticamente trasferibile a EP "affini" e non dovrebbe essere trasferito nemmeno allo stesso EP anche se solo si cambia tecnica o modalità di conservazione del campione.

Il sistema FLOTAC esalta le capacità flottanti delle varie SF (chiarezza del campo di lettura, sensibilità, affioramento del massimo numero di EP, elevata precisione ed accuratezza), tuttavia per alcune ne amplifica anche gli aspetti negativi (torbidità del campo microscopico, affioramento di piccoli e/o grandi detriti, ecc. che condizionano la leggibilità del campo microscopico) per cui non tutte le SF in uso nei vari laboratori sono utilizzabili con le tecniche FLOTAC.

Tra varie SF le 3 di seguito descritte, testate con i diversi parassiti, nel laboratorio "FLOTAC" presso l'Unità Operativa di Parassitologia dell'Azienda Ospedaliera "D. Cotugno" di Napoli, garantiscono i migliori risultati in termini di precisione (vicinanza dei valori rilevati per misure ripetute), accuratezza (vicinanza del valore osservato a quello reale) e sensibilità analitica (la più piccola quantità di EP che possono essere accuratamente evidenziati) per l'identificazione dei protozoi nel campione umano.

Prima di utilizzare le SF abbiamo effettuato una calibrazione del FLOTAC, che consiste in uno screening preliminare delle soluzioni flottanti da utilizzare, su un campione di pellet noto, eseguendo almeno 5 repliche sullo stesso campione, per scegliere le SF più adatte alle finalità del laboratorio.

Durante la calibrazione ci siamo resi conto che le tre SF adottate dovevano essere utilizzate su di un pellet di 0.3-0.4 grammi per assicurare la sensibilità e la chiarezza microscopica appropriata per la diagnosi di tutti i possibili EP presenti nei nostri campioni analizzati.

Si consiglia, pertanto, ai colleghi che devono utilizzare queste tecniche, di effettuare le calibrazioni sui campioni che abitualmente giungono in Laboratorio ed adottare il peso del pellet e le SF più adeguate per una corretta diagnosi parassitologica.

Preparazione delle soluzioni flottanti

SF3 - Zinco Solfato ($ZnSO_4$, peso specifico- 1,20)

1. Unire 500 ml di acqua e 300 g di zinco solfato
2. Sciogliere lo zinco solfato in acqua mescolando manualmente o utilizzando un agitatore magnetico
3. Aggiungere acqua per raggiungere il volume finale di 1000 ml
Controllare il peso specifico con un densimetro

SF4 - Sodio Nitrato ($NaNO_3$, peso specifico- 1,20)

1. Unire 500 ml di acqua e 315 g di sodio nitrato
2. Sciogliere il sodio nitrato in acqua mescolando manualmente o utilizzando un agitatore magnetico
3. Aggiungere acqua per raggiungere il volume finale di 1000 ml.
Controllare il peso specifico con un densimetro

SF7 - Zinco solfato ($ZnSO_4$, peso specifico- 1,35)

1. Unire 685 ml di acqua e 685 g di zinco solfato
2. Sciogliere lo zinco solfato in acqua mescolando manualmente o utilizzando un agitatore magnetico
3. Controllare il peso specifico con un densimetro.

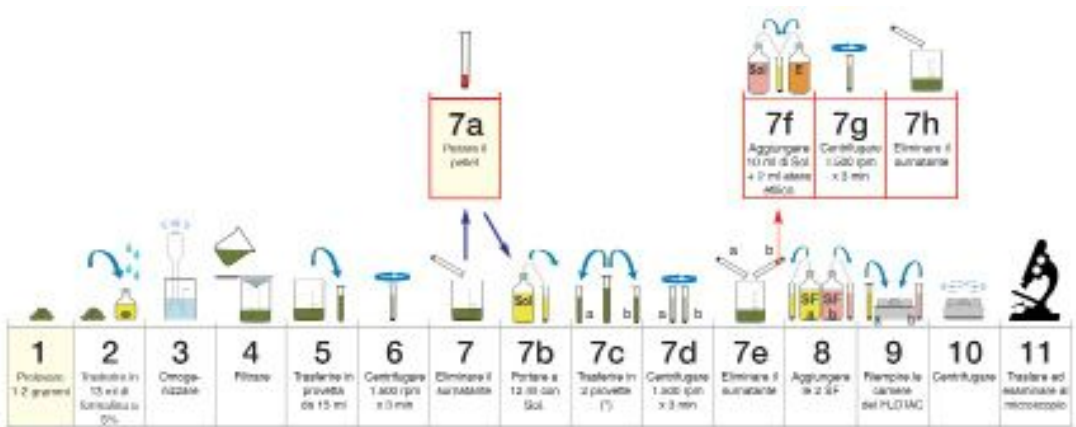
In questo volume viene di seguito descritta la tecnica FLOTAC pellet routine - Cotugno per la ricerca e la enumerazione dei protozoi intestinali utilizzando, nell'attività quotidiana, due soluzioni flottanti: SF4 e SF7, sensibilità analitica = 4EPG.

Per il calcolo degli EP si usa la seguente formula: $EPG = N \times 1.2/0.3$ (N indica il numero degli EP contati nella camera di flottazione).

Dalla nostra esperienza ottenuta dall'osservazione dei campioni di copros fin qui analizzati si evince che: nella camera 1 del dispositivo FLOTAC, contenente la sospensione in SF4, si contano gli EP di Nematodi, Cestodi, e alcuni Protozoi come *Blastocystis* e alcuni coccidi come *Isospora belli*.

Nella camera 2 del dispositivo FLOTAC, contenente la sospensione in SF7, si contano gli EP di Trematodi (*Schistosoma*, *Fasciola*, *Dicrocoelium* e *Paragonimus*) e di Protozoi come *Giardia*, Amebe e alcuni Coccidi, questi ultimi saranno identificati con certezza effettuando, sullo striscio di materiale su vetrino, la colorazione di Ziehl-Neelsen mod.

Tecnica FLOTAC pellet routine - Cotugno



(*) Volume da trasferire in ciascuna provetta: $V = 12 \times 0,3 / \text{peso pellet}$

- 1 - Campionare 1-2g. di copros dal prelievo ben omogeneizzato.
- 2 - Trasferire in 13 ml di formalina 5% ed aggiungere 4 gocce di un mucolitico (dithiotreitolo).
- 3 - Omogeneizzare accuratamente la sospensione.
- 4 - Filtrare con un filtro a maglie da 250 μm .
- 5 - Trasferire in una provetta da 15 ml.
- 6 - Centrifugare la provetta per 3' a 1.500 rpm (170 g)
- 7 - Dopo centrifugazione, versare il surnatante lasciando solo il sedimento (pellet) nella provetta

7a - Pesare il pellet.

7b - Aggiungere al pellet 12 ml di soluzione fisiologica ed omogeneare.

7c - Trasferire in due provette un volume contenete 0.3 g di copros ($V = 12 \times 0,3 / \text{pp}$).

7d - Centrifugare le due provette per 3' a 1.500 rpm (170 g).

7e - Dopo centrifugazione, versare il surnatante lasciando solo il sedimento (pellet) nelle provette.

Un pellet (pelleB) è processato come di seguito:

7f - Aggiungere al pellet 10 ml di soluzione fisiologica + 2 ml di etere etilico ed agitare vigorosamente

7g - Centrifugare la provetta per 3' a 1.500 rpm (170 g)

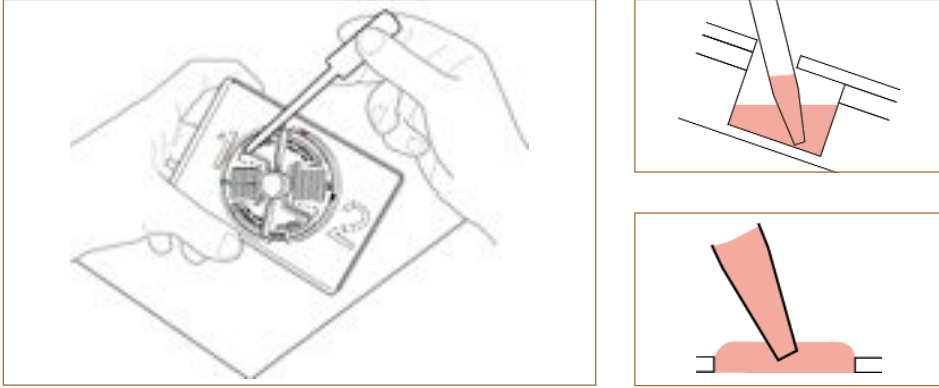
7h - Versare il surnatante e mantenendo la provetta in posizione orizzontale, pulire con un tampone ovattato le pareti per allontanare i residui di etere.

8 - aggiungere ai due pellet le due soluzioni flottanti:

pelle A 6 ml di SF4(sodio nitrato),

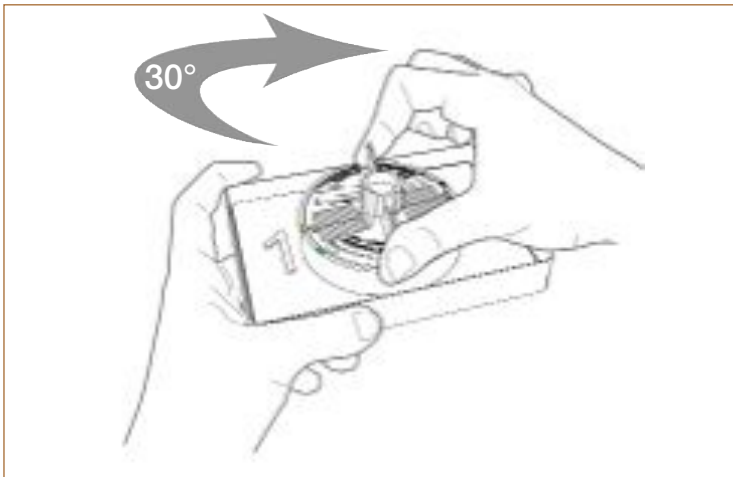
pellet B (trattato con etere-etilico) 6 ml di SF7 (zinco solfato).

- 9 - Dopo accurata omogeneizzazione riempire le due camere di flottazione:
la camera 1 con la sospensione in SF4 e
la camera 2 con la sospensione in SF7(vedi figura)



Riempimento della camera di flottazione attraverso il piccolo menisco

- 10 - Chiudere il FLOTAC e centrifugare per 5' a 1.000 rpm (120 g).



Chiusura del FLOTAC con una rotazione di 30°

11 - Dopo centrifugazione, traslare la parte apicale delle sospensioni ed esaminare il FLOTAC al microscopio con obiettivo 40x.



FLOTAC

Per una precisa identificazione delle specie di Amebe, eventualmente identificate con la SF7, si suggerisce una ulteriore analisi utilizzando la Soluzione flottante SF3 (zinco solfato ps 1.200).

- 6 ml di SF3 vengono applicati su 0.3-0.4 gr di pellet del campione sospetto, senza trattamento con Etere dietilico, riempita una camera di flottazione del FLOTAC, si osserva al microscopio ottico con obiettivo 40x.

Le Amebe evidenziate, con questa flottazione, mostreranno più chiaramente i nuclei presenti nelle cisti e dallo studio delle caratteristiche nucleari si può identificare l'Ameba evidenziata.

Per una descrizione dettagliata delle altre tecniche FLOTAC e la calibrazione delle altre soluzioni flottanti, fare riferimento ai manuali FLOTAC e/o consultare il sito www.flotac.unina.it.

RICERCA ED IDENTIFICAZIONE DEI POTOZOI

Una volta che si è allestito il preparato si procede con l'osservazione al microscopio. Questa fase è la più difficile e delicata per il Parassitologo che per poter, con sicurezza e affidabilità, riconoscere gli elementi parassitari più frequenti, deve necessariamente conoscere il ciclo biologico e quindi la morfologia, la grandezza e le affinità tintoriali dei parassiti. Di seguito, pertanto, vengono descritte le caratteristiche dei protozoi riscontrabili nel copros.

FLAGELLATI INTESTINALI

Alla classe Zoomastigoforea appartengono flagellati delle vie digerenti ed urinarie, che sono raggruppate negli ordini: Diplomonadida, Retortamonadida e Trichomonadida.

In questi ordini è patogeno per l'uomo, riscontrabile nel campione di copros, *Giardia duodenalis*.

phylum	Sarcomastigophora								
Subphylum	Mastigophora								
Classe	Zoomastigophora								
Ordine	Kinetoplastida		Diplomonadida		Retortamonadida		Trichomonadida		
Sottordine	Trypanosomatina								
Famiglia	Trypanosomatidae		Hexamitidae	Tetranitidae			Trichomonadidae	Monocercomonadidae	
Genere	<i>Leishmania</i>	<i>Trypanosoma</i>	<i>Giardia</i>	<i>Enteromonas</i>	<i>Retortamona</i>	<i>Chilomastix</i>	<i>Trichomonas</i>	<i>Trichomonas</i>	<i>Dientamoeba</i>
	<i>major</i>	<i>cruzi</i>	<i>duodenalis</i>	<i>hominis</i>	<i>intestinalis</i>	<i>mesnilis</i>	<i>hominis</i>	<i>vaginalis</i>	<i>fragilis</i>
	<i>aethiopica</i>	<i>rangeli</i>					<i>lenax</i>		
	<i>infantum</i>	<i>brucei gambiense</i>							
Specie	<i>tropica</i>	<i>brucei rhodiense</i>							
	<i>mexicana</i>	<i>brucei brucei</i>							
	<i>donovani</i>								
	<i>archibaldi</i>								

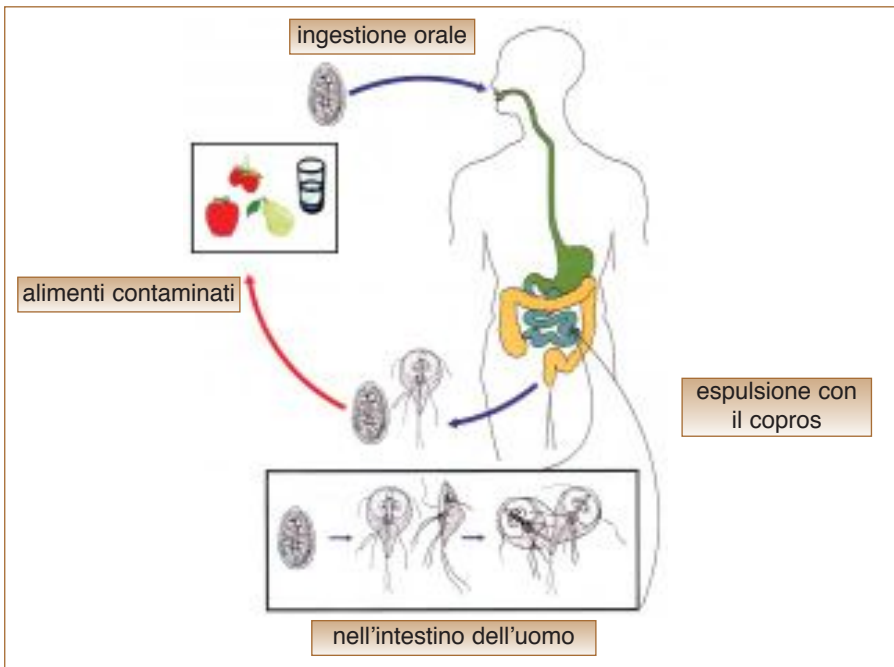
Posizione tassonomica dei flagellati intestinali

Saranno brevemente presi in considerazione anche altri flagellati non patogeni per mostrarne le differenze morfologiche rispetto ai patogeni e per identificarli e segnalarli al clinico, se evidenziati in numero considerevole.

Giardia duodenalis (*Giardia intestinalis*; *Giardia lamblia*)

Giardia è, tra i protozoi, il protozoo che più frequentemente viene riscontrato nel copros umano. La giardiasi è frequente nei bambini, provocando, spesso diarrea. L'infezione viene contratta per via orale (acqua e alimenti contaminati) o per trasmissioni interpersonali (mani sporche, atti omosessuali). Ha una distribuzione cosmopolita, ma la sua diffusione, comunque, è più elevata nelle regioni tropicali e subtropicali; è molto frequente nei turisti che visitano queste regioni, e, infatti, costituisce una delle maggiori cause di "diarrea del viaggiatore".

Giardia duodenalis: Ciclo Biologico



Il ciclo biologico è caratterizzato da due forme: trofozoiti e cisti.

Dopo essere stata ingerita, la cisti, dà origine a due trofozoiti, che si attaccano alla superficie del tenue ed iniziano a moltiplicarsi; dopo pochi giorni si sviluppano milioni di forme vegetative che possono determinare lesioni atrofiche dei villi ed infiltrati della sottomucosa. I segni clinici dell'infestazione sono variabili (steatorrea, dolori epigastrici, attacchi diarroici, inappetenza, atrofia della mucosa del digiuno, aumento del grasso e del muco nel copros con assenza di sangue, disturbi allergici, prurito). L'infezione può, spesso, essere asintomatica.

La diagnosi di laboratorio si fonda sulla messa in evidenza dei trofozoiti e/o delle cisti o di loro antigeni mediante:

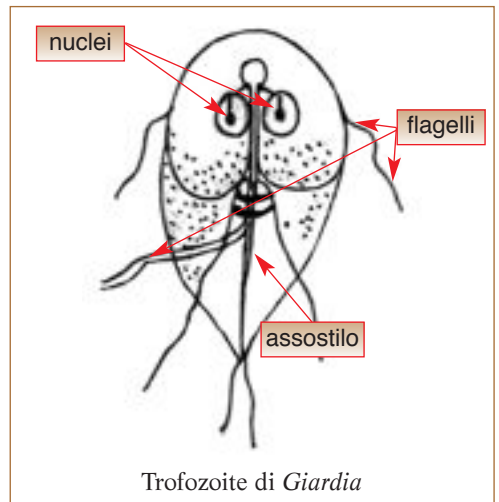
Metodi diretti

1. Esame a fresco: si stempera 1-2 g di copros in soluzione fisiologica e si osserva il preparato al microscopio ottico con obiettivo 40x.
2. Esame microscopico dopo concentrazione del campione di copros
3. Colorazione di Giemsa
4. Enterotest
5. Ricerca in immunofluorescenza diretta (IFD) su campioni di copros
6. Saggio immunoenzimatico
7. Test rapido (ICT)

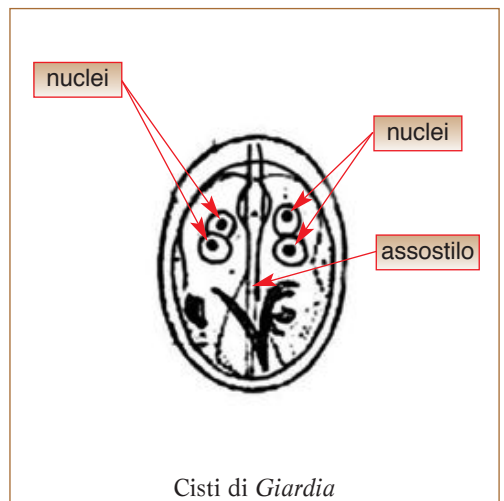
Il trofozoite è un protozoo piriforme, dotato di simmetria bilaterale, lungo 10-22 μ (in media 12-15 μ) e largo poco più della metà. Nella parte ventrale ha una depressione (disco adesivo) contenente due nuclei ovali simmetrici con cariosoma centrale e senza cromatina periferica. Tra i due nuclei prendono origine otto flagelli (4 laterali, 2 ventrali e 2 caudali).

Nel citoplasma si notano due corpi parabassali a virgola.

Un assostilo attraversa longitudinalmente il corpo cellulare.

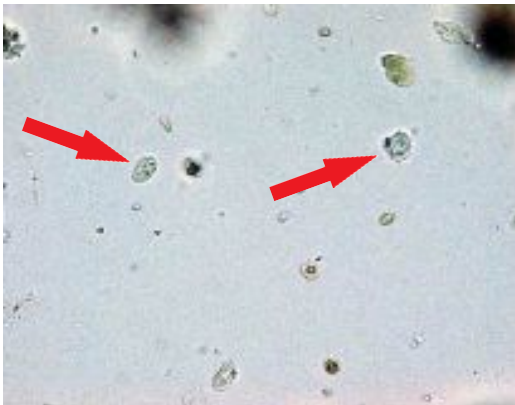


Le cisti (forme di resistenza) sono ovali e lunghe 8-19 μ (mediamente 11-14), hanno di solito 4 nuclei (prima della maturazione solo 2) disposti solitamente verso uno dei due poli; nel citoplasma sono presenti residui dei flagelli e dell'assostilo. Nel copros si notano normalmente solo cisti; nel muco di copros diarroico si ritrovano anche trofozoiti.

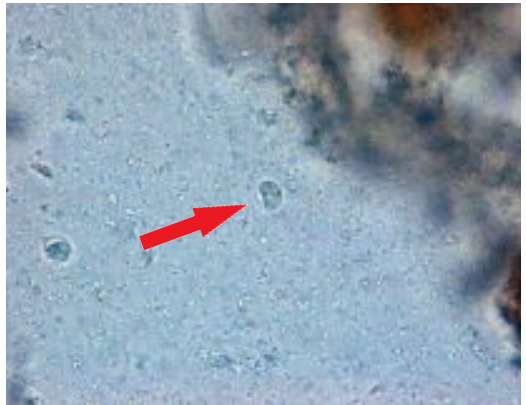


1. Esame a fresco:

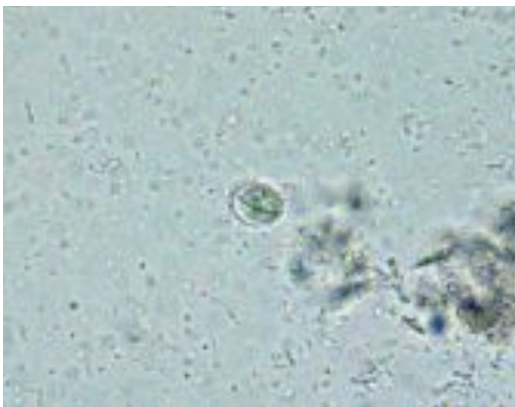
1-2 grammi di copros vengono stemperate in 1-2 ml di soluzione fisiologica; una goccia di questo preparato viene deposta su un vetrino portaoggetti e ricoperta con vetrino coprioggetto, evitando la formazione di bolle d'aria.



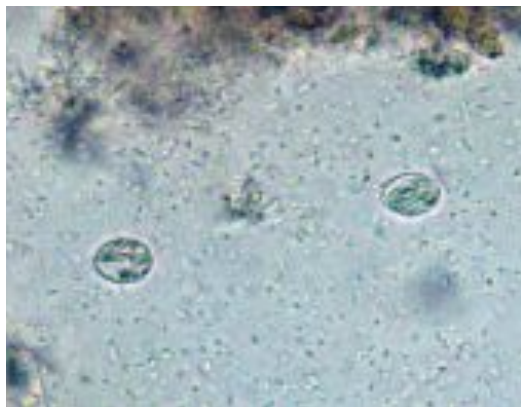
Cisti di *G. duodenalis* 100x



Cisti di *G. duodenalis* 100x



Cisti di *G. duodenalis* 400x



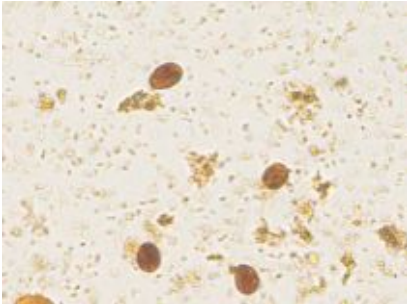
Cisti di *G. duodenalis* 400x

Colorazioni:

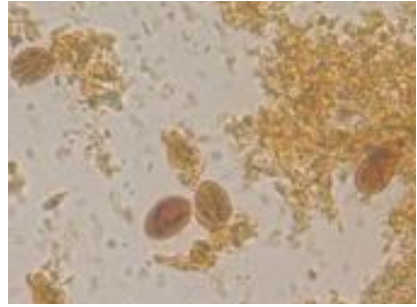
Colorazione di Dobell (soluzione di Lugol 1:5)

La colorazione è illustrata in dettaglio nella parte iniziale di questo capitolo.

Una goccia di sospensione di copros viene mescolata con una goccia di Lugol diluito 1:5 su un vetrino portaoggetti. Si copre con coprioggetto e si osserva al microscopio ottico a 40x.



Cisti di *G. duodenalis* 200x (Col. di Dobell)



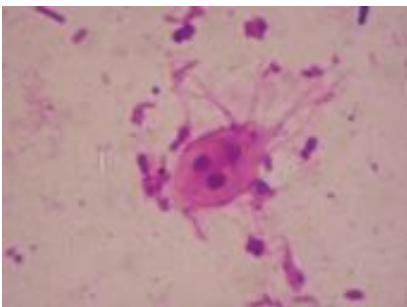
Cisti di *G. duodenalis* 400x (Col. di Dobell)

Le cisti, appariranno, al microscopio ottico, in giallo-marrone con le parti nucleari più intensamente colorate.

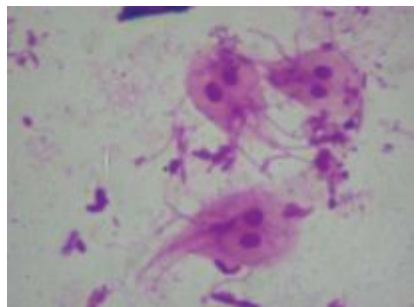
3. Colorazione di Giemsa

Nel caso si vogliano allestire preparati permanenti, la colorazione indicata è quella di Giemsa al 3%.

Si prepara uno striscio di materiale di copros, deponendo su un vetrino una goccia della sospensione di copros che si striscia in modo da ottenere bande sottili alternate a bande spesse; una volta che lo striscio è ben asciugato si procede con la colorazione illustrata in dettaglio nel capitolo generalità.



Trofozoite di *G. duodenalis* 1000x (col. Giemsa)



Trofozoiti di *G. duodenalis* 1000x (col. Giemsa)

I trofozoiti si colorano in viola più intensamente nelle parti nucleari e appaiono visibili i flagelli.

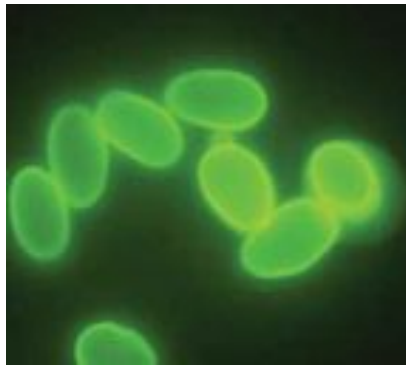
4. Enterotest

- Viene effettuato al paziente digiuno.
- È costituito da un filo lungo 140 cm (90 cm per uso pediatrico) terminante con un peso di gomma al silicone; il tutto è contenuto in una capsula di gelatina, da cui sporge un filo.
- Si fissa il capo del filo ad una guancia e si fa ingerire la capsula con un bicchiere d'acqua.
- Il capo zavorrato del filo raggiunge l'intestino tenue, dove viene tenuto per 4 ore.
- Si estrae il filo e si invia in laboratorio in un contenitore sterile.
- Con dita guantate, si preleva la patina di materiale che il filo ha raccolto dalla mucosa dell'intestino tenue; si pone il materiale prelevato su vetrini per l'esame a fresco e per le colorazioni permanenti.

5. Ricerca in Immunofluorescenza Diretta (IFD)

Depositare 25µl di una sospensione di copros (3 g di copros stemperato in 1-2ml di soluzione fisiologica) sul pozzetto di un vetrino per immunofluorescenza

- Lasciar asciugare all'aria il preparato per 24 h.
- Fissare in acetone.
- Deposare 20µl di anticorpo monoclonale anti cisti di *Giardia* marcati con FITC, diluiti in soluzione proteica tamponata, sul pozzetto.
- Incubare in camera umida a temperatura ambiente per 30'.
- Lavare con acqua distillata delicatamente e lasciar asciugare.
- Depositare una goccia di glicerina tamponata sul pozzetto, coprire con coprioggetto.
- Osservare con microscopio a fluorescenza l'intero preparato con obiettivo 20 e 40x.
- I protozoi eventualmente presenti appariranno di color verde mela sul fondo nero-marrone.



G. duodenalis in immunofluorescenza (IFD)

6. Saggio immunoenzimatico (ELISA)

Si possono ricercare nei campioni di copros, sia fresco che conservato congelato o in conservanti come il SAF, le cisti di *Giardia* utilizzando diversi Kits, in commercio, che impiegano la tecnica dell'immunoenzimatica.

Questi reattivi sono costituiti da anticorpi diretti verso gli antigeni specifici GSA-65 presenti sulle pareti cistiche di *Giardia*.

Il principio del test è illustrato nel capitolo generalità.

7. Test rapido (ICT)

Il test rapido è un saggio immunocromatografico su membrana per la ricerca qualitativa rapida dell'antigene specifico GSA - 65 di *Giardia*.

Depositare 25 µl di una sospensione di copros (3 g di copros stemperate in 1-2 ml di soluzione fisiologica) sul pozzetto della membrana di reazione.

Il campione diffonde lungo la membrana contenente l'anticorpo e, se nel campione da analizzare è presente *Giardia*, legherà l'antigene specifico GSA - 65 facendo comparire una banda di reazione visualizzabile ad occhio nudo dopo 10'

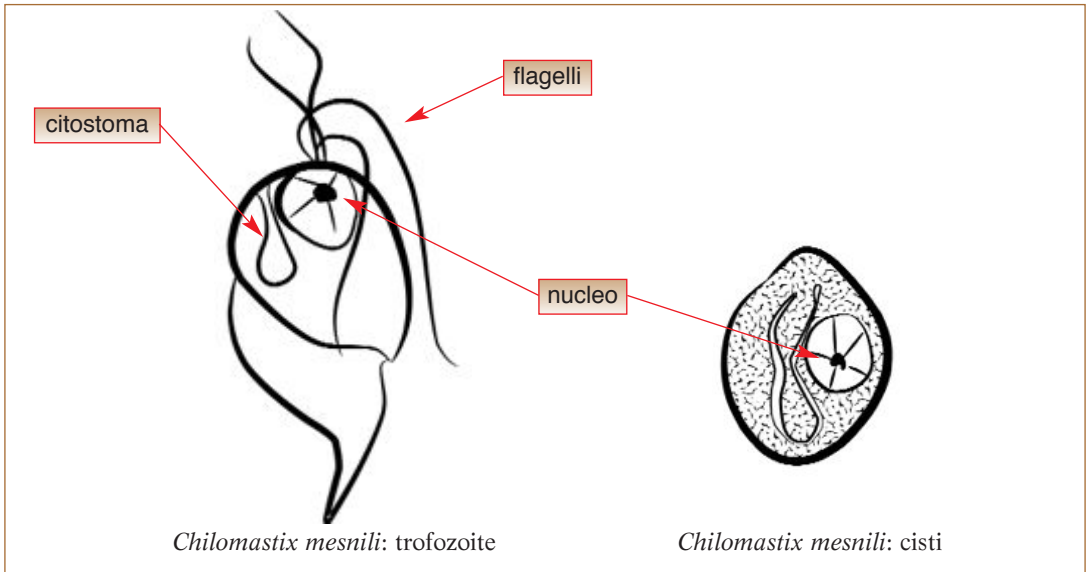
Il principio del test è illustrato nel capitolo generalità.



Dispositivo per immunocromatografia

Chilomastix mesnili

è il più grande tra i flagellati dell'intestino umano; ed è considerato apatogeno; i trofozoi ti vivono nell'intestino crasso e misurano 6-24 μ (in media 10-15); sono in genere piriformi con 1 nucleo in posizione anteriore con cariosoma centrale da cui si dipartono radialmente fibrille che raggiungono la membrana nucleare; la cromatina periferica presenta spesso piccoli granuli; a volte è visibile il citostoma, mentre i tre flagelli anteriori sono difficilmente evidenziabili; le cisti, 6-10 μ di grandezza, hanno forma di limone, spesso con un rigonfiamento anteriore, con 1 nucleo rotondo od ovale con cariosoma centrale da cui si dipartono radialmente fibrille che raggiungono la membrana nucleare; la cromatina periferica può essere distribuita uniformemente o concentrata da un solo lato della membrana; talora è visibile nel citoplasma un residuo del citostoma.



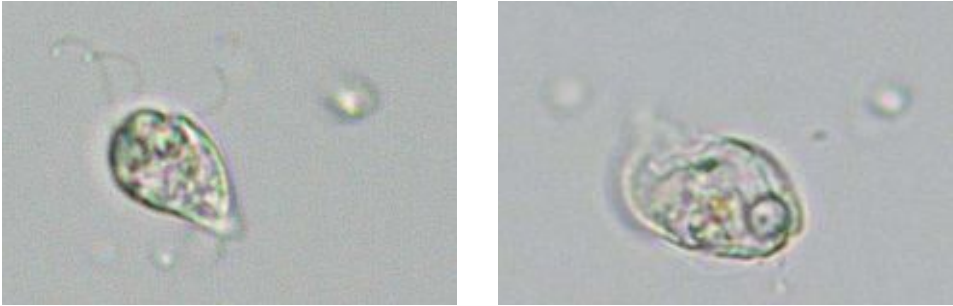
La diagnosi di laboratorio si fonda sulla messa in evidenza dei trofozoi ti e/o delle cisti mediante:

Metodi diretti

1. Esame a fresco: si stempera 1-2 g di copros in soluzione fisiologica e si osserva il preparato al microscopio ottico con obiettivo 40x.
2. Esame microscopico dopo concentrazione del campione di copros.
3. Colorazione di Giemsa.

1. Esame a fresco:

2-3 grammi di copros vengono stemperate in 1-2 ml di soluzione fisiologica; una goccia del campione diluito viene deposta su un vetrino portaoggetti e si ricopre con vetrino coprioggetti, evitando la formazione di bolle d'aria.



Trofozoi di *C. mesnili* 400x

2. Colorazione di Giemsa

Nel caso si vogliano allestire preparati permanenti, la colorazione indicata è quella di Giemsa al 3%.

Si prepara uno striscio di materiale di copros, deponendo su un vetrino una goccia della sospensione di copros che si striscia in modo da ottenere bande sottili alternate a bande spesse; una volta che lo striscio è ben asciugato si procede con la colorazione illustrata in dettaglio nel capitolo generalità.



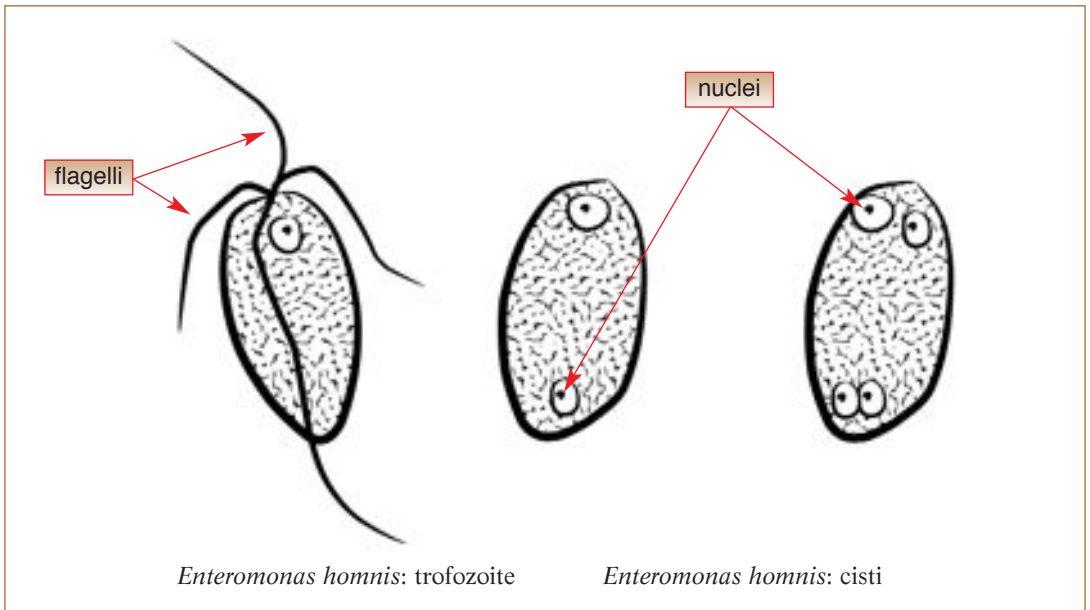
Trofozoi di *C. mesnili* 400x col. Giemsa

Anche se considerati per lo più apatogeni, questi flagellati costituiscono un utile indicatore di scarsa igiene e di fecalizzazione ambientale, pertanto se evidenziati, all'esame coproparassitologico, vanno refertati e il clinico valuterà sulla scorta delle condizioni cliniche del paziente se trattarli o meno.

Enteromonas hominis

Questo protozoo vive nell'intestino crasso ma non è patogeno.

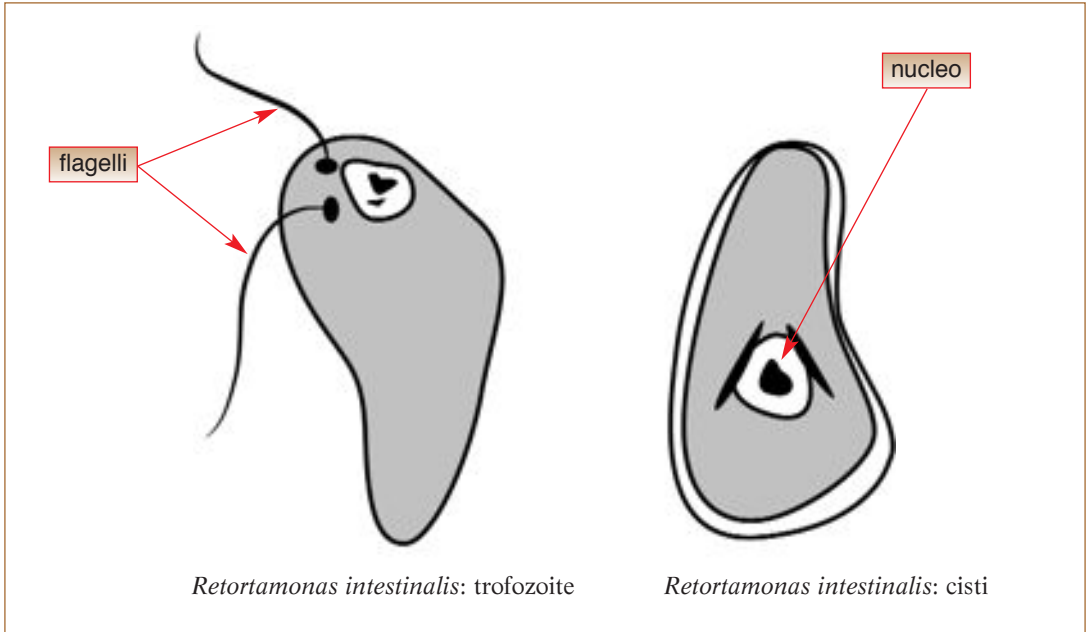
I trofoziti misurano 4-10 μ (mediamente 8-9); hanno forma ovale (leggermente piriforme), con un solo nucleo in posizione anteriore con cariosoma centrale, con flagelli difficilmente distinguibili; le cisti, che misurano 4-10 μ (in media 4-6), hanno da 1 a 4 nuclei (che se in numero pari sono disposti simmetricamente ai due poli) con cariosoma centrale.



Il contagio ha luogo per ingestione di cisti presenti nell'acqua o alimenti contaminati; l'infezione è quasi sempre asintomatica.

Retortamonas intestinalis

Retortamonas intestinalis è un piccolo flagellato apatogeno con trofozoite piriforme (lungo 6-7 μ) dotato di 2 flagelli ed un nucleo posto all'estremità anteriore del corpo e con cisti piriformi (lunghe 4-7 μ), con 1 solo nucleo.



L'osservazione di questi protzoi, all'esame microscopico del campione, è spesso difficile data le dimensioni molto piccole del flagellato.

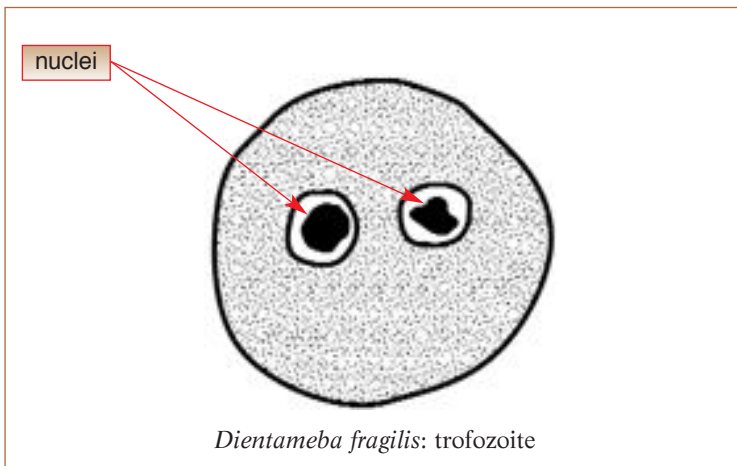
Come per *Enteromonas*, se evidenziato all'esame coproparassitologico, in numero considerevole, va refertato ed il clinico valuterà, sulla scorta delle condizioni immunologiche e cliniche del paziente, se trattarlo farmacologicamente o meno.

Dientamoeba fragilis è un flagellato che avendo perso il flagello sopravvive solo in forma ameboide.

Si presenta come una delle più piccole amebe dell'uomo, misurando 4-15 μ (in media 6-12).

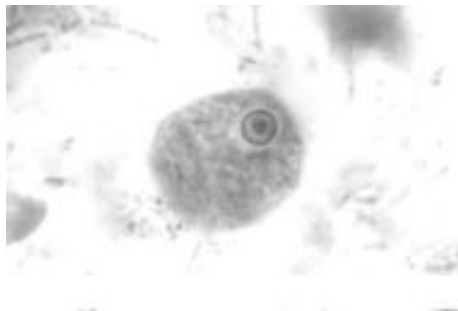
Ha distribuzione cosmopolita. Nel coprosi si ritrova con un nucleo, ma più frequentemente con due nuclei, con cariosoma frammentato generalmente in granuli e senza cromatina periferica. È ialina, poco mobile, non produce cisti e nel coprosi degenera rapidamente, vacuolizzandosi. *D. fragilis* non è generalmente considerata un agente patogeno.

La presenza di questi protozoi nel coprosi va considerata come indice, più che causa, di cattiva funzionalità delle vie digerenti.



Esame a fresco:

2-3 grammi di coprosi vengono stemperate in 1-2 ml di soluzione fisiologica; una goccia del campione diluito viene deposta su un vetrino portaoggetti e si ricopre con vetrino coprioggetti, evitando la formazione di bolle d'aria.



Dientamoeba fragilis: 400x

Genere *Trichomonas*

Trichomonas hominis

Tre specie di *Trichomonas* possono parassitare l'uomo.

T. vaginalis responsabile di malattia a trasmissione sessuale è comunemente riscontrato nell'apparato urogenitale. La sua trattazione è rimandata, quindi, al IV capitolo. *T. tenax*, chiamato anche *T. buccalis*, è un commensale della cavità orale umana, riscontrabile soprattutto in pazienti con scarsa igiene orale o malattia paradontologica avanzata.

T. tenax, si trova anche occasionalmente nei polmoni, ciò viene segnalato soprattutto in pazienti affetti da tumori o altre patologie polmonari.

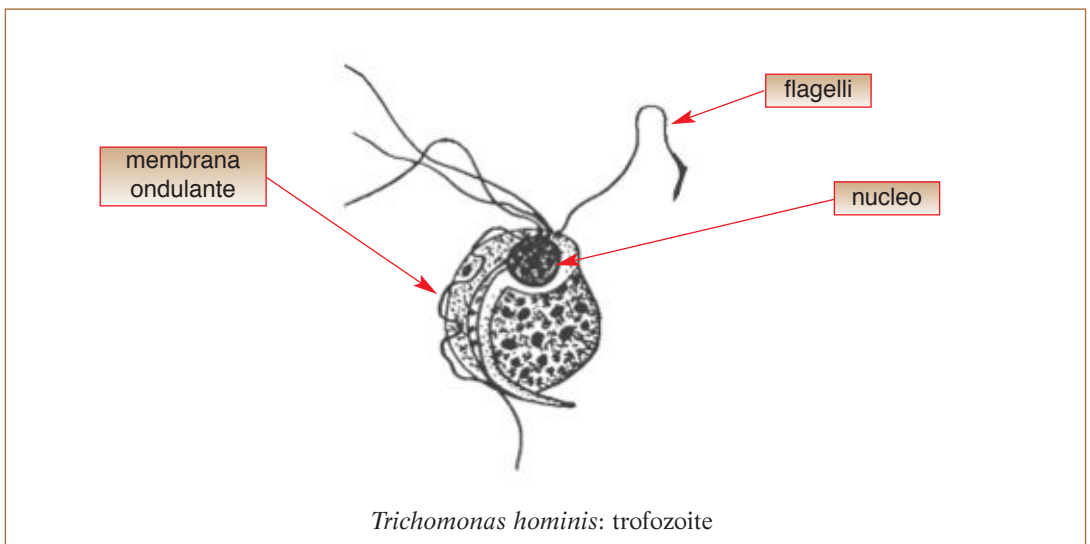
Alcuni autori suddividono *Trichomonas* in base al numero dei flagelli anteriori: ditrichomonas (2 flagelli), tritrichomonas (3 flagelli), pentatrichomonas (5 flagelli).

La tricomoniasi intestinale è causata da *Trichomonas hominis* che vive nell'intestino cieco e colon, solitamente è considerato apatogeno ma nei soggetti immunodepressi può causare diarree intermittenti.

In comune con gli altri membri del genere *Trichomonas*, il *T. hominis* ha un unico nucleo di forma sferica o ovoidale, 4 flagelli anteriori liberi e il flagello posteriore è collegato al corpo del protozoo come una membrana ondulante che si estende per tutta la lunghezza del corpo.

Una caratteristica distintiva di *Trichomonas* è un assostilo che segue la lunghezza dell'organismo e sembra sporgere alla fine posteriore del corpo, esso è composto da righe concentriche di microtubuli e si ritiene che funzioni per l'attacco del parassita sulle cellule epiteliali dell'ospite.

***T. hominis* è un piccolo protozoo flagellato, piriforme, con dimensioni di circa 5 x 15 µ; presenta da 3 a 5 flagelli, generalmente 5, quattro dei quali situati al polo anteriore e uno rivolto all'indietro che partecipa alla formazione della membrana ondulante. Il nucleo, di forma ovale, è situato verso l'estremità anteriore.**

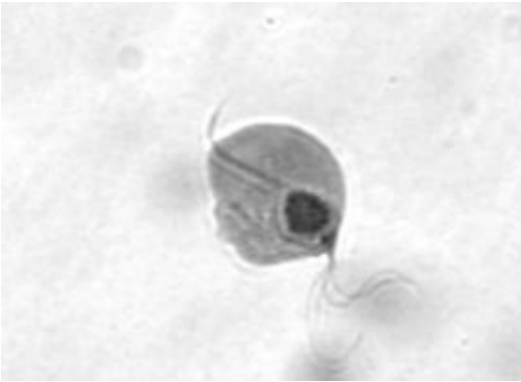


La trasmissione di questo flagellato all'uomo avviene per ingestione di alimenti e acqua contaminata, si configura una classica contaminazione oro-fecale.

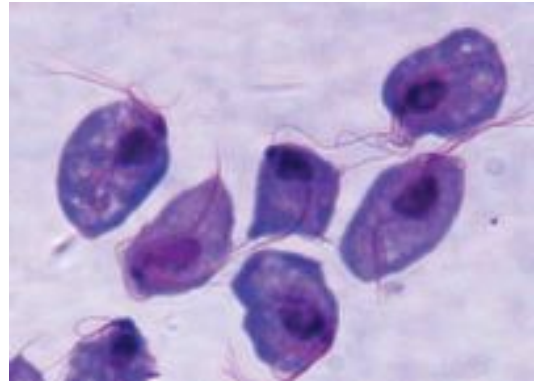
La diagnosi di laboratorio si fonda sulla messa in evidenza dei trofozoiti e/o delle cisti mediante:

Metodi diretti

1. Esame a fresco: si stempera 1-2 g di copros in soluzione fisiologica e si osserva il preparato al microscopio ottico con obiettivo 40x.
2. Esame microscopico dopo concentrazione del campione di copros
3. Colorazione di Giemsa

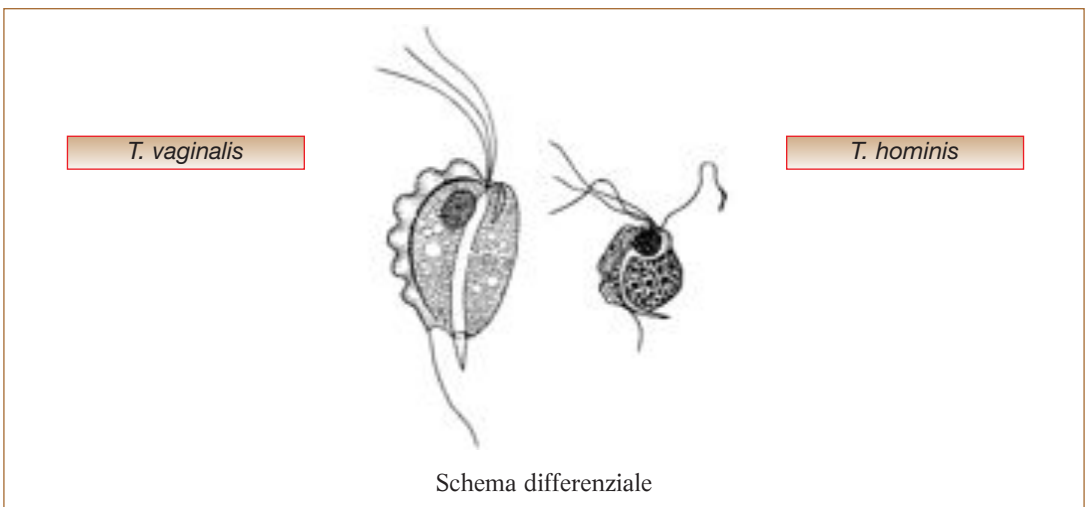


Trofozoite di *T. hominis* 1000x



Trofozoite di *T. hominis* 1000x col. Giemsa

La caratteristica differenziale di *T. hominis* con *T. vaginalis* è essenzialmente legata alla grandezza del protozoo.



Genere *Entamoeba*

Alla classe lobosea appartengono le Entamoebe.

La famiglia Endamoebidae comprende tre generi di protozoi che talora vivono nel tubo gastro-enterico umano:

- A) *Entamoeba*;
- B) *Iodamoeba*;
- C) *Endolimax*.

Entamoeba histolytica

Phylum	Sarcomastigophora				
Subphylum	Sarcodina				
Superclasse	Rhizopodea				
Classe	Lobosea				
Ordine	Schizopyrenida	Amoebida			
Famiglia	Vahlkampfiidae	Acanthamoebidae	Endamoebidae		
Genere	<i>Naegleria</i>	<i>Acanthamoeba</i>	<i>Entamoeba</i>	<i>Iodamoeba</i>	<i>Endolimax</i>
Specie	<i>fowleri</i>	<i>astronyxis</i>	<i>histolytica</i>	<i>butschlii</i>	<i>nana</i>
		<i>culbertsoni</i>	<i>dispar</i>		
		<i>castellanii</i>	<i>hartmanni</i>		
			<i>coli</i>		
			<i>polecki</i>		
			<i>gingivalis</i>		

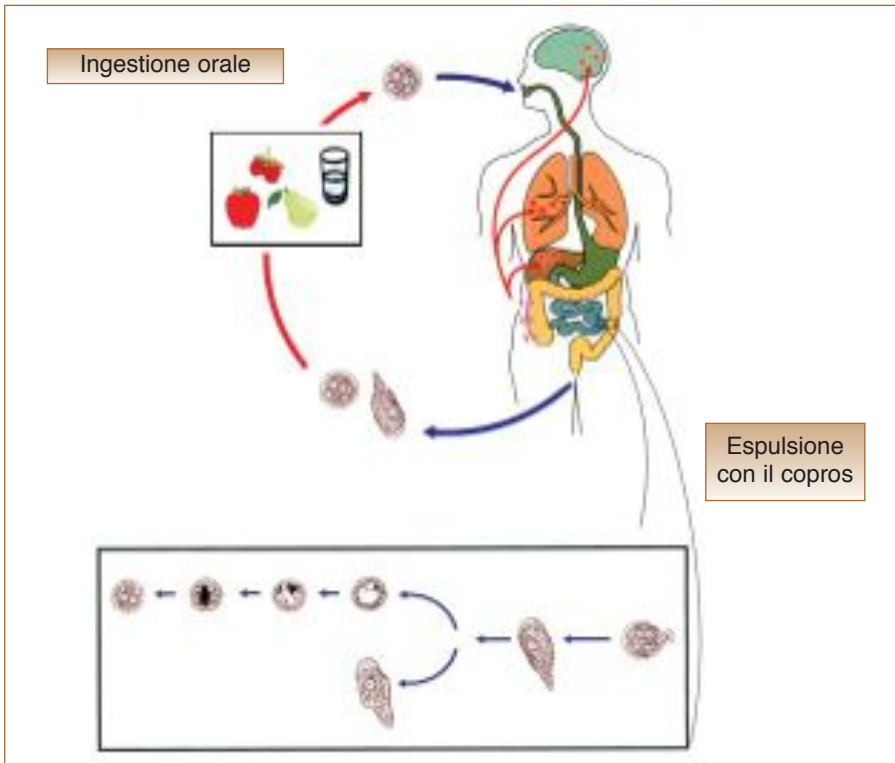
Posizione tassonomica delle Amebe intestinali

Tutte le specie di *Entamoeba* possono essere considerate commensali dell'uomo, ad eccezione di *Entamoeba histolytica* che è in grado di invadere i tessuti.

Entamoeba dispar è morfologicamente identica ad essa ma non è invasiva.

E. histolytica è un protozoo monoxeno il cui ospite naturale più importante è l'uomo. L'uomo può infettarsi per ingestione di acqua, legumi o frutta contaminati da cisti; più raro è il contagio interumano diretto (mani sporche, pratiche oro-rettali).

Entamoeba histolytica: Ciclo Biologico



Nel suo ciclo biologico si distinguono cinque fasi: trofozoiti in forma minuta, forme precistica, cistica, metacistica e infine trofozoiti in forma istolitica. La forma istolitica compare solo nei ceppi patogeni in fase virulenta ed è la forma invasiva dei tessuti.

Fase minuta: in questa fase, il trofozoite, è ospite innocuo dell'intestino ($7-15\mu$); nel citoplasma si osserva una parte fluida e ialina più esterna (ectoplasma) che emana pseudopodi, ed una parte densa e granulare più interna (endoplasma).

Fase precistica: il trofozoite trascinato dalla corrente coprologica, reagisce alla progressiva disidratazione arrotondandosi; nel citoplasma si formano uno o due corpi cromatoidi a forma di bastoncini con le estremità arrotondate; attorno al citoplasma inizia a formarsi una parete cistica.

Fase cistica: si completa la parete cistica; il nucleo si divide dando origine a una cisti dapprima binucleata e poi tetranucleata; i corpi cromatoidi gradualmente scompaiono. Le cisti vengono espulse con il copros e possono infettare altri individui.

Fase metacistica: da ogni cisti ingerita da un nuovo ospite prende origine un'ameba metacistica tetranucleata dalla quale si formano le amebe in forma minuta che si moltiplicano.

Fase istolitica: l'infezione da *E.histolytica* può talvolta estendersi dal lume dell'intestino ai tessuti delle pareti intestinali e in certi casi al fegato e ad altri organi. I trofozoiti, in questa fase, si presentano nei tessuti nella forma detta istolitica, caratterizzata da un diametro di 12-30 μ (talvolta fino a 60 μ) e da una decisa mobilità; gli pseudopodi si espandono e le amebe progrediscono in una determinata direzione allungandosi notevolmente. Nel cieco, nel sigma e nel retto le amebe possono dilagare a raggiera nella sottomucosa, dando origine a lesioni iniziali caratterizzate da necrosi dell'epitelio e della muscolatura dell'intestino. Raggiunta la sottomucosa, le amebe si moltiplicano attivamente determinando ulcere "a fiasco" (più estese in profondità che in superficie). Il processo necrotico, talora, si estende interessando le arterie e oltrepassando lo strato muscolare possono aver luogo perforazioni, gravi emorragie e ascessi peritoneali. La perforazione della cavità peritoneale favorisce il passaggio delle amebe al sangue; di qui possono raggiungere il fegato (determinando ascessi epatici) o il polmone (ascessi polmonari) o il cervello (ascessi cerebrali). Le localizzazioni extraintestinali seguono quasi sempre un'infezione intestinale (però non di rado possono sembrare primitive).

L'amebiasi invasiva, sia intestinale nelle forme acuta e cronica, sia extraintestinale, provoca una risposta immunitaria.

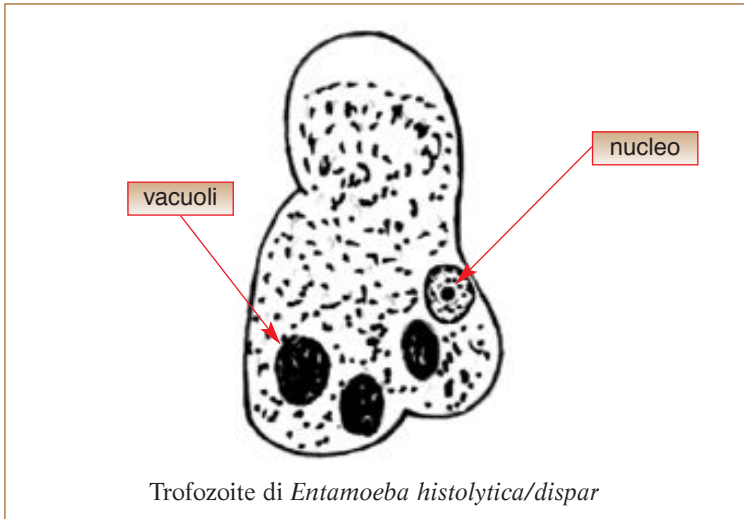
Nell'amebiasi epatica (la forma più comune di amebiasi extraintestinale) il quadro clinico si manifesta improvvisamente, o, al massimo preceduto da vaghi disturbi digestivi. I sintomi più comuni sono febbre irregolare, epatomegalia, dolore all'ipocondrio destro irradiato alla spalla destra, compromissione dello stato generale e talora sudorazione e tosse.

Le indagini routinarie di laboratorio evidenziano leucocitosi neutrofila, anemia normocromica e iperglobulinemia. Le indagini specifiche consistono nella evidenziazione dei trofozoiti amebici nell'aspirato cistico (di color bruno-cioccolato) e nella ricerca nel siero e nel sovrantante dell'aspirato cistico di anticorpi specifici con metodi IHA, IFI ed ELISA.

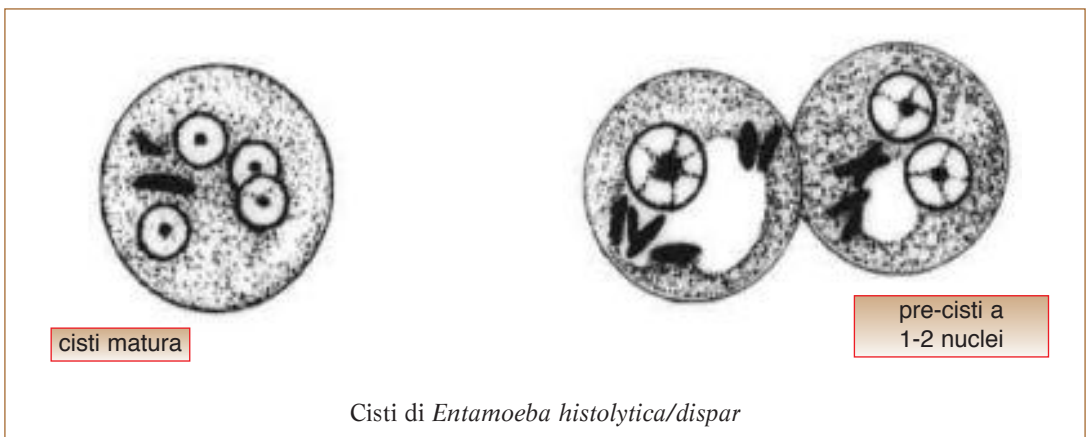
I sintomi dell'amebiasi polmonare sono caratterizzati da marcata dolenza toracica con tosse ed espettorazione densa color cioccolato (contenente trofozoiti). Per la diagnosi si ricorre alla ricerca dei trofozoiti nell'espettorato oltre che alla ricerca nel siero degli anticorpi specifici.

Le cisti rappresentano le forme di resistenza responsabili delle nuove infezioni. Esse possono sopravvivere per ore sulle mani, che costituiscono il veicolo più insidioso di infezione, e per alcuni giorni sugli alimenti contaminati. Gli addetti alla manipolazione e confezione di alimenti dovrebbero, perciò, essere attentamente controllati; le mosche possono trasportare le cisti ancora vive sugli alimenti. Le carenze igienico sanitarie ed il clima caldo umido (che favoriscono la sopravvivenza delle cisti), sono fattori favorevoli alla diffusione.

I trofozoiti misurano 12-30 μ ma nelle forme invasive arrivano fino a 60 μ ; nel citoplasma sono presenti talvolta vacuoli contenenti batteri, lieviti. La presenza di emazie nel citoplasma è l'unico elemento che permette di distinguerle da *E. dispar*. Il nucleo misura 3-6 μ e contiene, in posizione centrale un piccolo cariosoma. La membrana nucleare è ispessita da piccoli granuli di cromatina quasi sempre disposti in modo uniforme.



Le cisti misurano 10-25 μ (in media 12-15); hanno forma tondeggiate con parete sottile. Contengono da 1 a 4 nuclei con cariosoma quasi sempre centrale e cromatina periferica uniformemente distribuita. Nelle cisti giovani possono essere presenti vacuoli di glicogeno; nelle cisti mature talvolta sono visibili corpi cromatoidi (bastoncelli con punta arrotondata a forma di sigaro).



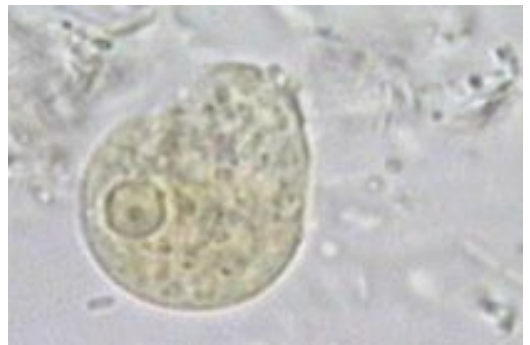
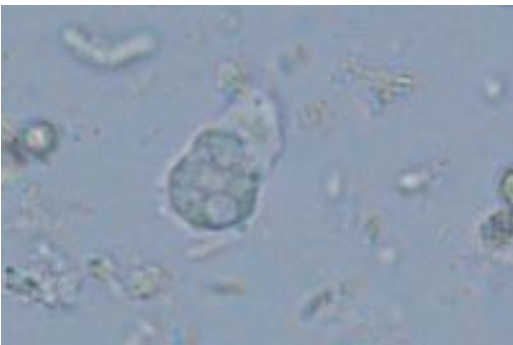
La diagnosi di laboratorio si fonda su metodi diretti cioè sulla messa in evidenza dei trofozoiti e/o delle cisti attraverso le seguenti metodiche:

Metodi diretti

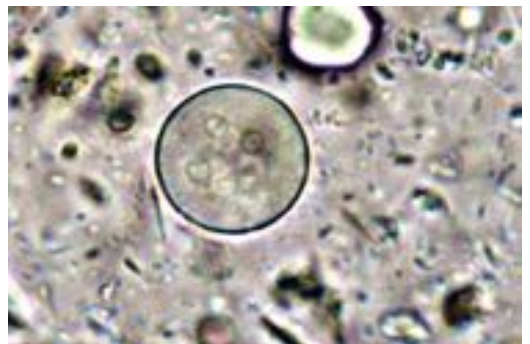
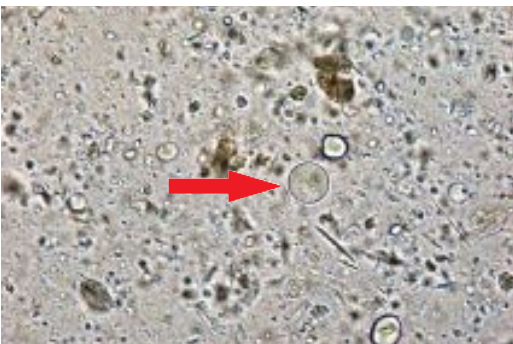
1. Esame a fresco
2. Colorazione di Dobell
3. Colorazione con soluzione tamponata di blu di metilene
4. Esame dopo concentrazione
5. Coltura secondo Robinson

1. Esame a fresco

Si stempera 1-2 g di copros in soluzione fisiologica e si osserva il preparato al microscopio ottico con obiettivo 40x, questo è indispensabile per poter visualizzare i trofozoiti delle Amebe che, se presenti, avranno un evidente movimento degli pseudopodi. Dallo studio dei movimenti si può avere anche l'indicazione della specie di ameba riscontrata, infatti L' *Entamoeba histolytica* muoverà gli pseudopodi solo in una direzione, mentre l'*Entamoeba coli*, commensale apatogeno, muoverà gli pseudopodi in tutte le direzioni contemporaneamente.



Trofozoiti di *Entamoeba histolytica*/dispar 400x



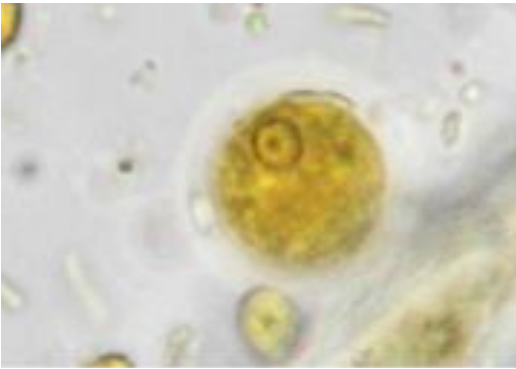
Cisti di *Entamoeba histolytica*/dispar 100 x e 400x

2. Colorazione di Dobell

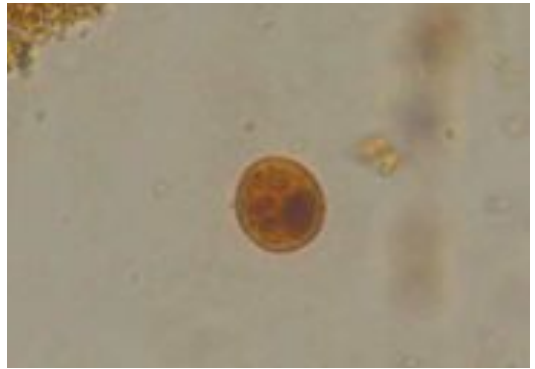
Una goccia della diluizione del copros viene posta su vetrino portaoggetto, si aggiunge ad essa una goccia della soluzione di Dobell preparata in giornata (tende a scolorirsi con il tempo perdendo le capacità tintoriali), si mescolano il campione con il colorante e si ricopre con vetrino coprioggetto.

Il preparato con soluzione di Dobell è utilizzato per colorare i vacuoli di glicogeno ed i nuclei delle cisti eventualmente presenti. Con questo tipo di preparato è generalmente possibile effettuare la diagnosi di specie delle cisti, perché il Lugol rende più visibili i nuclei, pertanto è più facile poterli contare all'interno della cisti osservata.

L'osservazione microscopica si esegue prima con obiettivo 10x e poi con obiettivo 40x.



Precisti di *Entamoeba histolytica/dispar*
(Col. Dobell)



Cisti di *Entamoeba histolytica/dispar*
(Col. Dobell)

3. Colorazione di blu di metilene

Può essere allestita quando nel preparato con soluzione fisiologica vengono visti trofozoiti amebici, o quando si sospetta la loro presenza. Si procede come i preparati con soluzione fisiologica e con soluzione di Dobell ponendo però sul vetrino una **grande goccia** di soluzione tamponata di blu di metilene. La colorazione è illustrata nel dettaglio nella parte iniziale di questo capitolo.

Attendere 5 - 10 minuti prima di esaminare il vetrino per permettere al colorante di penetrare nei trofozoiti

Il blu di metilene sovracolora i trofozoiti in circa 30 minuti, quindi il preparato va esaminato entro questo lasso di tempo

Questo tipo di preparato va effettuato solamente con copros fresco e non può essere utilizzato con campioni conservati in cui i trofozoiti sono stati uccisi.

4. Esame dopo concentrazione

Per la concentrazione del campione di copros, indispensabile per i campioni contenenti poche cisti, si procede come descritto nelle procedure del campione di copros, considerando che il conservante più adatto per le Amebe è il PVA.

- Nell'osservazione del preparato tenere presente che molti leucociti o macrofagi possono assomigliare molto alle amebe, pertanto bisogna che la forma che si sta osservando al microscopio, oltre alla grandezza, misurata con l'oculare millimetrato, posseda tutti i requisiti caratteristici della morfologia dell' ameba, cioè, come già riportato nella descrizione dei trofozoiti e delle cisti di ciascuna ameba, la morfologia e il numero dei nuclei, la morfologia del nucleolo, la distribuzione della cromatina nucleare e la presenza nel citoplasma dei corpi cromatofori e dei vacuoli contenenti eventualmente le emazie fagocitate, per essere sicuri della identificazione.
- Nella refertazione dei campioni di copros, quindi, prima di scrivere la identificazione di una qualunque ameba, bisogna essere completamente sicuri di quello che si è visto al microscopio, con la considerazione che ogni campione è presumibilmente negativo salvo dimostrare il contrario.
- Pertanto, se vi sono ancora, nel Parassitologo, dubbi circa la interpretazione dell'osservazione microscopica, si può ricorrere all'ausilio delle colorazioni permanenti.

Colorazioni permanenti

Le colorazioni che, più comunemente dopo la concentrazione, vengono impiegate per la ricerca delle amebe sono:

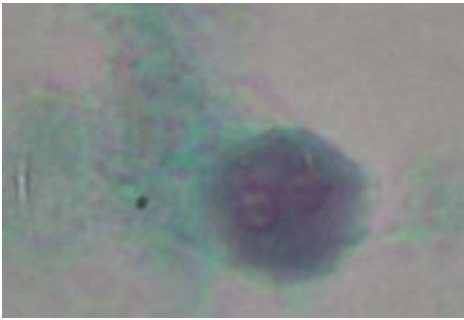
- Colorazione tricromica
- Colorazione ematossilina ferrica

Utile per la sicura identificazione la cui procedura è illustrata dettagliatamente nel capitolo generalità.

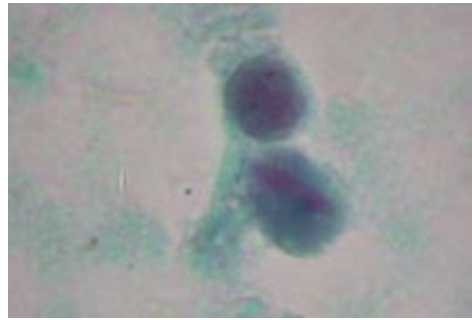
LA COLORAZIONE TRICROMICA

Interpretazione

- Il citoplasma di cisti e trofozoiti appare blu-verde, con una pallida sfumatura.
- La cromatina nucleare, i micro e macronuclei, gli eritrociti ingeriti ed i batteri appaiono di color rosso o rosso-porpora.
- Il materiale ingerito, come muffe o lieviti, si colora di solito in verde; non sono rare, però, variazioni di tonalità.
- Eventuali uova e larve di elminti si colorano in rosso.
- Il materiale di fondo si colora in verde chiaro.



Precisti di *Entamoeba histolytica/dispar*
(Col. Tricromica)



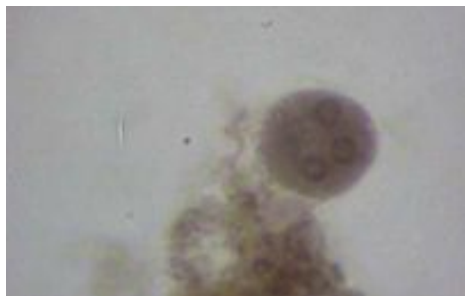
Trofozoite e cisti di *Entamoeba histolytica/dispar*
(Col. Tricromica)

LA COLORAZIONE EMATOSSILINA FERRICA

Interpretazione

La colorazione tipica ottenuta con Iron Hematoxylin Stain Set, con vetrini perfettamente fissati e colorati, è la seguente:

- I citoplasma dei protozoi si colora in blu-grigio. Le inclusioni citoplasmatiche assumono un'intensa colorazione blu-nerastra.
- I nuclei risultano blu-neri, in contrasto con la colorazione assunta dal citoplasma.
- Le strutture intranucleari (cromatina, cariosomi) appaiono differenziate nei dettagli.
- Il materiale di fondo si colora con gradazioni dal blu-grigio al nero.



Precisti di *Entamoeba histolytica/dispar* (Col. Ematossilina ferrica)

L'amebiasi invasiva, sia intestinale nelle forme acuta e cronica, sia extraintestinale, provoca una risposta immunitaria, pertanto la diagnosi, in questi casi, si può completare con le indagini indirette per la ricerca di anticorpi anti-amoeba prodotti dal paziente in esame (metodi IHA, IFI e ELISA).

Metodi Indiretti:

1. Emoagglutinazione indiretta (IHA)

Prelievo di sangue in provetta da sierologia

Il siero del campione in esame viene scomplementato a 56° per 30'

Si utilizza un kit contenente emazie umane sensibilizzate con antigeni di *Entamoeba histolytica*, un siero di controllo positivo e un siero di controllo negativo.

Si esegue seguendo il protocollo operativo conservato nel kit in uso.

La ricerca anticorpale viene eseguita anche sul sovranatante dell'aspirato cistico intraepatico, nel caso delle localizzazioni secondarie, epatiche, o su altri campioni biologici liquidi.

2. Immunofluorescenza indiretta (IFI)

Prelievo di sangue in provetta da sierologia

Il siero del campione in esame viene scomplementato a 56° per 30'

- Effettuare delle diluizioni a raddoppio del siero e cimentare ciascuna diluizione con un pozzetto del vetrino test.
- Incubare in camera umida a 37°C per 30'.
- Lavare con acqua distillata delicatamente e lasciar asciugare.
- Deposporre 20 µl. di coniugato anti IGG umane legato ad isotiocianato di fluoresceina.
- Incubare in camera umida a 37°C per 30'.
- Lavare con acqua distillata delicatamente e lasciar asciugare.
- Depositare una goccia di glicerina tamponata sul pozzetto, coprire con coprioggetto.
- Osservare con microscopio a fluorescenza l'intero preparato con obiettivo 40x.

I protozoi presenti sul vetrino appariranno di color verde mela sul fondo nero-marrone se nel siero del paziente sono presenti anticorpi specifici.

3. Saggio Immunoenzimatico (ELISA)

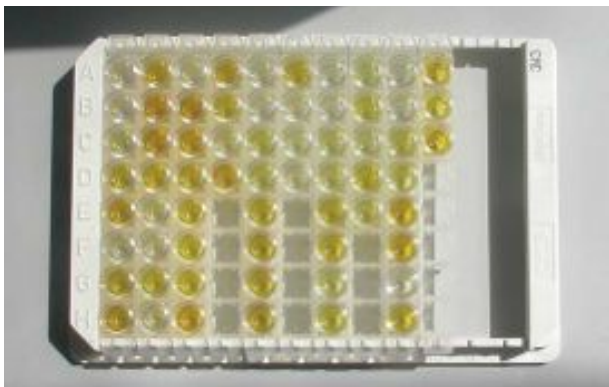
Prelievo di sangue in provetta da sierologia

- Adsorbimento dell'antigene specifico di *Entamoeba histolytica* sul fondo di una vaschetta di reazione (provetta, piastra Petri, pozzetto di una piastra per ELISA).
- Un'aliquota di una diluizione del siero in esame viene aggiunta alla vaschetta di reazione.
- Dopo l'incubazione, per permettere la formazione dell'eventuale complesso antigene-anticorpo, la soluzione che contiene l'anticorpo libero viene rimossa.
- Incubazione con anticorpo secondario per la rivelazione del complesso antigene-anticorpo primario. Allontanamento dell'anticorpo secondario in eccesso. L'anticorpo secondario formerà un complesso con l'anticorpo primario a sua volta associato all'antigene di *Entamoeba*. L'anticorpo secondario è modificato e porta legato un enzima (tipicamente perossidasi o fosfatasi alcalina).
- Rilevazione del complesso antigene-anticorpo: aggiunta del substrato dell'enzima coniugato all'anticorpo secondario.

Si sceglie un substrato sintetico per cui il prodotto della reazione con l'enzima coniugato all'anticorpo secondario è colorato (tipicamente: giallo per la fosfatasi alcalina o rosso per la perossidasi), la presenza del complesso antigene-anticorpo primario viene rilevata attraverso lo sviluppo del colore. L'intensità del colore dipenderà (a parità di tempo di incubazione) dal numero di complessi presenti e quindi dalla quantità di anticorpi specifici presenti nel campione.

Risultati di un test ELISA

L'intensità del colore giallo nei diversi pozzetti della piastra ELISA è proporzionale al numero di complessi antigene-anticorpo (primario) formati e quindi alla concentrazione dell'anticorpo (in grado di legare l'anticorpo primario) nel campione analizzato.



Piastra del test in ELISA

Coltura

Il terreno di coltura delle amebe è abbastanza complesso e richiede notevole accuratezza e pratica per potere essere eseguita correttamente.

Il terreno è difasico, costituito cioè da una fase solida e una fase liquida.

La fase solida e formata da :

- 1) **Agar salino** preparato da: Agar polvere gr. 1.5
sodio cloruro mg. 700
acqua distillata ml 100

Autoclavare a 121°C per 15-20'.

Distribuire, quando si raffredda, in boccette con tappo a vite da 5ml in quantità di 2.5 e lasciare solidificare a becco di clarino. L'agar salino, così preparato si conserva in frigorifero per 3 mesi.

La fase liquida è formata da:

- 1) **Eritrocina** preparata con Eritrocina base mg.200
Etanolo 70% ml 1.0

Si pesa l'eritrocina, si mette in falcon e si aggiunge 1ml di alcool.

Agitare al vortex, dopo 2h, si agita ancora e si porta a volume con 50 ml di acqua distillata . Si conserva in frigorifero.

- 2) **Bactopeptone** preparato da: Bactopeptone gr 20
Acqua distillata ml 100

Si distribuisce in provette da 10ml, si sterilizza in autoclave a 121°C per 15-20' e si conserva in frigorifero.

- 3) **Amido di riso** sterilizzato a secco in stufa (90' a 150°C)

- 4) **Tampone ftalato** preparato con Potassio ftalato gr.10.2
Idrossido di sodio al 40% ml. 5

Dopo solubilizzazione portare a volume con 100ml di acqua distillata, sterilizzare in autoclave a 121°C per 15'. Conservare in frigorifero.

- 5) **Terreno R** composto da una soluzione madre e quindi da una soluzione di uso:

a) La soluzione madre concentrata è formata da:

Sodio cloruro gr. 50
Acido citrico monoidrato gr 20
Potassio fosfato monoidrato gr 5
Ammonio solfato gr. 10
Magnesio solfato eptaidrato mgr. 500
Acido lattico al 90% ml 40
Acqua distillata a volume l. 1

b) La soluzione di uso è formata da:

Soluzione madre ml.100
Idrossido di sodio al 40% ml. 7.5
Acqua distillata a volume l. 1

Si aggiusta il ph a 7-7.3

Si distribuisce in beute da 500ml, si sterilizza a 121°C per 15' si conserva in frigorifero a 4°C fino a tre mesi.

6) Siero fetale di vitello

Una volta preparata tutta la fase liquida essa si completa per costituire il terreno BR
Terreno BR:

50ml. di terreno R (soluzione d'uso)-(5)
50ml di Siero fetale di vitello- (6)
10ml di Tampone ftalato-(4)
90ml di acqua distillata sterile
8ml di eritrocina-(1)
10ml di Bactopeptone-(2)
Sospensione di <i>Escherica coli</i>

Il terreno così preparato è conservato in frigorifero a 4°C per 3mesi.

Allestimento della coltura

Al momento di insemnare il campione di copros la fase solida si pone in contatto con la fase liquida seguendo questo protocollo:

In una boccetta con Agar salino (1) viene messa una spatolina (10µg) di Amido di riso (3)+ 2ml di BR+ 0,5 di inoculo di materiale di copros.

Incubare per 24h a 37°C

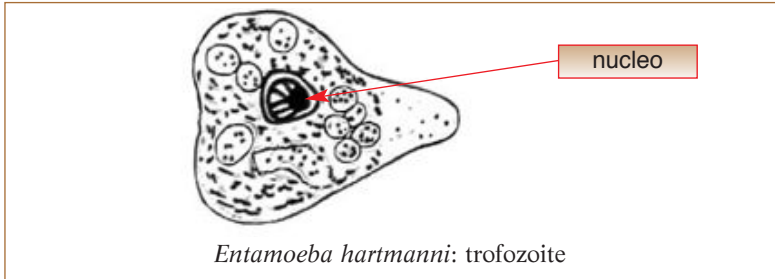
Il sovrnatante, dopo 24 h, viene eliminato e sostituito da 2ml di BR fresco+una scatola di amido di riso e la coltura viene posta nuovamente a 37°C per 48h.

Si elimina il sovrnatante ed il sedimento viene osservato al microscopio a 200-400x per l'eventuale identificazione delle amebe.

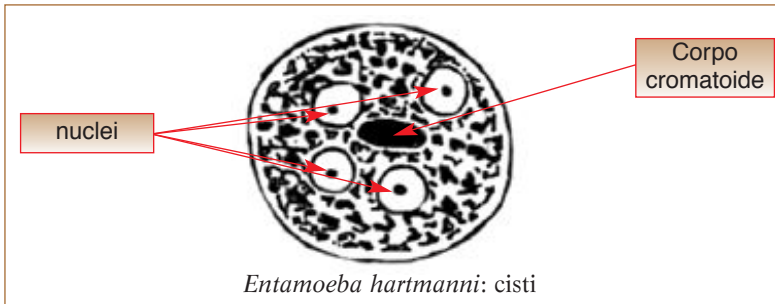
Entamoeba hartmanni

Entamoeba hartmanni è morfologicamente abbastanza simile a *E. histolytica*. È apatogena e cosmopolita.

I trofozoiti si presentano in forma minuta: misurano 8-12 μ . Il cariosoma è talora eccentrico, la cromatina aderisce talora irregolarmente alla membrana nucleare.

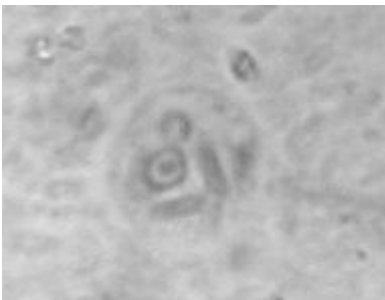


La cisti misura 5-10 μ (in media 6-8), ha 1-4 nuclei (generalmente 2) con cariosoma generalmente centrale e cromatina periferica uniformemente distribuita. Nel citoplasma sono spesso presenti corpi cromatoidi (generalmente più piccoli di quelli di *E. histolytica*).

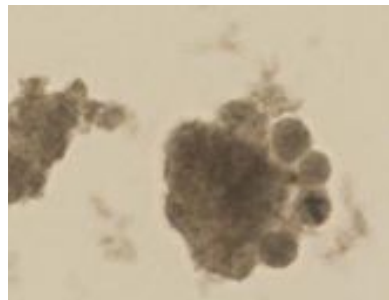


Esame a fresco:

2-3 grammi di copros vengono stemperate in 1-2 ml di soluzione fisiologica; una goccia del campione diluito viene deposta su un vetrino portaoggetti e si ricopre con vetrino coprioggetto, evitando la formazione di bolle d'aria.



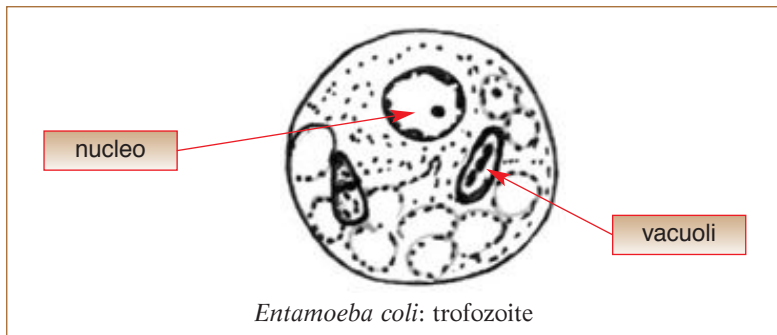
Entamoeba hartmanni 400x



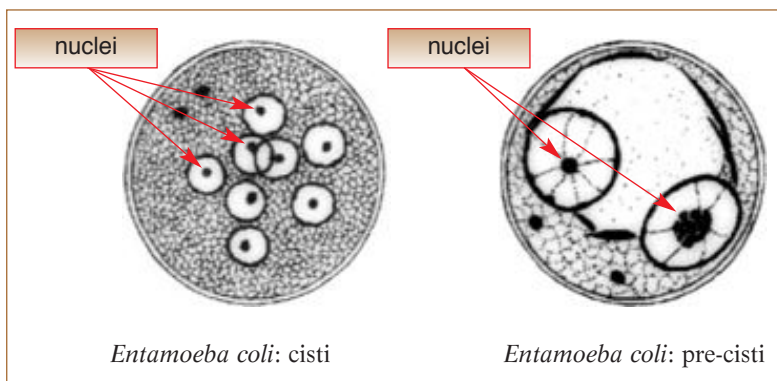
Entamoeba hartmanni 200x (Col. di Dobell)

Entamoeba coli è una grossa ameba apatogena e cosmopolita che vive nell'intestino crasso dell'uomo.

I trofozoiti misurano da 25 a 50 μ (in media 25-30 μ); presentano un nucleo vescicoloso, con grosso cariosoma generalmente eccentrico; grossi granuli di cromatina aderiscono irregolarmente alla membrana nucleare. Nel citoplasma si notano grossi vacuoli contenenti batteri e funghi.



Le cisti misurano 10-35 μ (in media 15-25); hanno forma sferica o ovale con parete cistica spessa; i nuclei, da 1 a 8, hanno il cariosoma generalmente eccentrico e la cromatina periferica generalmente distribuita irregolarmente. Nelle cisti immature talora è visibile un grosso vacuolo di glicogeno, talora sono visibili corpi cromatoidi ad estremità irregolare.



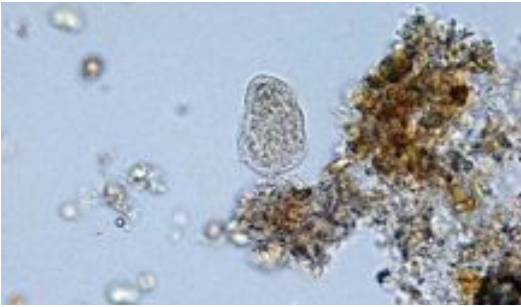
La diagnosi di laboratorio si fonda sulla messa in evidenza dei trofozoiti e/o delle cisti mediante:

1. Esame a fresco
2. Colorazione di Dobell
3. Colorazioni Permanenti

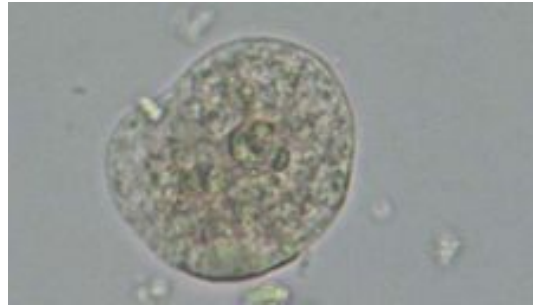
1. Esame a fresco

Si stempera 1-2 g di copros in soluzione fisiologica e si osserva il preparato al microscopio ottico con obiettivo 40x, questo è indispensabile per poter visualizzare i trofozoi delle amebe che se presenti avranno un evidente movimento degli pseudopodi. Dallo studio dei movimenti si può avere anche l'indicazione della specie di ameba riscontrata, infatti l'*Entamoeba coli* muoverà gli pseudopodi in tutte le direzioni contemporaneamente.

L'altro elemento differenziale con le altre amebe è quello di presentare, nella cisti matura, 8 nuclei



Trofozoite di *Entamoeba coli* 100x



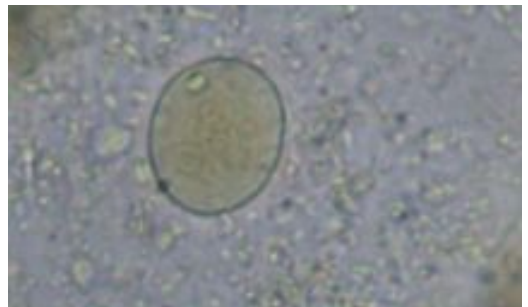
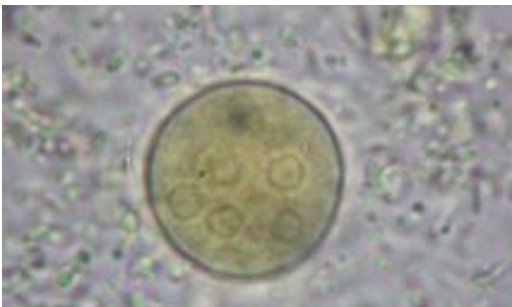
Trofozoite di *Entamoeba coli* 400x

2. Colorazione di Dobell

Una goccia della diluizione del copros viene posta su vetrino portaoggetto, si aggiunge ad essa una goccia della soluzione di Dobell preparata in giornata si mescolano il campione con il colorante e si ricopre con vetrino coprioggetto.

Il preparato con soluzione di Dobell è utilizzato per colorare i vacuoli di glicogeno ed i nuclei delle cisti eventualmente presenti. Con questo tipo di preparato è generalmente possibile effettuare la diagnosi di specie delle cisti, perché il Lugol rende più visibili i nuclei, pertanto è più facile poterli contare all'interno della cisti osservata.

L'osservazione microscopica si esegue prima con obiettivo 10x e poi con obiettivo 40x, il dato differenziale dell'*Entamoeba coli* dall'*E. histolytica* è il numero dei nuclei presenti nella cisti matura.



Cisti di *Entamoeba coli* (Col. di Dobell)

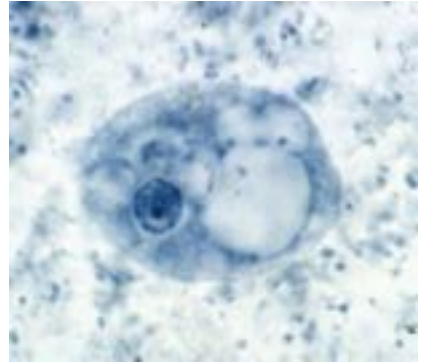
3. Colorazioni Permanenti

Le colorazioni che, più comunemente dopo la concentrazione, vengono impiegate per la ricerca delle amebe, nel campione biologico, sono:

LA COLORAZIONE TRICROMICA

Interpretazione

- Il citoplasma di cisti e trofozoiti appare blu-verde, con una pallida sfumatura.
- La cromatina nucleare, i micro e macronuclei, gli eritrociti ingeriti ed i batteri appaiono di color rosso o rosso-porpora.
- Il materiale ingerito, come muffe o lieviti, si colora di solito in verde; non sono rare, però, variazioni di tonalità.
- Le eventuali uova e le larve di elminti si colorano in rosso.
- Il materiale di fondo si colora in verde chiaro.



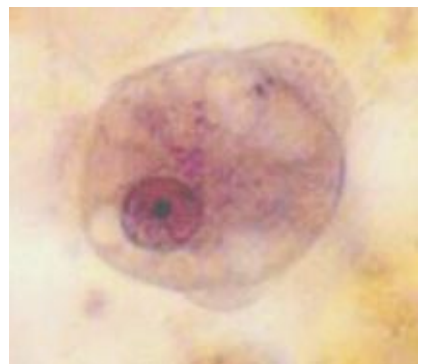
Trofozoite di *Entamoeba coli*
(Col. Tricromica)

LA COLORAZIONE EMATOSSILINA FERRICA

Interpretazione

La colorazione tipica ottenuta Con Iron Hematoxylin Stain Set, con vetrini perfettamente fissati e colorati in modo opportuno, è la seguente:

- Il citoplasma dei protozoi si colora in blu-grigio. Le inclusioni citoplasmatiche assumono un'intensa colorazione blu-nerastra.
- I nuclei risultano blu-neri, in contrasto con la colorazione assunta dal citoplasma.
- Le strutture intranucleari (cromatina, cariosomi) appaiono differenziate nei dettagli.
- Il materiale di fondo si colora con gradazioni dal blu-grigio al nero

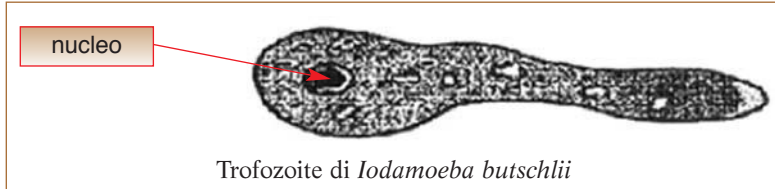


Trofozoite di *Entamoeba coli*
(Col. Ematossilina)

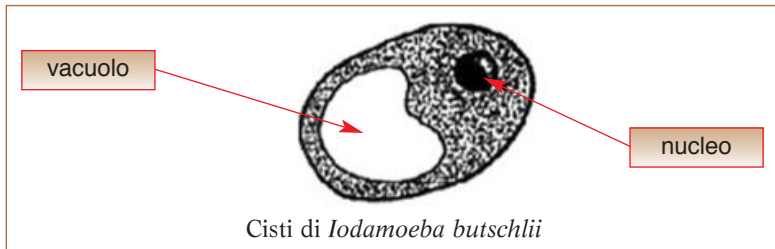
Genere *Iodamoeba*

Iodamoeba butschlii

I trofozoiti misurano 12-20 μ (in media 12-15 μ). Nel nucleo è presente un grosso cariosoma; è assente la cromatina periferica.



Le cisti misurano 5-20 μ (in media 10-12); hanno forma ovale ed un solo nucleo con un grosso cariosoma; nel citoplasma è presente un grosso vacuolo contenente glicogeno che si colora in rosso bruno con Lugol.



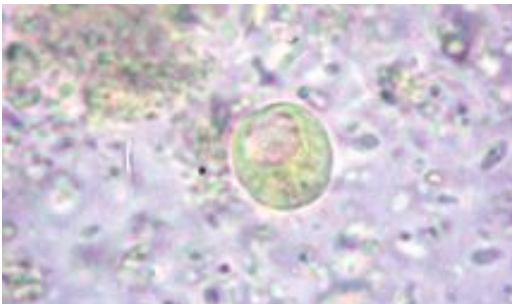
La diagnosi di laboratorio si fonda sulla messa in evidenza dei trofozoiti e/o delle cisti mediante:

Colorazione di Dobell

L'esame a fresco con Lugol è molto indicato per la diagnosi di questa ameba perché colora molto visibilmente il grosso vacuolo che la caratterizza.

Una goccia della diluizione del copros viene posta su vetrino portaoggetto, si aggiunge ad essa una goccia della soluzione di Dobell preparata in giornata (tende a scolorirsi con il tempo perdendo le capacità tintoriali), si mescolano il campione con il colorante e si ricopre con vetrino coprioggetto.

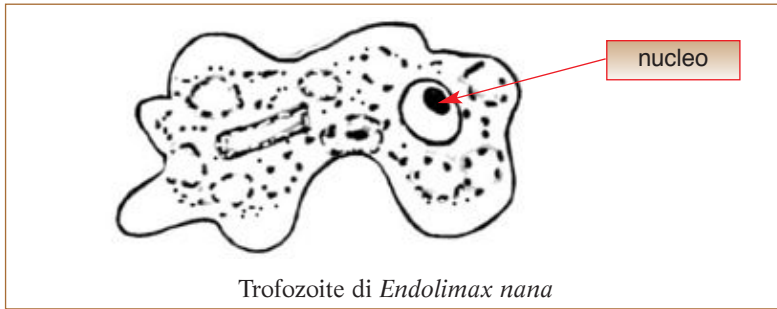
Il preparato con soluzione di Dobell è utilizzato per colorare i vacuoli di glicogeno ed i nuclei delle cisti eventualmente presenti.



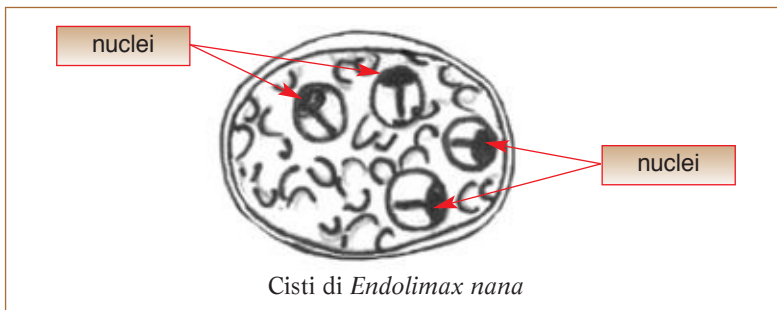
Cisti di *Iodamoeba butschlii* 400x (Col. di Dobell)

Endolimax nana

I trofozoiti compaiono nel copros più frequentemente delle cisti. Misurano 6-15 μ (in media 8-10). Hanno citoplasma granuloso, spesso vacuolato. Il nucleo ha un grosso cariosoma eccentrico, circondato da un alone chiaro, senza cromatina periferica.

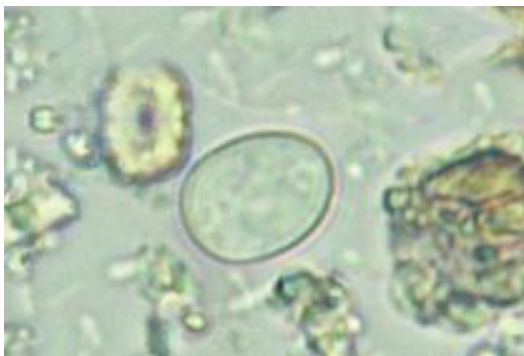


Le cisti sono ovali, lunghe 5-10 μ (in media 6-8); Sono presenti da 2 a 4 nuclei, con un cariosoma eccentrico e compatto, senza cromatina periferica.

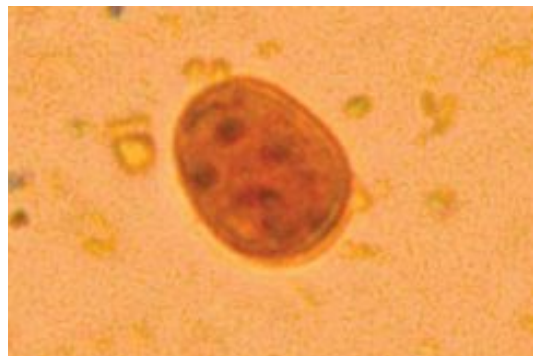


Esame a fresco

2-3 grammi di copros vengono stemperate in 1-2 ml di soluzione fisiologica; una goccia del campione diluito viene deposta su un vetrino portaoggetti e si ricopre con vetrino coprioggetto, evitando la formazione di bolle d'aria.



Cisti di *Endolimax nana* 400x



Cisti di *Endolimax nana* 400x (Col. di Dobell)

Phylum Ciliophora

Balantidium coli

I ciliofori sono protozoi caratterizzati dal corpo completamente ricoperto da corte ciglia;

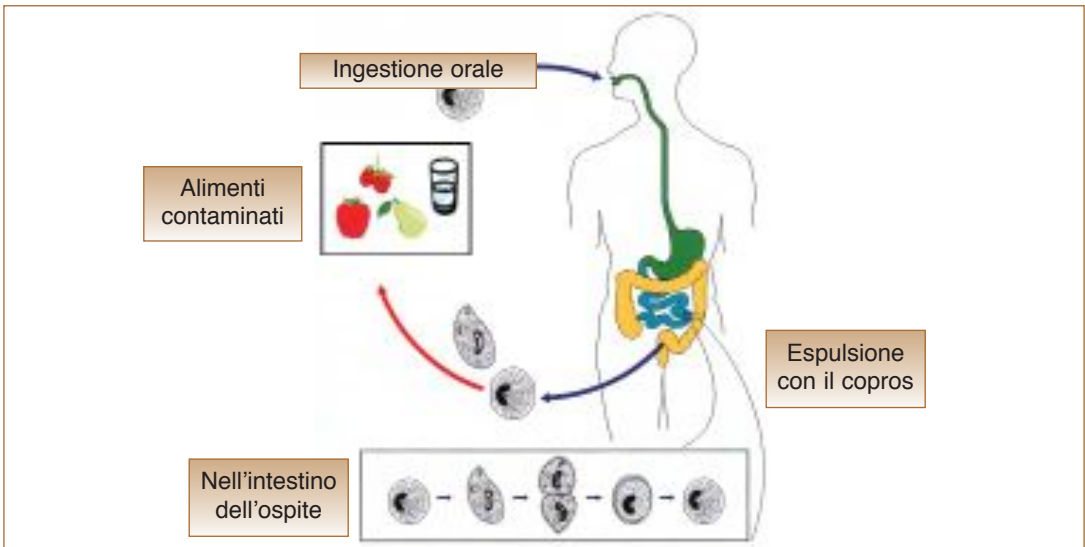
hanno due nuclei di significato diverso: il micronucleo con funzioni riproduttive e il macronucleo o nucleo somatico.

L'uomo può essere parassitato da un'unica specie di ciliati (*Balantidium coli*).

Phylum	Ciliophora ↓
Classe	Litostomatea ↓
Sottoclasse	Trichostomata ↓
Ordine	Vestibuliferida ↓
Famiglia	Balantidiidae ↓
Genere	<i>Balantidium</i>
Specie	<i>Coli</i>

Posizione tassonomica di *Balantidium coli*

Balantidium coli: Ciclo Biologico



Le cisti di *Balantidium coli* sono responsabili della trasmissione del protozoo; l'ospite acquisisce le cisti attraverso l'ingestione di alimenti o acqua contaminati.

A seguito dell'ingestione delle cisti, si ha la formazione dei trofozoiti che si localizzano nel lume del grande intestino dove si moltiplicano per scissione binaria. Alcuni trofozoiti invadono la parete del colon e vengono eliminati con il copros.

La balantidiasi è una zoonosi a diffusione cosmopolita (i suini costituiscono il serbatoio dell'infezione) che colpisce molto raramente l'uomo, o rimane molto spesso asintomatica.

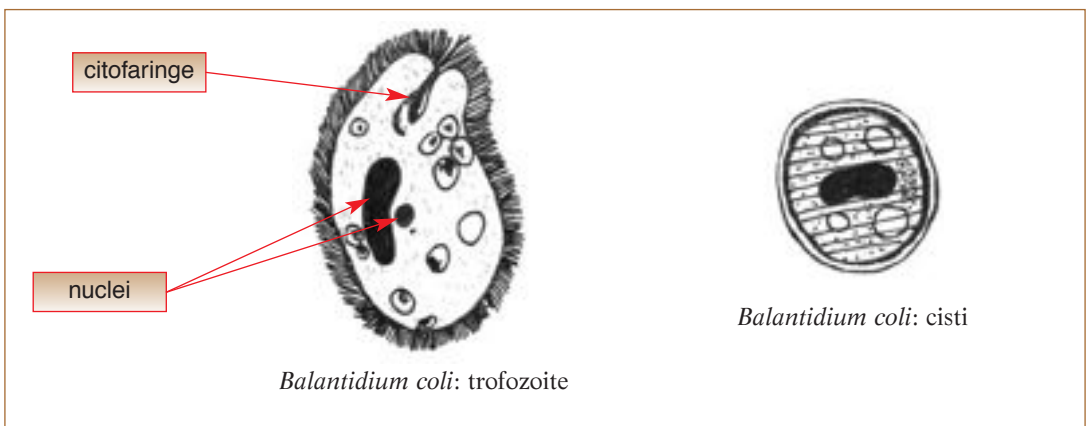
Quando i sintomi sono presenti, le manifestazioni cliniche consistono in diarrea con sangue e muco, dolori addominali, nausea e vomito.

Il decorso della malattia è intermittente con fasi di miglioramento alternate a fasi di recrudescenza della malattia.

Nei casi più gravi *B. coli* riesce a penetrare nella sottomucosa e ad avanzare attraverso i tessuti e può provocare dissenterie talvolta letali.

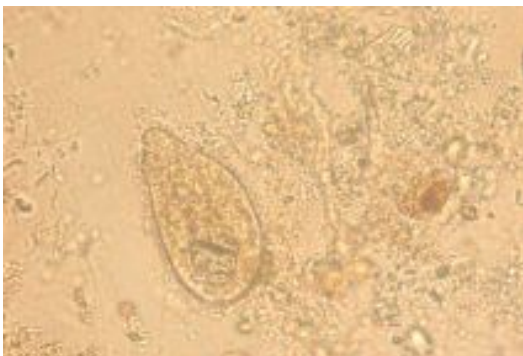
Il trofozoite di *Balantidium coli* è un grosso protozoo ovale lungo tra i 50 e gli 80µ. Presenta anteriormente un citostoma che si prolunga internamente nel citofaringe; al polo posteriore è presente l'apertura anale o citopige. È provvisto di due vacuoli pulsanti, e di due nuclei:

il macronucleo reniforme ed il nucleo che si trova spesso nella concavità del primo. Le cisti (forme di resistenza) sono sferoidali (50-60µ. di diametro). La riproduzione avviene per scissione binaria ma è possibile anche un processo sessuato.

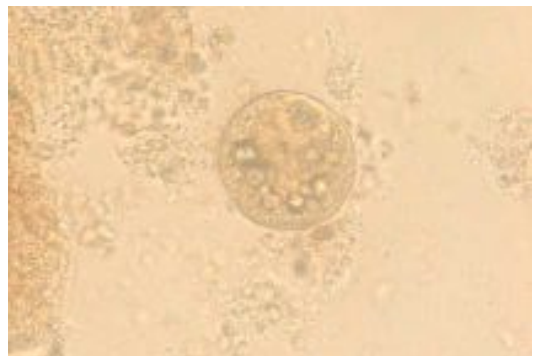


La diagnosi di laboratorio si fonda sulla messa in evidenza dei trofozoiti e/o delle cisti mediante:

1. Esame a fresco
2. Esame dopo concentrazione



Trofozoite di *Balantidium coli* 400x



Cisti di *Balantidium coli* 400x

Alcuni microrganismi, la cui posizione tassonomica è tuttora incerta, sono ancora, per tradizione, di competenza dei parassitologi.

Tra questi quello di interesse della parassitologia intestinale è:

Blastocystis hominis

È un microrganismo di incerta posizione tassonomica anche se generalmente viene ascritto tra le Sarcodina.

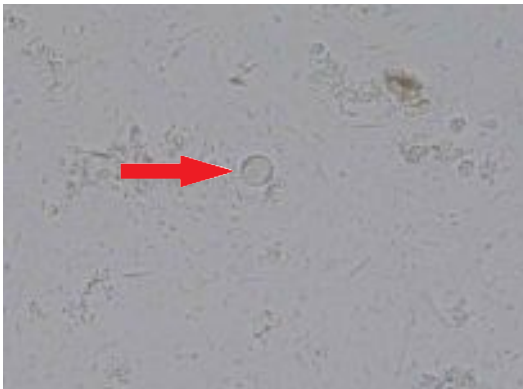
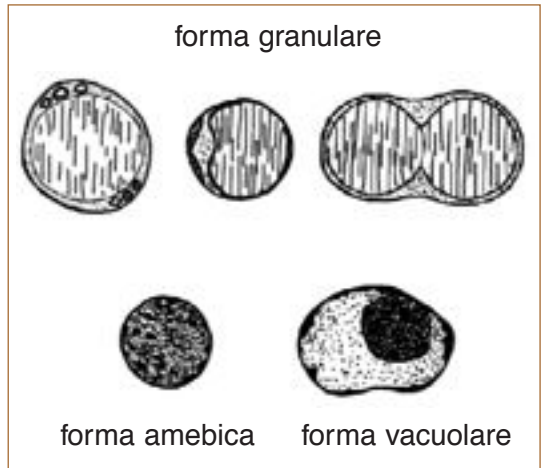
Blastocystis hominis vive nel lume dell'intestino e si riscontra spesso nel copros in tre diverse forme: **vacuolare** (la forma più frequente in cui il citoplasma è confinato marginalmente ad un grosso vacuolo con 2 o 3 nuclei e numerosi granuli rifrangenti periferici); **amebica** e **granulare**, tutte di dimensioni assai variabili da 5 a 40 μ .

L'osservatore deve fare attenzione a distinguerla da *Entamoeba* spp. a cui assomiglia molto soprattutto nella sua forma amebica.

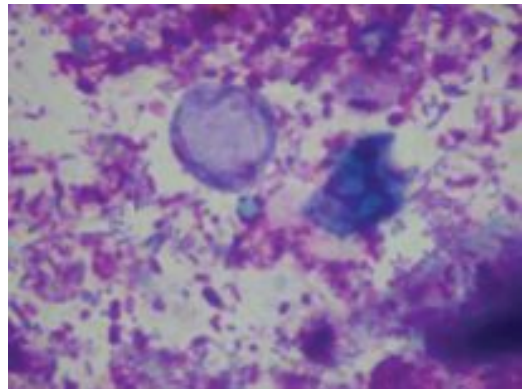
La *Blastocystis* spp. è considerata apatogena; il suo riscontro nel copros viene considerato, dal clinico, più un faro di un cattivo funzionamento intestinale che un vero e proprio patogeno.

Alcuni autori (Zierdt, Garavelli ecc), invece, recentemente, descrivono il potere patogeno di questo protozoo ritenendolo responsabile di numerose diarree sia nel paziente immunocompetente che immunodepresso.

Addirittura Phillips e Zierdt descrivono un caso di blastocistosi ad esito infausto per disseminazione del protozoo e ritengono, infine il protozoo responsabile di artralgie e artrite immunomediata.



Blastocystis hominis 400x



Blastocystis hominis 1000x (Col. di Giemsa)

Generalità

I protozoi, appartenenti al Phylum Apicomplexa, sono provvisti di un complesso apicale e di un microporo; non hanno ciglia; nel loro ciclo biologico alternano generazioni asessuate a generazioni sessuate: i trofozoiti, all'interno di cellule ospiti, aumentano di volume e si trasformano in schizonti che per divisione multipla o schizogonia producono un certo numero di merozoiti, che invadendo altre cellule si trasformano in trofozoiti; la schizogonia procede per alcune generazioni finché gli schizonti producono merozoiti sessuati, che penetrando in nuove cellule si trasformano in macrogametociti (femminili) e microgametociti (maschili); il macrogametocita si trasforma in una grossa cellula (macrogamete), che occupa quasi tutta la cellula ospite, mentre i microgametociti si dividono più volte dando origine a un grande numero di microgameti, che escono dalla cellula parassitata. Quando un microgamete raggiunge il macrogamete lo feconda dando origine allo zigote (diploide) alla cui periferia si forma una parete cistica (oocisti); dopo la meiosi si formano gli sporozoiti aploidi che si trasformano in trofozoiti.

Phylum	Apicomplexa					
Classe	Sporozoasida					
Sottoclasse	Coccidiasina				Piroplasmiasina	
Ordine	Eucoccidiorida				Piroplasmorida	
Sottordine	Eimeriorina			Haemosporina		
Famiglia	Eimeriidae	Cryptosporidiidae	Sarcocystidae		Plasmodiidae	Babesiidae
Genere	<i>Ispora</i>	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Sarcocystis</i>	<i>Toxoplasma</i>	<i>Plasmodium</i>	<i>Babesia</i>
Specie	<i>belli</i>	<i>parvum</i> <i>bayleyi</i>	<i>hominis</i> <i>lindemanni</i> <i>suihominis</i>	<i>gondii</i>	<i>falaciparum</i> <i>vivax</i> <i>ovale</i> <i>Isporamalarie</i>	<i>microti</i>

Posizione tassonomica dei Coccidi intestinali

COCCIDI

Sono parassiti monoxeni che alternano un ciclo schizogonico con divisioni asessuate a un ciclo gamogonico con divisioni sessuate con formazione dello zigote che avvia il ciclo sporogonico con formazioni di oocisti mature (forme infettanti). Appartengono a questa famiglia *Cryptosporidium* spp, *Ispora belli*, *Cyclospora cayetanensis* e *Sarcocystis* spp che determinano patologia nell'uomo.

Cryptosporidium spp.

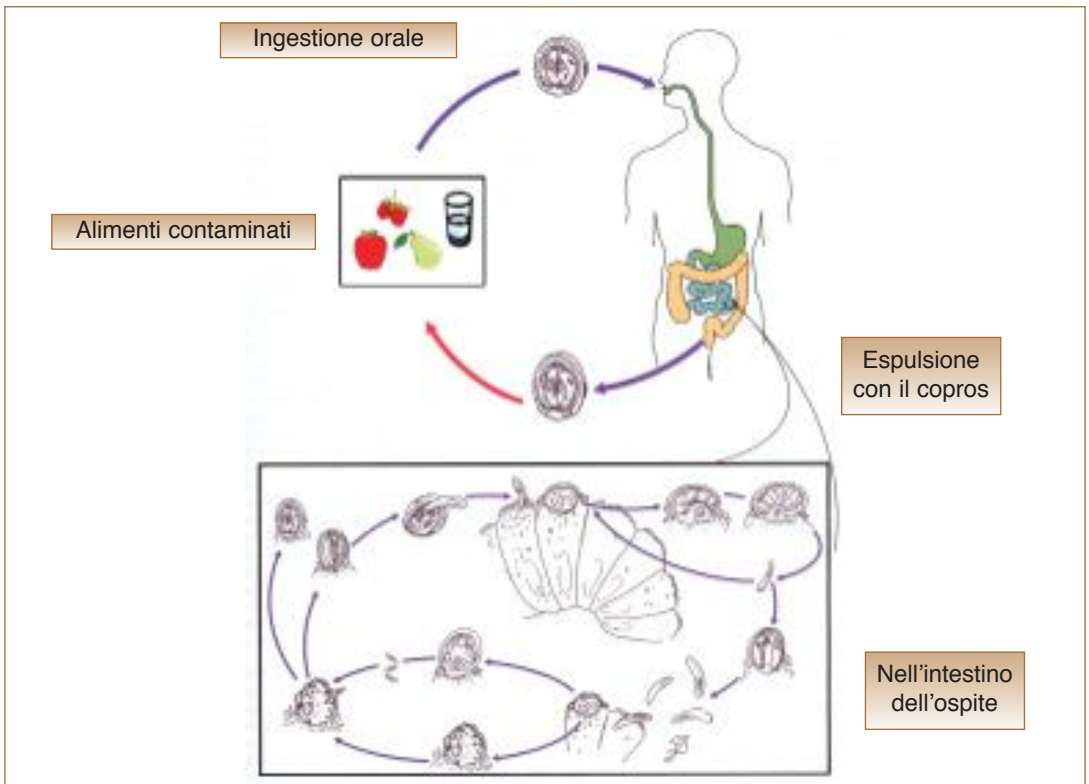
Cryptosporidium spp., il coccidio più importante del Phylum Apicomplexa, classe Sporozoa, è stato descritto per la prima volta da Tyzzer (1907) agli inizi del secolo, a livello della mucosa gastrica di un topo asintomatico e riconosciuto solo molti anni dopo come patogeno, responsabile di enteriti diarroiche in varie specie animali come mammiferi, uccelli, pesci.

Nel 1976 Neme e Meisel. riconobbero il potere patogeno di questo protozoo anche nei confronti dell'uomo.

A partire dal 1982 (fino ad allora erano stati segnalati solo 7 casi umani) la cryptosporidiosi ha mostrato un sensibile incremento con numerosi casi segnalati sia in pazienti con immunodeficienza primaria e secondaria, in particolare in AIDS, sia in soggetti immunocompetenti ma a rischio, come veterinari ed allevatori ecc. Attualmente si conoscono due specie che infettano l'uomo: *C. hominis*, tipico solo della specie umana, e *C. parvum*, di origine zoonotica.

È un protozoo ubiquitario; si riscontra in bovini, ovini, animali domestici e nell'uomo che si infetta ingerendo acqua, latte o alimenti contaminati da oocisti mature. Le oocisti si mantengono a lungo vitali in ambiente idrico, fino a 6-10 mesi. Si configura come una tipica infezione con circuito oro-fecale che si manifesta con sintomatologia diarroica.

Cryptosporidio spp.: Ciclo Biologico



Il ciclo biologico del *Cryptosporidium* si completa nello stesso ospite, trattandosi di un protozoo monoxeno.

Fasi di riproduzione schizogonica asessuata e gamogonica sessuata si alternano nello stesso ospite.

Contrariamente agli altri Coccidi *Cryptosporidium* è privo dello stadio di sporocisti. Recenti studi con indagini di microscopia elettronica mostrano, invece, che il protozoo, oltre che libero nel lume intestinale in vari stadi di maturazione, trofozoite, schizonte, gametocita, è più spesso inglobato in un vero e proprio vacuolo parassitoforo, derivato dalla membrana esterna della cellula ospite, quindi la localizzazione esatta del protozoo è intracellulare extracitoplasmatica.

Dal punto di vista clinico determina quadri totalmente diversi a seconda se infetta soggetti sani o immunocompromessi.

Nel primo caso la malattia è di regola asintomatica e autolimitante e si risolve spontaneamente in 1-2 settimane; la forma di infezione opportunistica in AIDS o bambini malnutriti e immunodepressi ha, invece, prognosi riservata caratterizzata da un decorso che può prolungarsi per mesi ed essere fatale.

Dopo 3-12 giorni dall'infezione, provoca diarrea acquosa secretoria con numerose scariche giornaliere ed imponente perdita di liquidi e sali minerali.

Cryptosporidium è inserito, nella categoria B, tra gli agenti biologici potenzialmente utilizzabili per scopi terroristici, perchè facilmente disseminabile, causa moderata morbilità e bassa mortalità e richiede buona capacità diagnostica e sorveglianza della malattia (rapporto ISTISAN 05/4).

La oocisti, forma infettiva, è estremamente resistente alle condizioni ambientali e a tutti i trattamenti delle acque, compresa la clorazione; la dose infettante, inoltre, è bassa, pari a 130 oocisti ingerite.

La più grande epidemia segnalata e associata al consumo di acqua potabile distribuita in rete si è verificata a Milwaukee (USA) nel 1993; furono colpite da criptosporidiosi circa 400.000 persone.

La diagnosi di laboratorio si fonda sulla messa in evidenza delle oocisti mature di 5-6µ di diametro contenenti ciascuna 4 sporozoit, eliminate con il copros, attraverso le seguenti metodiche:

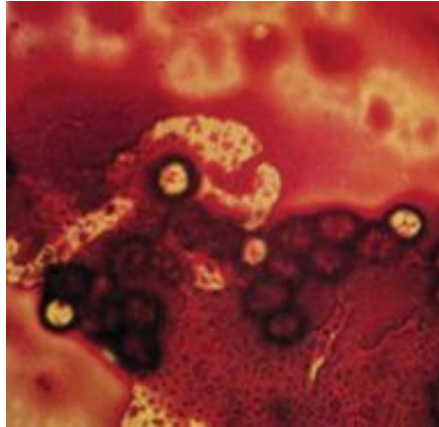
Metodi diretti

1. Carbofucsina: colorazione estemporanea; oocisti trasparenti e rifrangenti in campo rosso.
2. Ziehl-Neelsen mod.: oocisti rosse in campo blue o verde.
3. Immunofluorescenza diretta (IFD): Oocisti verde mela in campo nero.
4. Test immunocromatografico.
5. Enterotest

1. Carbolfucsina

Si pongono poche gocce di sospensione di coprosu su un vetrino portaoggetti e si mescolano con una goccia di carbolfucsina; si lascia asciugare e si osserva al microscopio con obiettivo 20x - 40x.

Le oocisti tondeggianti o ovoidali con inclusioni puntiformi o a virgola, appariranno in negativo, perchè non assumono il colore, e spiccano sullo fondo colorato in rosso.



Oocisti di *Cryptosporidium* spp. 400x (Col. carbolfucsina)

Si deve, comunque, considerare che la carbolfucsina non è un colorante molto specifico ed inoltre che il preparato si altera con il passare del tempo: osservazioni microscopiche del preparato, oltre i 15-20 minuti dalla preparazione, risulterebbe falsamente negativo perchè il colorante col tempo penetra nella oocisti.

È indispensabile, pertanto, utilizzare una colorazione permanente come quella di Ziehl-Neelsen mod. che risulta molto più specifica e facile da interpretare.

2. Ziehl-Neelsen modificato

La colorazione si fonda sul principio della acido-alcool resistenza; la parete delle oocisti dei coccidi è molto resistente al trattamento sia con alcool che con acido, pertanto una volta assunto il colorante primario, la carbolfucsina, sono resistenti al trattamento con solventi organici forti come la miscela acido-alcool.

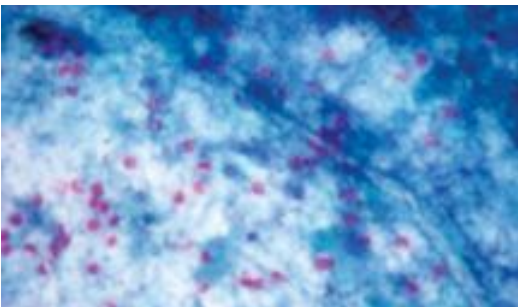
Per questa ragione i microrganismi che presentano tale caratteristica, come tutti i coccidi, vengono chiamati acido-alcool resistenti.

La colorazione per l'acido-resistenza modificata da Kinyoun viene chiamata "metodo a freddo" in quanto impiega un detergente tensioattivo che aggiunto alla carbolfucsina facilita la colorazione primaria, senza dover ricorrere al riscaldamento del preparato.

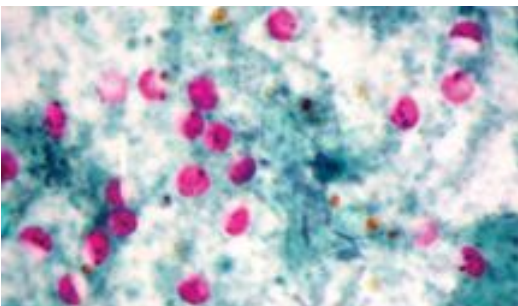
Esecuzione:

- | |
|---|
| • Si preparano strisci del campione su vetrino portaoggetto. |
| • Il preparato viene lasciato asciugare per 24 h. |
| • Fissazione in metanolo per 10'. |
| • Deposare sul preparato la carbolfucsina per 15'-20'. |
| • Lavare con acqua di fonte, quindi asciugare su carta assorbente. |
| • Aggiungere il decolorante (soluzione di acido acetico in alcool etilico) per 15"-30". |
| • Lavare con acqua di fonte e lasciar asciugare. |
| • Deposare il colorante di contrasto (blu di metilene o verde di malachite) per 2'-5'. |
| • Lavare con acqua di fonte e lasciar asciugare |

Si osserva al microscopio ottico con obiettivo 10, 20 e 40x



Cryptosporidium spp. (Col. Ziehl-Neelsen mod.) colorazione di contrasto blu di metilene 100x e 400x



Cryptosporidium spp. (Col. Ziehl-Neelsen mod.) colorazione di contrasto verde di malachite 200x e 400x

3. Immunofluorescenza diretta (IFD)

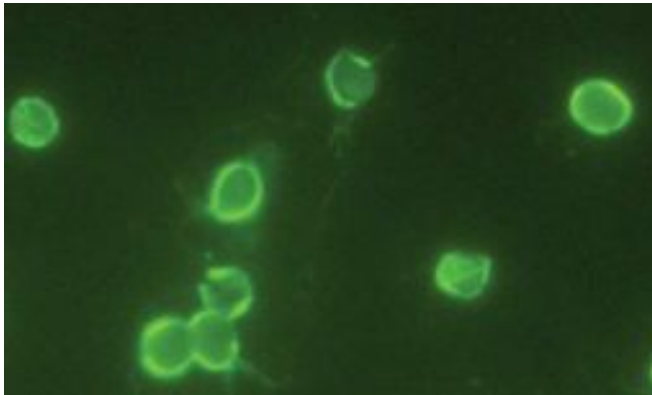
In commercio sono disponibili anticorpi monoclonali diretti agli antigeni di *Cryptosporidium*.

La metodica utilizzata con l'impiego di questi monoclonali è descritta di seguito:

- | |
|--|
| • Depositare 25µl. di una sospensione di copros sul pozzetto di un vetrino per IFI. |
| • Lasciar asciugare all'aria il preparato per 24 h. |
| • Fissare in acetone per 10'. |
| • Deposare 20µl. di anticorpo monoclonale sul pozzetto. |
| • Incubare in camera umida a 37°C per 30'. |
| • Lavare con acqua distillata delicatamente e lasciar asciugare. |
| • Deposare 20 µl. di coniugato legato ad isotiocianato di fluoresceina. |
| • Incubare in camera umida a 37°C per 30'. |
| • Lavare con acqua distillata delicatamente e lasciar asciugare. |
| • Depositare una goccia di glicerina tamponata sul pozzetto, coprire con coprioggetto. |

Osservare con microscopio a fluorescenza l'intero preparato con obiettivo 40x.

I protozoi eventualmente presenti appariranno di color verde mela sul fondo nero-marrone.



Oocisti di *Cryptosporidium* spp. in Immunofluorescenza 400x

4. Test Immunocromatografico (ICT)

I saggi rapidi immunocromatografici sono usati come supporto addizionale agli esami microscopici nella diagnosi dell'infezione da *Cryptosporidium*.

Il principio del test si fonda sulla messa in evidenza degli antigeni specifici di *Cryptosporidium*, presenti nel copros dei soggetti infetti, con anticorpi specifici.

Per l'esecuzione del test si esegue la tecnica di raccolta dei campioni di copros abitualmente impiegate per l'esame parassitologico tradizionale come descritto nella "Raccolta campione".

- I campioni di copros freschi devono essere diluiti in rapporto 1/4 (per es. 0.1ml di campione di copros in fisiologica e 0.3 ml di acqua distillata).
- I campioni in formalina o SAF vengono utilizzati senza ulteriori diluizioni.

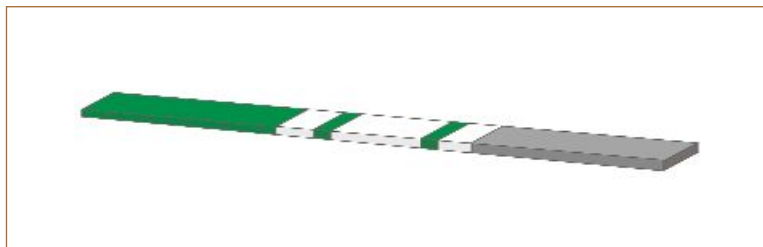
L'immunodosaggio di tipo cromatografico rileva la presenza degli antigeni di *Cryptosporidium* utilizzando la trasmissione per capillarità del campione attraverso una membrana impregnata con anti- *Cryptosporidium* di coniglio.

Esecuzione:

- | |
|---|
| • In una provetta mettere 4 gocce di soluzione tampone e 0.1ml di campione, miscelare. |
| • Aggiungere 4 gocce di coniugato costituito di anticorpi monoclonali specifici di topo per <i>Cryptosporidium</i> , miscelare. |
| • Nel dispositivo per il test vengono poste 0.2ml di miscela campione/coniugato |

La miscela si trasmette per capillarità lungo una membrana contenente una striscia per la cattura dell'anticorpo. Se presenti, i complessi immunologici di *Cryptosporidium* reagiscono con l'anticorpo anti- *Cryptosporidium* nella linea del test e una linea rossa di qualunque intensità apparirà nella posizione di test *Cryptosporidium*. Invece, se assenti gli antigeni specifici nel campione esaminato, le microparticelle marcate con l'anticorpo non legate all'antigene vengono catturate successivamente nella linea di controllo contenente anticorpo anti-topo.

- I risultati del saggio vengono letti dopo 15', oltre questo tempo i risultati non sono più validi.



Membrana di reazione di ICT

i limiti di questi test

Questo saggio presenta dei limiti, in quanto un risultato negativo non esclude la presenza nel campione delle oocisti di *Cryptosporidium*

Spesso la localizzazione del *Cryptosporidium* è a livello duodenale, pertanto non ritroveremo le oocisti nel copros, ma sarà necessario ricorrere all'impiego dell'Enterotest per un prelievo più adeguato.

5. Enterotest

- Viene effettuato al paziente digiuno.
- È costituito da un filo lungo 140 cm (90 cm per uso pediatrico) terminante con un peso di gomma al silicone; il tutto è contenuto in una capsula di gelatina, da cui sporge un filo.
- Si fissa il capo del filo ad una guancia e si fa ingerire la capsula con un bicchiere d'acqua.
- Il capo zavorrato del filo raggiunge l'intestino tenue, dove viene tenuto per 4 ore.
- Si estrae il filo e si invia in laboratorio in un contenitore sterile.
- Con dita guantate, si preleva la patina di materiale che il filo ha raccolto dalla mucosa dell'intestino tenue; si pone il materiale prelevato su vetrini per l'esame a fresco e per le colorazioni permanenti.

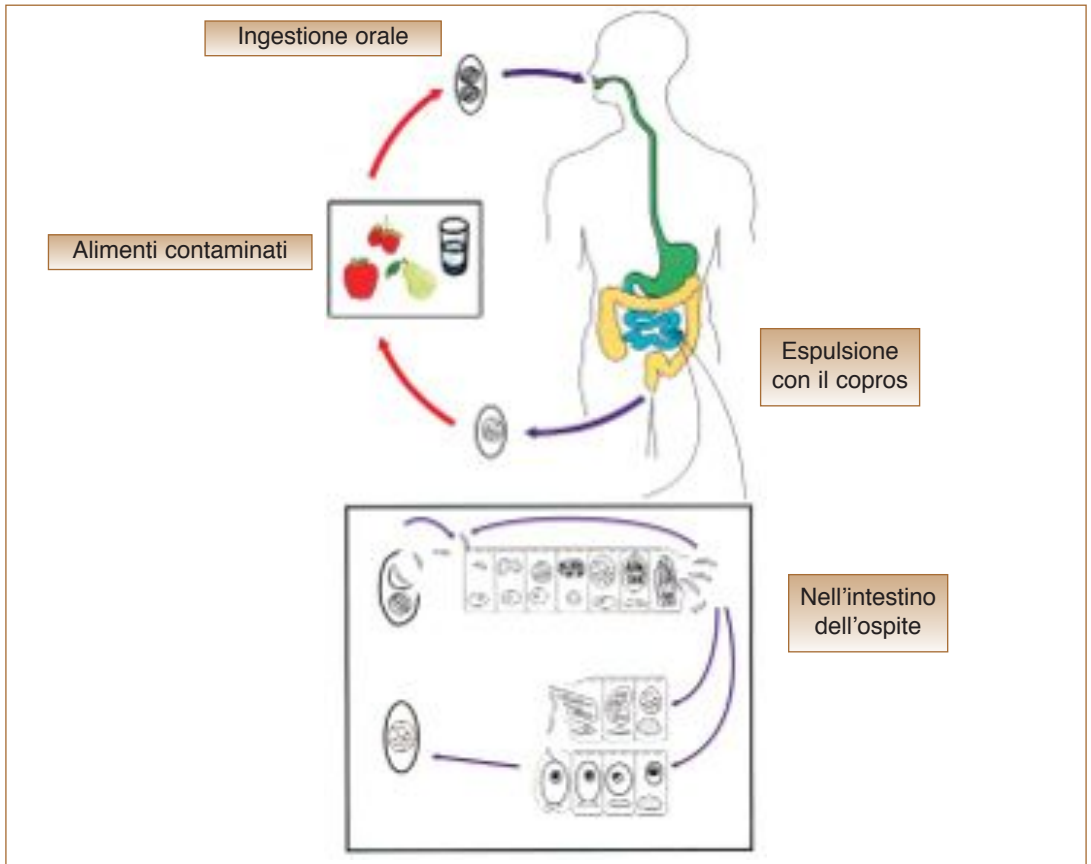


Kit per Enterotest

***Iso*spora belli**

I. belli è un coccidio che provoca enterocolite con dolori addominali e diarrea che si risolve spontaneamente entro poche settimane.

Nei pazienti immunodepressi la sindrome è più severa e persistente.

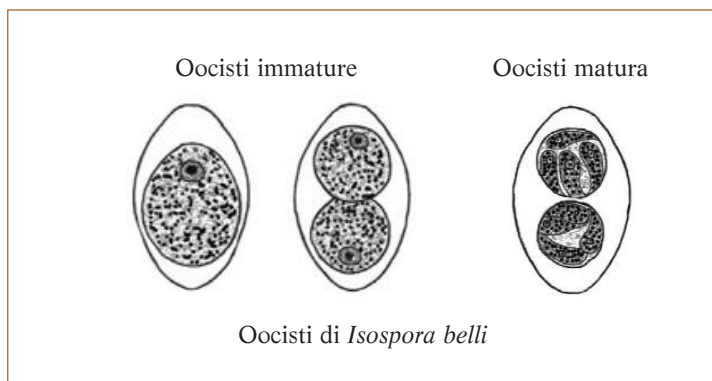
*Iso*spora belli: Ciclo Biologico

Le oocisti emesse con il copros sono quasi sempre immature.

Sono ovali, diametri $20-33\mu \times 10-20\mu$.

La maturazione avviene nell'ambiente esterno;

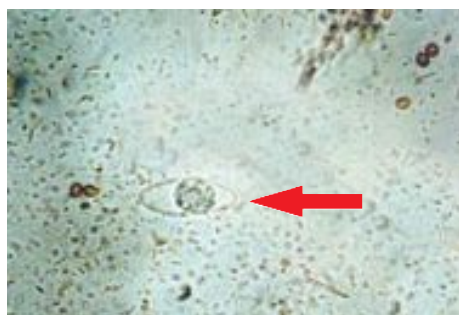
l'ovocisto maturo contiene 2 spore, ciascuna con 4 sporozoit.



La diagnosi si basa sulla messa in evidenza delle oocisti eliminate con il copros, attraverso le seguenti metodiche:

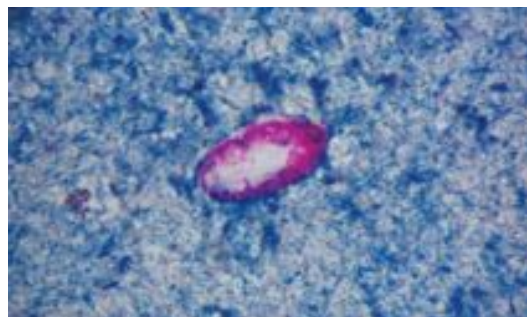
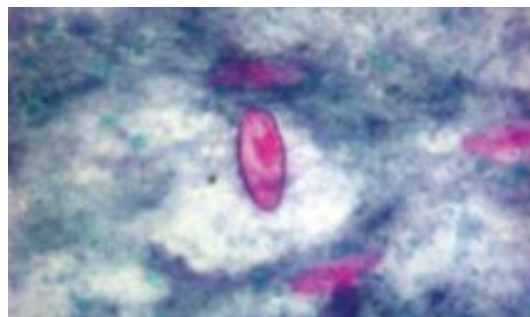
Metodi diretti

1. **Esame a fresco:** oocisti molto delicate.



Oocisti di *Isospora belli* 200x

2. **Ziehl-Neelsen mod.:** Oocisti con sporoblasto o sporocisti rosse in campo blue o verde.



Oocisti di *Isospora belli* (Col. Ziehl-Neelsen mod.) 400x

Cyclospora cayetanensis

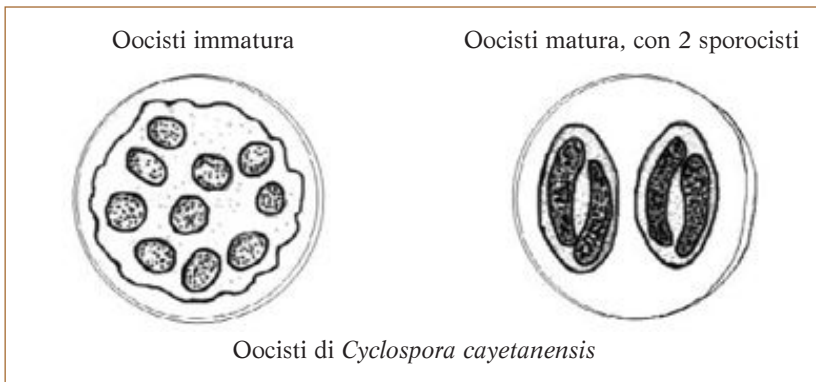
È un coccidio che provoca diarrea, anoressia, mialgia, per 2-3 settimane, talora fino a 3 mesi, con periodi di remissione alternati a periodi di recrudescenza.

Le oocisti immature nel copros (8-10 μ) mostrano autofluorescenza blue.

Dopo maturazione (che avviene nell'ambiente esterno in 5 giorni) contengono due sporocisti, ciascuna con due sporozoiti.

È stata segnalata per la prima volta nel 1979 in Nuova Guinea. È responsabile di enteriti diarroiche (diarrea acquosa intermittente per 10 giorni - 2 mesi). Altri sintomi associati: astenia, vomito, febbre, mialgia.

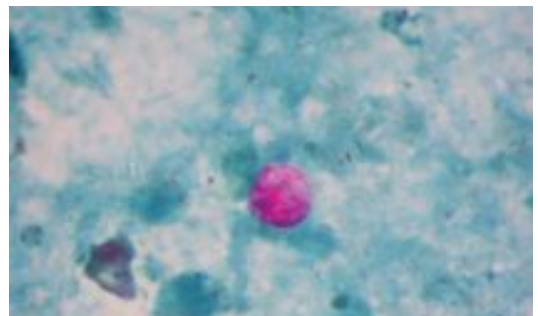
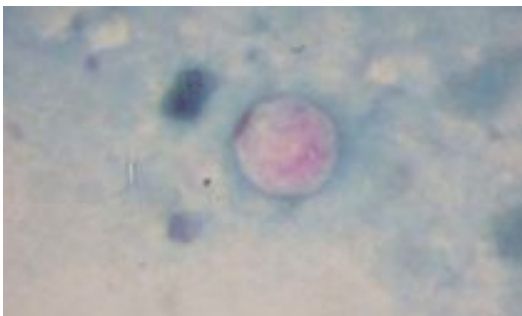
Vie di trasmissione: acqua contaminata, carne cruda o poco cotta. La maturazione delle cisti eliminate con il copros avviene all'esterno in ambiente caldo umido (in Europa si presenta come "diarrea del viaggiatore").



La diagnosi si basa sulla messa in evidenza delle oocisti eliminate con il copros, attraverso le seguenti metodiche:

Metodi diretti

1. **Esame a fresco:** sfere rifrangenti morulate di 8-10 μ
2. **Ziehl-Neelsen mod.:** oocisti colorate, con sfumature di colore, dal rosa pallido al rosso in campo blue verde



Oocisti di *Cyclospora cayetanensis* (Col. Ziehl-Neelsen mod.) 400x

Genere *Sarcocystis*

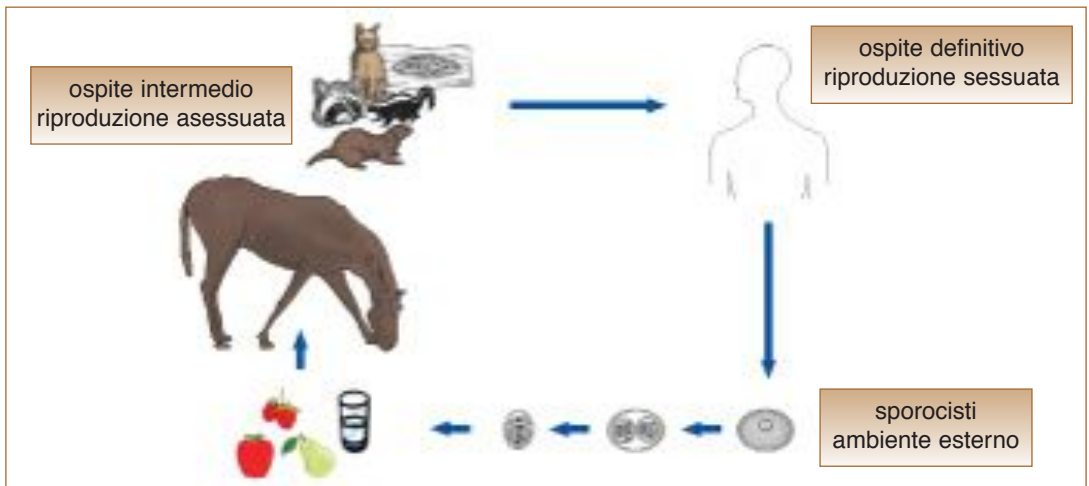
Sarcocystis spp.

Appartengono a questo genere di protozoi numerose specie parassite del muscolo ed altri tessuti di mammiferi, uccelli e rettili. Esistono differenze morfologiche tra le forme cistiche tissutali (sarcocisti) delle diverse specie caratteristiche degli animali parassitati.

Le cisti riscontrate in pecore, conigli e nelle anatre sono macroscopiche, nelle anatre con striature biancastre che assomigliano ai grani di riso, nei conigli sono, invece, più sottili e più prolungate; mentre, quelle riscontrate nei mammiferi (cervi, alci ecc.) sono microscopiche.

Sarcocystis sp. è distribuita in tutto il mondo ed è stata trovata in molte specie di animali domestici (pecore, cavalli, maiali, cani, gatti, conigli, polli) ed in esseri umani. Molte specie della fauna selvatica sono infettate, compreso i cervi, gli alci, i caribù, le anatre, ecc.

Sarcocystis spp.: Ciclo Biologico



Sarcocystis è un protozoo dixeno, svolge il suo ciclo biologico in due distinti ospiti. Nell'ospite definitivo (uomo) avvengono fasi di riproduzione sessuale che portano alla formazione di oocisti e al rilascio con il coproscoria di sporocisti nell'ambiente esterno. Nell'ospite intermedio (ruminanti, suini, bovini, equini), a seguito di ingestione di sporocisti contenute in acque o alimenti contaminati si ha la liberazione dei sporozoiti a livello intestinale, si manifestano fasi di riproduzione asessuata, all'interno delle cellule endoteliali (intestino prima, reni, cuore, SNC poi) con la formazione di merozoiti.

Dopo tre cicli di moltiplicazione schizogonica i merozoiti si localizzano a livello di muscoli, miocardio, SNC e si sviluppano in tachizoiti.

L'organismo ospite reagisce all'infestazione determinando la formazione di sarcocisti contenenti numerosi bradizoiti, protozoi poco mobili, lunghi 12-16 μ e larghi 3-6 μ .

L'ospite definitivo si infetta ingerendo carni parassitate contenenti le sarcocisti.

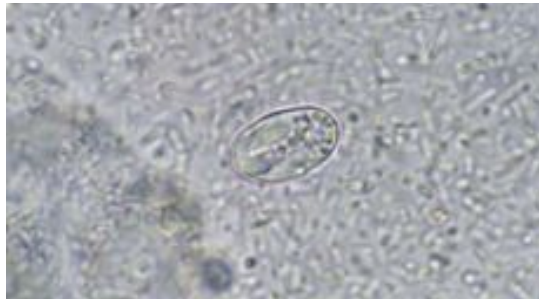
A livello intestinale, i bradizoiti, liberati dalla cisti, vanno incontro a gametogonia e sporulazione con la formazione di oocisti mature.

Dalle oocisti si liberano due sporocisti di 14-16 μ che vengono eliminate con il copros, contaminando l'ambiente esterno.

La diagnosi si basa sulla messa in evidenza delle oocisti eliminate con il copros, attraverso le seguenti metodiche:

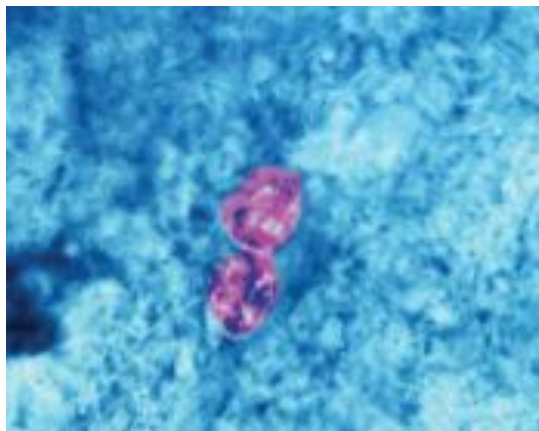
Metodi diretti

1. Esame a fresco: sporocisti rifrangenti di 14-16 μ .



Sporocisti di *Sarcocystis* spp. 200x

• **Ziehl-Neelsen mod.:** oocisti colorate, con sfumature di colore, dal rosa pallido al rosso in campo blue



Oocisti di *Sarcocystis* spp. (Col. Ziehl-Neelsen mod.) 400x

Phylum Microspora

I Microsporidi sono parassiti intracellulari obbligati e sporigeni appartenenti al Phylum Microspora.

Si collocano tra i Procarioti e gli Eucarioti, con forti similarità genetiche con il Regno dei Funghi al quale attualmente vengono attribuiti:

tra i Procarioti perché mancano di mitocondri, lisosomi, apparato di Golgi e posseggono un ridotto rRNA;

tra gli Eucarioti perché posseggono un sistema di membrane nucleari intracitoplasmatiche

I Microsporidi furono identificati per la prima volta nel 1971, quando fu dimostrato che erano i responsabili di numerose infezioni negli animali di laboratorio, spesso inficiando le sperimentazioni.

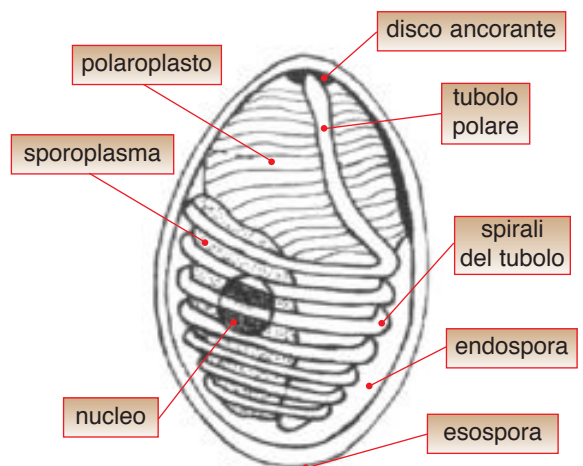
Nel 1990, col diffondersi dell'infezione da immunodeficienza acquisita, furono riconosciuti come responsabili di numerose infezioni umane.

Phylum	Microspora ↓			
Classe	Microsporidiea ↓			
Ordine	Microsporida			
Sottordine	Pansporoblastina ↓	Apansporoblastina ↓		
Genere	<i>Pleistophora</i>	<i>Encephalitozoon</i>	<i>Enterocitooon</i>	<i>Nosema</i>
Specie		<i>cunicoli</i> <i>hellen</i>	<i>bieneusi</i>	<i>connori</i> <i>corneum</i>

Posizione tassonomica dei Microsporidi

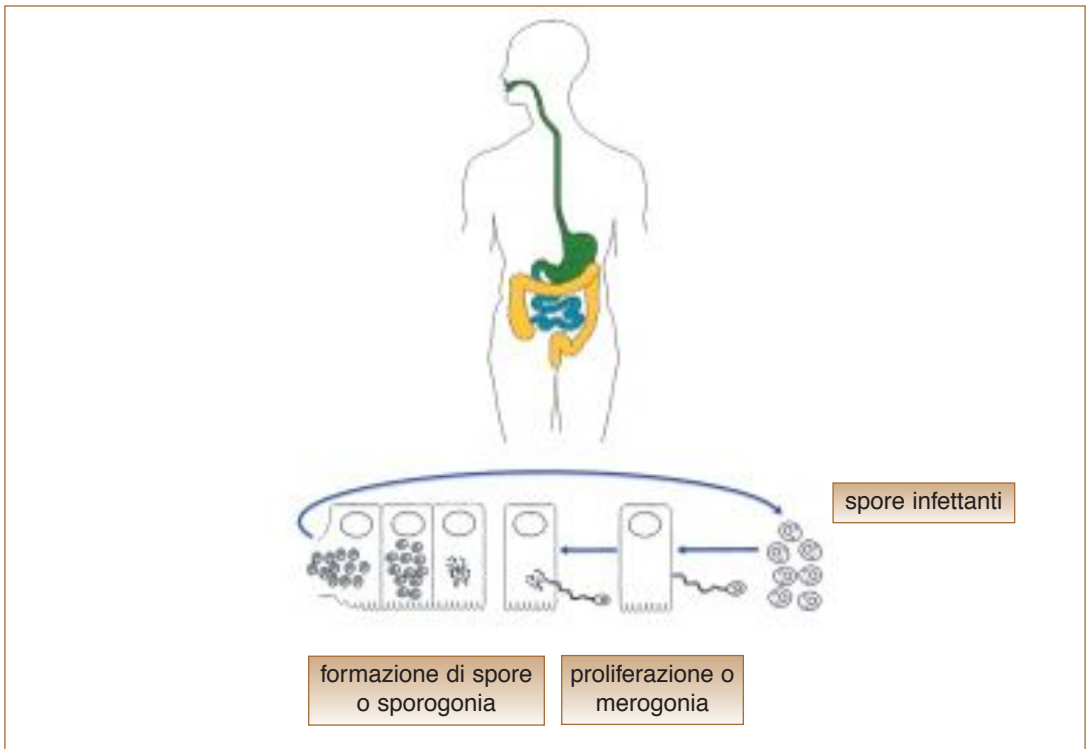
La caratteristica peculiare di questo Phylum è la presenza di un apparato di estrusione o filamento polare; un lungo tubo proteico di 20-25 μ avvolto a spirale all'interno della spora (il numero delle spire è caratteristico di genere) e terminante con un disco di ancoraggio.

Quando la spora giunge a contatto con la cellula ospite il disco di ancoraggio, proiettato all'esterno della spora, aderisce alla membrana della cellula ospite e attraverso il tubulo polare lo sporoplasma viene iniettato nel citoplasma della cellula.



Struttura della spora di Microsporidio

Microsporidi: Ciclo Biologico



Il ciclo biologico dei microsporidi si completa attraverso tre fasi:

1. La fase infettiva include il rilascio, la trasmissione delle spore e l'inoculazione dello sporoplasma (forma infettante), attraverso l'estrusione del tubulo polare, nella cellula ospite.
2. La fase vegetativa o proliferativa, chiamata anche merogonica, in cui il protozoo si moltiplica all'interno della cellula ospite.
3. La fase Sporogonica in cui si formano le spore infette.

Tutte e tre le fasi sono intracellulari e, tra i microsporidi di interesse umano, non c'è evidenza di ospiti intermedi.

Le spore infettive sono cellule semplici ma molto differenziate per trasmettere il materiale infettivo alla cellula ospite con un meccanismo unico: l'apparato di estrusione.

Esse sono rivestite da una spessa parete di natura proteica che riveste un endosporio chitinoso, a ridosso dell'endosporio c'è una membrana plasmatica, e ciò rende le spore molto resistenti all'ambiente esterno.

All'interno della spora c'è il materiale infettivo detto sporoplasma, che può essere uni o binucleato a seconda della specie di microsporidio, e l'apparato di estrusione detto tubulo polare che serve per iniettare lo sporoplasma nella cellula ospite, inoltre un complesso sistema di membrane detto polaroblasto lamellare circonda il tubulo polare e infine è presente un piccolo sistema reticolo endoplasmatico e ribosomi liberi.

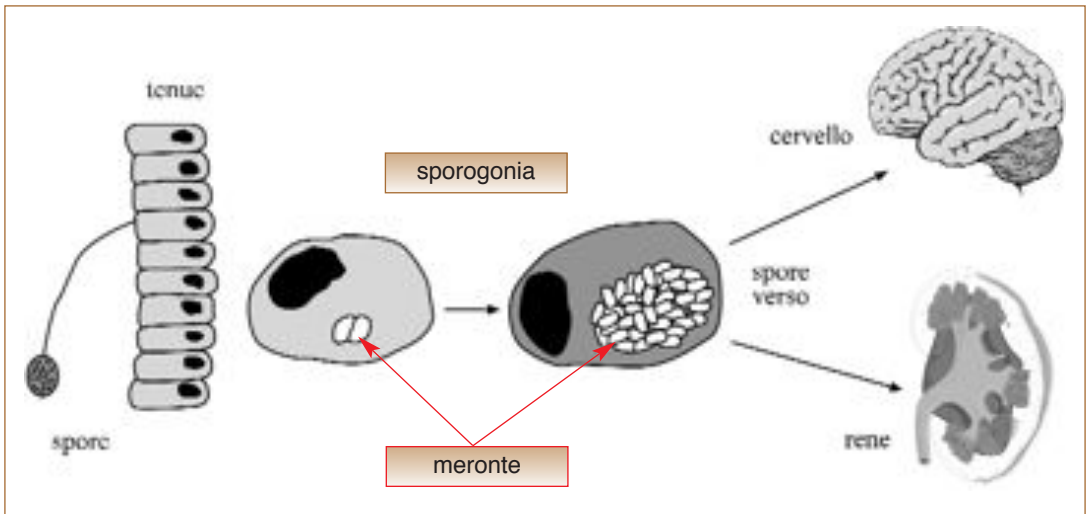
L'apparato di estrusione, costituito dal tubulo polare, giace spiralizzato all'interno

della spora ed è attaccato da un disco di ancoraggio, quando è stimolato provoca l'espulsione dello sporoplasma.

All'interno della cellula ospite lo sporoplasma inizia lo stadio merogonico, cioè la fase vegetativa o proliferativa con la formazione dei meronti. I meronti sono cellule semplici circondate da una singola membrana che si moltiplicano ripetutamente producendo cellule multinucleate.

Quando si forma il rivestimento attorno ad uno o due nuclei del meronte si forma lo sporonte che si moltiplica a sua volta per formare gli sporoblasti i quali alla fine della maturazione sono le spore.

La sporogonia è caratteristica di specie: alcuni microsporidi, come *Enterocytozoon bieneusi*, si sviluppano direttamente nel citoplasma della cellula ospite; altri microsporidi, come *Encephalitozoon e Settata* si sviluppano all'interno di un vacuolo parassitoforo costituito da una membrana originata dalla cellula ospite; infine altri microsporidi, come *Pleistophora*, si sviluppano all'interno di una vescicola, circondata da una spessa membrana, originata dalla stessa spora.



Ciclo biologico all'interno della cellula ospite

L'infezione da microsporidi avviene generalmente per ingestione di alimenti contaminati con copros ed urine infette, (contaminazione oro-fecale), non si esclude, però, una diversa via di trasmissione.

Le spore, emesse con questi ed altri materiali biologici, possono restare vitali nell'ambiente esterno fino a 4 mesi, penetrate nelle nuove cellule ospiti iniziano la fase vegetativa. Il tropismo cellulare varia da specie a specie, essendo stata segnalata la localizzazione dei microsporidi in vari tessuti o organi si può dire che non esiste tessuto che non possa essere colonizzato da questi microrganismi.

I principali criteri per classificare il genere sono:

- Caratteristica del nucleo;
- Contatto diretto della membrana del microsporidio con il citoplasma della cellula ospite;
- Presenza di un vacuolo parassitoforo;
- Numero di spire attorno al tubulo polare (tubo proteico di 20-25 μ che avvolge lo sporoplasma);
- Sporogonia.

In base a queste caratteristiche i generi di microsporidi che interessano l'uomo sono:

- *Enterocytozoon bienewisi*
- *Encephalitozoon* spp.
- *Septata intestinalis*
- *Nosema* spp.
- *Pleistophora* spp.

• ***Enterocytozoon bienewisi***

Descritto per la prima volta nel 1985 da Desportes parassita gli enterociti del tenue dei soggetti infetti da HIV, provocando diarrea cronica.

La localizzazione, di questo microsporidio, è all'apice dei villi dell'intestino tenue, in particolare duodeno e digiuno, in posizione intracitoplasmatica soprannucleare;

La sporogonia si conclude con la formazione di diverse spore (polisporica) direttamente nel citoplasma della cellula ospite. L'organismo è mononucleato e nelle prime fasi di sviluppo il nucleo è allungato;

Le spore hanno dimensioni di 0.7-0.9 μ x 1.0-1.6 μ ,

Il tubulo polare è costituito da 5-7 spire disposte in doppia fila.

• ***Encephalitozoon* spp.**

Descritto per la prima volta da Wright e all. nel 1922 che lo isolò dai conigli.

Parassita diversi mammiferi e uccelli.

La localizzazione è nei macrofagi, nelle cellule epiteliali di molti tessuti, cervello, rene, cornea e congiuntiva, in cui si sviluppa in un vacuolo simile ad un fagosoma, la cui membrana è formata dalla cellula ospite.

Il nucleo è singolo per tutto il ciclo vitale

Le Spore hanno dimensioni di 2-2.5 μ x 1.0-1.5 μ .

Sono presenti 2 spore per ciascuno sporonte.

Il tubulo polare è costituito da 5-7 spire disposte in unica fila.

Presenta il vacuolo parassitoforo.

- ***Nosema spp.***

Le specie di microsporidi appartenenti al genere *Nosema* sono diverse e possono provocare manifestazioni cliniche differenti a seconda del genotipo parassitario e dello stato di immunocompromissione dell'ospite.

N. connori può causare infezioni disseminate nei soggetti con deficit immunitario congenito

Le spore posseggono due nuclei, misurano 2-2,5x4-4,5 μ e contengono un tubulo polare con 11 spire.

N. corneum è in grado di causare cheratiti in soggetti sani quindi si localizza nelle cellule della congiuntiva e della cornea;

- presenza di 2 nuclei per singola spora;

- 2 spore di 1 μ x 3-3,7 μ per ogni sporonte;

- Il tubulo polare è avvolto da circa 6 spire;

- contatto diretto tra il protozoo e la cellula ospite.

- ***Septata intestinalis***

Descritta e classificata nel 1993 da Cali e coll. è stata isolata esclusivamente da pazienti infetti da HIV, che presentano diarrea acquosa persistente con 8-10 scarse/die.

I parassiti si localizzano negli enterociti dell'apice dei villi duodenali, nel citoplasma dei macrofagi della lamina propria e nell'epitelio della vescica.

Le spore di questa specie possono essere mono-bi-tetranucleate e la sporogonia, che avviene in vacuoli parassitofori, porta alla formazione di 4 spore.

La peculiarità di questa spora è che appare divisa in setti da una rete fibrillare che viene secreta dal protozoo e che circonda la spora in via di sviluppo.

- La sporogonia avviene, quindi, entro vacuoli parassitofori settati.

- le spore, mature, misurano 1.0 μ x 2 μ .

- Il tubulo polare è costituito da 5-7 spire disposte in una fila.

- ***Pleistophora spp.***

Parassita insetti e vertebrati principalmente pesci.

Il genere *Pleistophora* è stato assegnato ad un sottordine diverso dai microsporidi precedenti (Pansporoblastina) in quanto caratterizzato da una spora racchiusa da una membrana al sottordine Pansporoblastina in quanto è caratterizzata da una spora racchiusa da una membrana pansporoblastica, molto spessa e amorfa che viene prodotta dal protozoo stesso e che viene detta vescicola sporofora.

La localizzazione elettiva è nelle cellule muscolari di pazienti infetti da HIV, con miosite.

La spora contiene un unico nucleo; la sporogonia produce diverse spore per sporonte.

- Le spore misurano 2.8 μ x 3.2 μ .

- Il tubulo polare è costituito da 8-12 spire.

- La sporogonia, avviene in un vacuolo parassitoforo.

Le manifestazioni cliniche sono diverse a secondo del genere di microsporidio: *Enterocytozoon bieneusi*, solitamente, provoca diarrea, colecistiti, colangiti, bronchiti, polmoniti, sinusiti e riniti.

Encephalitozoon spp, provoca epatiti fulminanti, peritoniti, infezioni disseminate, cheratocongiuntiviti, sinusiti, meningiti e polmoniti.

Septata intestinalis, provoca diarrea e infezioni disseminate.

Nosema spp., provoca cheratite ed infezioni disseminate.

I microsporidi quindi, possono provocare patologie, in soggetti infetti da HIV, in diversi tessuti. Abbiamo quindi infezioni oculari, intestinali, urinarie, respiratorie e meningee.

Pertanto il campione biologico da inviare al laboratorio per la ricerca dei microsporidi è costituito da:

- Tampone congiuntivale e scraping corneale
- Copros fissato in formalina al 10% o aspirato duodenale
- BAL (Liquido di lavaggio broncoalveolare)
- Urine che verranno centrifugate a 7000 giri per 10' per l'esame del sedimento
- Liquor che verrà centrifugato a 2000 giri per 10' per l'esame del sedimento.

Dai sedimenti, ottenuti da tutti questi campioni biologici, si allestiscono diversi strisci, su vetrini portoggetto, in modo da ottenere bande sottili alternate a bande spesse. I vetrini così preparati, si lasciano asciugare a temperatura ambiente e si procede alle colorazioni specifiche.

La diagnosi di laboratorio si basa sull'esame del materiale biologico, sede dell'infezione, opportunamente colorato.

Metodi diretti

1. Colorazione tricromica di Weber
2. Calcofluor
3. Colorazione di Giemsa

La diagnosi di specie esula dalle competenze di un laboratorio di Parassitologia, essendo basata sull'esame in microscopia elettronica del materiale, osservando il numero di spire, la presenza del vacuolo parassitoforo e le dimensioni della spora.

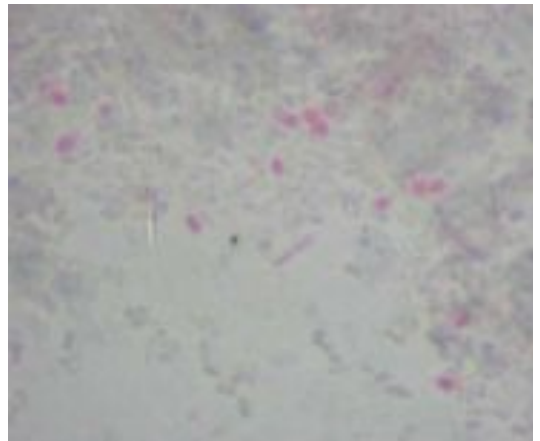
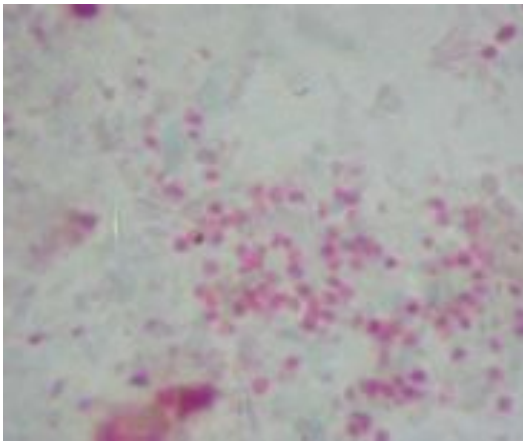
1. La colorazione Tricromica di Weber

Indispensabile per la sicura identificazione, la cui procedura è illustrata dettagliatamente nel capitolo generalità.

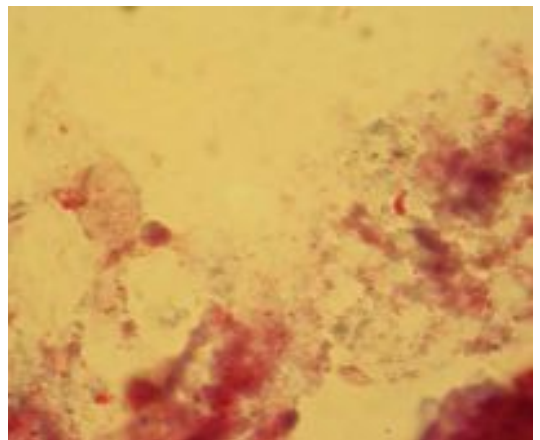
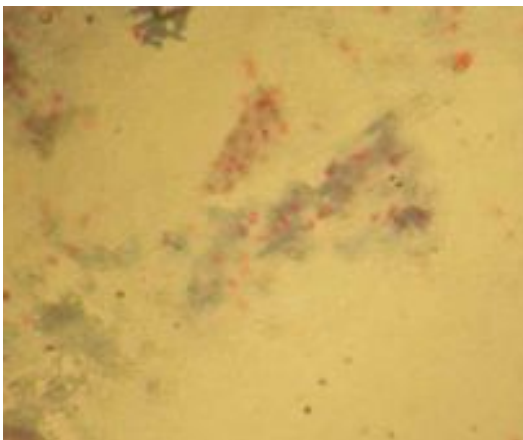
Interpretazione

Leggere il preparato a 100x con un obiettivo ad immersione.

Le spore dei microsporidi appaiono come corpi rotondeggianti di 0.8-2 μ di diametro, di color rosa, contenenti un nucleo più scuro; talvolta nel citoplasma si osserva un'area incolore.



Spore di Microsporidi (Col. di Weber) 1000x



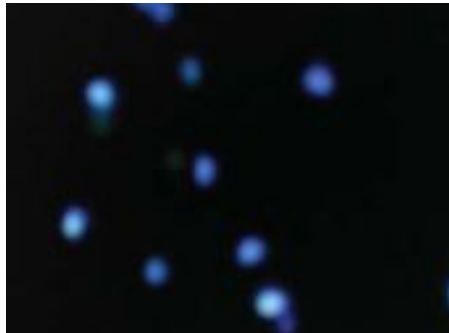
Spore di Microsporidi (Col. di Weber) 1000x

2. Calcofluor (Fluorescent brightener)

- Deporre su vetrino, con pozzetto, 20µl di sedimento di copros
- Fissare in metanolo per 10'
- Colorare con Calcofluor (CFW 0,001% in PBS Ph 7.2) per 30'
- Lavare con acqua distillata
- Disidratare.

Montare con glicerina tamponata ed osservare al microscopio a fluorescenza, con filtro da 340-380 nanometri, con obiettivo 100x.

Le spore appariranno azzurro-verdi su fondo nero.



Spore di Microsporidi (Col. calcofluor) 1000x

3. Giemsa

La colorazione di Giemsa non è adatta per il campione di copros in quanto diventa difficile, date le dimensioni delle spore e la quantità di batteri solitamente presenti nel campione, riuscire ad identificare le spore dei microsporidi.

È utile, invece, sui campioni biologici di altri distretti, come scraping corneale, liquor, biopsati ecc., che essendo materiale in genere privo di batteri rende possibile il riscontro delle spore di microsporidio.

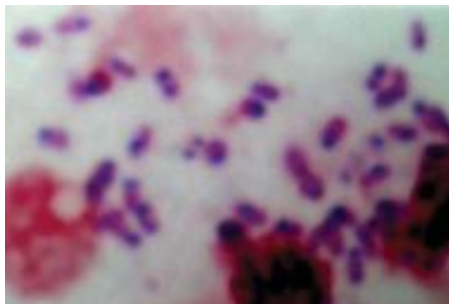
Il sedimento del campione biologico viene strisciato su vetrino.

Fissare in metanolo per 3-5'.

Colorare, con Giemsa diluito 1/10, per 30'.

Lavare ed osservare al microscopio ottico con obiettivo 100x.

Le spore appariranno blu scuro-violetto.



Spore di Microsporidi (Col. Giemsa) 1000x

Refertazione e registrazione dei risultati

Ogni campione di copros ha la presunzione di essere refertato “negativo” salvo dimostrare con assoluta certezza il contrario. Nel copros vi sono numerosi elementi di diversa natura che possono essere confusi con trofozoiti e cisti di protozoi; le spore fungine, lieviti, cristalli di acidi grassi, amidi e leucociti possono essere confusi rispettivamente con cisti di *Giardia*, *Cryptosporidium* e varie amebe.

La certezza di quanto si va a refertare viene dalla esperienza acquisita con una buona pratica microscopica e la consapevolezza che un protozoo **deve** rispondere alle caratteristiche morfologiche e di grandezza descritte per ciascuno, nei casi dubbi si deve richiedere ed esaminare un altro campione di copros.

Nel caso di positività la refertazione deve essere espressa con la massima chiarezza, ricorrendo il meno possibile a sigle ed abbreviazioni che possono lasciare dubbi interpretativi.

È utile, ai fini della eventuale terapia, segnalare al clinico anche la quantità dei protozoi riscontrati nel campione utilizzando le dizioni: rari, alcuni, numerosi, specificando, chiaramente, se si tratta di trofozoiti o cisti o ambedue.

Sul referto viene anche descritto il metodo che è stato utilizzato per effettuare la ricerca parassitologia.

I risultati devono essere controllati prima della refertazione e della consegna sia dall'esecutore dell'esame che dal responsabile dell'equipe.

È utile riportare nelle note anche la eventuale presenza di emazie, leucociti, cristalli di Charcot-Leyden e spore di miceti, che possono aiutare il clinico sulle possibili altre indagini da effettuare.

L'archiviazione dei risultati ottenuti deve essere eseguita con adeguato sistema informatico; la registrazione informatizzata consente di ricavare statistiche sui parassiti identificati, sui tempi di esecuzione degli esami, sui costi dei materiali utilizzati, ecc.

Capitolo II

La febbre è il sintomo più comune della presenza nel sangue di microrganismi patogeni. Le cause sono numerosissime, in primo luogo sono da considerare, come causa di febbre, le comuni infezioni cosmopolite, come quelle delle vie aeree e urinarie, poi le sepsi di natura batterica e virale, poi le infezioni endemiche di alcune aree geografiche, in cui il paziente osservato, può essersi recato a scopo di lavoro o turismo, o dalle quali il paziente proviene.

In caso di febbre, l'approccio diagnostico comporta innanzitutto una raccolta scrupolosa della anamnesi con precise indicazioni riguardanti il paese di origine, se si tratta di immigrato e da quanto tempo soggiorna nel nostro paese. Se si tratta di turista, invece, bisogna raccogliere notizie sulle regioni visitate, la durata dei soggiorni, le caratteristiche dei luoghi frequentati (se rurali o urbani) e le attività svolte.

Con un attento esame obiettivo vanno ricercati i segni o sintomi più significativi, come le caratteristiche della febbre, la presenza di esantema, la splenomegalia, l'epatomegalia, la linfoadenopatia ecc.

Un primo orientamento si può avere con l'interpretazione dei dati di laboratorio routinari; l'emocromo, le indagini di chimica, l'esame delle urine, la radiografia consentiranno di poter suggerire eventuali accertamenti specifici (batteriologici, parassitologici e virologici).

L'allestimento dei preparati, per l'esame parassitologico, è diverso a seconda dei parassiti da ricercare e dalla opportunità di concentrazione dei parassiti stessi.

Per quanto riguarda il sangue si effettuano, di norma, 4 preparazioni:

- **Esame a fresco:** si esegue osservando al microscopio una goccia di sangue, prelevata dal polpastrello, posta su un vetrino portaoggetti e coperta da un vetrino coprioggetto.
Con questo metodo si evidenziano parassiti mobili come ad es. i tripanosomi.
- **Striscio sottile:** si esegue prelevando dal polpastrello una piccola quantità di sangue che viene posta al margine del vetrino portaoggetti, utilizzando un altro vetrino, mantenendo un angolo di 45°, si fa scorrere la goccia di sangue lungo il bordo del vetrino, spingendo in avanti con movimento fermo, si lascia asciugare e si colora.
- **Goccia spessa:** si esegue per concentrare i parassiti che potrebbero essere in numero limitato nel campione da analizzare.
Si prepara ponendo su un vetrino una piccola goccia di sangue, prelevata dal polpastrello, che viene defibrinata ruotando con lo spigolo di un altro vetrino per qualche minuto ed allargando la goccia fino ad un diametro di 1-2mm., si lascia asciugare per 24h e si colora.
- **Esame del leucoconcentrato (buffy-coat):** si esegue centrifugando a 3000 giri per 10-15 minuti il sangue, prelevato in una provetta con EDTA, in modo da ottene-

re la separazione del plasma dagli eritrociti, fra le due fasi si dispongono i leucociti e in caso di positività i tripanosomi.

Con questo materiale si allestisce uno striscio e una goccia spessa per le colorazioni specifiche.

Per quanto riguarda i tessuti si effettua:

- **Esame dell'aspirato midollare, linfonodale e splenico:** si esegue aspirando con una siringa particolare, attraverso la cresta iliaca, il midollo, o aspirando dal linfonodo o dalla milza attraverso una osservazione ecoguidata.

Il materiale prelevato viene in parte strisciato su 2-3 vetrini portaoggetti, per le colorazioni specifiche, in parte posto in provetta con EDTA, per le colture.

RACCOLTA DEL CAMPIONE

In genere, il momento più favorevole, per il prelievo di sangue da analizzare per la ricerca dei parassiti, è quello in cui si ha l'aumento della temperatura corporea, fase del brivido, in questa fase è più facile evidenziare nel campione tripanosomi e babesie. In caso di malaria, invece, l'aumento della temperatura corporea corrisponde alla distruzione degli eritrociti parassitati e quindi alla messa in circolo dei merozoiti che, dopo 1-2h, vanno a parassitare nuove emazie, pertanto il momento più favorevole, per il prelievo di sangue periferico, è dopo 1-2h dall'accesso febbrile.

La ricerca del parassita malarico si impone sempre al minimo sospetto anamnestico e clinico anche in assenza di febbre, se il soggetto in esame proviene da zone di endemia. In caso di negatività della ricerca microscopica, si impone un controllo dopo, l'eventuale, accesso febbrile.



Prelievo di sangue periferico

RICERCA ED IDENTIFICAZIONE DEI PROTOZOI

È questa la fase più importante e delicata dell'attività del parassitologo.

È necessario analizzare i seguenti punti:

- Tempi di osservazione dei preparati
 - Metodo di osservazione dei campioni al microscopio
 - Schemi e tavole iconografiche dei parassiti
 - Allestimento di preparati stabili
 - Risoluzione dei casi dubbi
 - Capacità professionale dei componenti dell'equipe
-
- Tempi di osservazione dei preparati
I tempi di osservazione, al microscopio, dei campioni preparati devono essere prolungati, specialmente nella ricerca di parassiti che sono patogeni anche se presenti in bassa concentrazione nei campioni biologici (trofozoiti, schizonti e gametociti di plasmodi malarici, amastigoti di *Leishmania* in biopsie di midollo osseo ed aspirati splenici, ecc.).
-
- Metodo di osservazione dei campioni al microscopio
Il metodo di ricerca, al microscopio, deve essere aggiustato in base alla grandezza del protozoo da ricercare: la ricerca di *Plasmodium* e di *Leishmania* richiede l'utilizzo dell'obiettivo 100x.
-
- Schemi e tavole
Durante la lettura del preparato al microscopio è fondamentale avere a disposizione tavole e schemi riportanti le caratteristiche morfologiche dei parassiti per consentire una valutazione corretta dei preparati osservati.
-
- Allestimento di preparati stabili
È fondamentale, allestire, dal campione biologico da analizzare, diversi preparati stabili: strisci per colorazioni permanenti, e alcune gocce spesse.
L'allestimento dei preparati stabili è utile, non solo a scopi didattici, specialmente per i parassiti di non frequente riscontro, che possono, così, essere conservati a lungo ed osservati periodicamente, ma anche perché gli strisci e/o le gocce spesse su cui è stata fatta diagnosi di malaria, tripanosomiasi e leishmaniosi devono essere conservati per 3 anni.
I casi positivi, di queste patologie, vengono notificati dalle Autorità Sanitarie regionali al Dipartimento della Prevenzione del Ministero della Salute con l'invio della scheda di notifica standard (contenente dati demografici, epidemiologici, clinici e parassitologici) e i vetrini su cui è stata effettuata la diagnosi possono essere richiesti dall'Istituto Superiore di Sanità per la conferma delle diagnosi dei casi denunciati.

- Risoluzione dei casi dubbi

È utile stabilire contatti con centri di riferimento riconosciuti per risolvere dubbi interpretativi. Talora può essere necessario inviare campioni e/o preparati stabili a tali centri per avere conferma di una diagnosi difficile, o per tipizzare il protozoo isolato in coltura (Coltura di *Leishmania*, *Trypanosoma*).

- Capacità professionale dei componenti dell'equipe

La diagnostica parassitologica è fondata prevalentemente sull'individuazione e sul riconoscimento microscopico dei parassiti nei materiali biologici.

L'attività lavorativa del Parassitologo è, perciò, in gran parte dedicata all'osservazione microscopica dei preparati, **pertanto il Parassitologo deve, necessariamente, conoscere il ciclo biologico e le modalità di trasmissione dei protozoi, che hanno grande importanza per la scelta, il trattamento, le modalità di invio del campione biologico e deve, necessariamente, conoscere la morfologia, la grandezza e le affinità tintoriali del protozoo da ricercare.**

Nel sangue i protozoi responsabili di processi patologici nell'uomo sono:

- Plasmodi della malaria
- Babesie, Theilerie
- Tripanosomi africani
- Tripanosomi americani

Nei tessuti ricchi di macrofagi (midollo osseo, milza e linfonodi):

- Leishmanie

Phylum	Apicomplexa					
Classe	Sporozoa					
Sottoclasse	Coccidiasina					Piroplasmata
Ordine	Eucoccidiorida					Piroplasmata
Sottordine	Eimeriorina				Haemosporina	
Famiglia	Eimeriidae	Cryptosporidiidae	Sarcocystidae		Plasmodiidae	Babesiidae
Genere	<i>Isospora</i>	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Sarcocystis</i>	<i>Toxoplasma</i>	<i>Plasmodium</i>	<i>Babesia</i>
Specie	<i>belli</i>	<i>parvum</i>	<i>hominis</i>	<i>gondii</i>	<i>falciparum</i>	<i>microti</i>
		<i>bayleyi</i>	<i>lindemanni</i>		<i>vivax</i>	
			<i>suihominis</i>		<i>ovale</i>	
					<i>malanae</i>	

Posizione tassonomica dei plasmodi

Generalità

L'infezione da plasmodi (nell'uomo nota come malaria) è una parassitosi molto antica da un punto di vista evolutivo, lo testimonia l'esistenza di più di cento specie di plasmodi malarici che si sviluppano in un elevato numero di ospiti vertebrati, quali rettili, uccelli, scimmie e uomo.

Già diversi secoli a.C., gli Assiri, gli Egizi, gli Indiani e i Cinesi avevano descritto nei loro testi febbri intermittenti che oggi si possono ricondurre ad attacchi malarici; nel 5° secolo a.C., Ippocrate aveva associato l'insorgenza delle febbri con le stagioni e i luoghi malsani. Probabilmente la malaria ha avuto origine in Africa e si è distribuita da lì ad altre regioni calde, seguendo gli spostamenti dell'uomo verso l'area mediterranea, fino alla Mesopotamia, alla Penisola Indiana e al Sud-Est Asiatico.

I parassiti malarici si sono evoluti dai protozoi Coccidi sviluppando un adattamento dai tessuti degli organi interni alle cellule del sangue.

La successiva tappa evolutiva è stata la trasmissione di questi parassiti da un ospite all'altro per mezzo di insetti ematofagi, quali le zanzare.

La malaria è considerata una delle malattie emergenti più diffuse nel mondo. Nelle aree tropicali e subtropicali rappresenta una delle prime cause di morbosità e mortalità. Ma l'endemia malarica è presente anche in zone temperate quali la Turchia e i Paesi transcaucasici dell'ex Unione Sovietica. La popolazione mondiale che vive in aree a rischio rappresenta il 42% dell'umanità e l'Organizzazione Mondiale della Sanità stima che l'incidenza globale della malaria sia dell'ordine di 300-500 milioni di casi per anno, con più di un milione di decessi. La situazione è particolarmente grave nell'Africa sub-sahariana, che da sola contribuisce con oltre due terzi dei casi totali di malaria nel mondo. In Italia nel XIX secolo la malaria era molto comune ed era presente in buona parte delle aree costiere del Paese. Nel 1844 la prevalenza di questa parassitosi raggiungeva il 70%, nell'immediato dopoguerra, vennero realizzate delle grandi opere di boni-

fica integrale e dei programmi di sviluppo agricolo che riducevano i focolai larvali dei vettori e venne sperimentato per la prima volta il DDT (diclorodifeniltricloroetano) nella lotta antianofelica.

Gli eccellenti risultati ottenuti in studi pilota, condotti, in Italia centrale, prima dall'esercito degli Stati Uniti e poi dall'Istituto Superiore di Sanità, portarono alla definizione di un programma quinquennale di lotta contro la malaria, basato su un singolo ciclo di trattamenti murali con 2 g di DDT per metro di tutti i fabbricati presenti nelle zone di endemia.

La campagna iniziò nel 1947 e, nel breve arco di un anno, portò all'interruzione della trasmissione della malaria da *P. falciparum* su tutto il territorio nazionale. Il periodo 1948-1950 è dunque caratterizzato da un rapido "crollo" della morbosità. L'ultimo focolaio endemico di *P. vivax* fu riportato a Palma di Montechiaro (AG) nel 1956, seguito da pochi casi sporadici nel 1962, sempre in Sicilia, in provincia di Palermo. Il 17 novembre 1970 l'organizzazione Mondiale della Sanità incluse ufficialmente l'Italia tra le nazioni libere da malaria. Da allora quasi tutti i casi di malaria registrati nel nostro Paese sono stati casi di importazione, cioè contratti all'estero in zone di endemia.

Nel 1997, in provincia di Grosseto, si è verificato un caso di malaria autoctona trasmesso da vettori indigeni, cioè vettori presenti nel nostro territorio, il primo e unico dopo l'eradicazione della malaria dal nostro Paese.

Distribuzione geografica

Nell'uomo la malaria è causata da 4 specie di parassiti del genere *Plasmodium*:

- *P. falciparum*: la specie più diffusa nella zona tropicale e subtropicale,
- *P. vivax*: specie prevalente in zone temperate, ma presente anche in zone tropicali e subtropicali,
- *P. ovale*: presente principalmente in Africa tropicale, ma anche nel Pacifico,
- *P. malariae*: non uniformemente diffuso, con una frequenza molto bassa, nelle stesse zone di *P. falciparum*.



■ La distribuzione della malaria nel mondo

Il vettore

I plasmodi umani sono trasmessi da alcune specie di zanzare femmine del genere *Anopheles*, che appartengono al

- Phylum Artropoda
- Subphylum Mandibulata
- Classe Insecta
- Ordine Diptera
- Sottordine Culicidae
- Genere *Anopheles*



Il vettore: *Anopheles* spp.

Le zanzare in grado di infettare l'uomo presentano:

- Antropofilia
- Apparato boccale specializzato
- Puntura obliqua con appoggio delle zampe anteriori e mediane distensione di quelle posteriori

I plasmodi sono parassiti intracellulari obbligati, dicensi, in quanto compiono il loro ciclo biologico in due ospiti distinti:

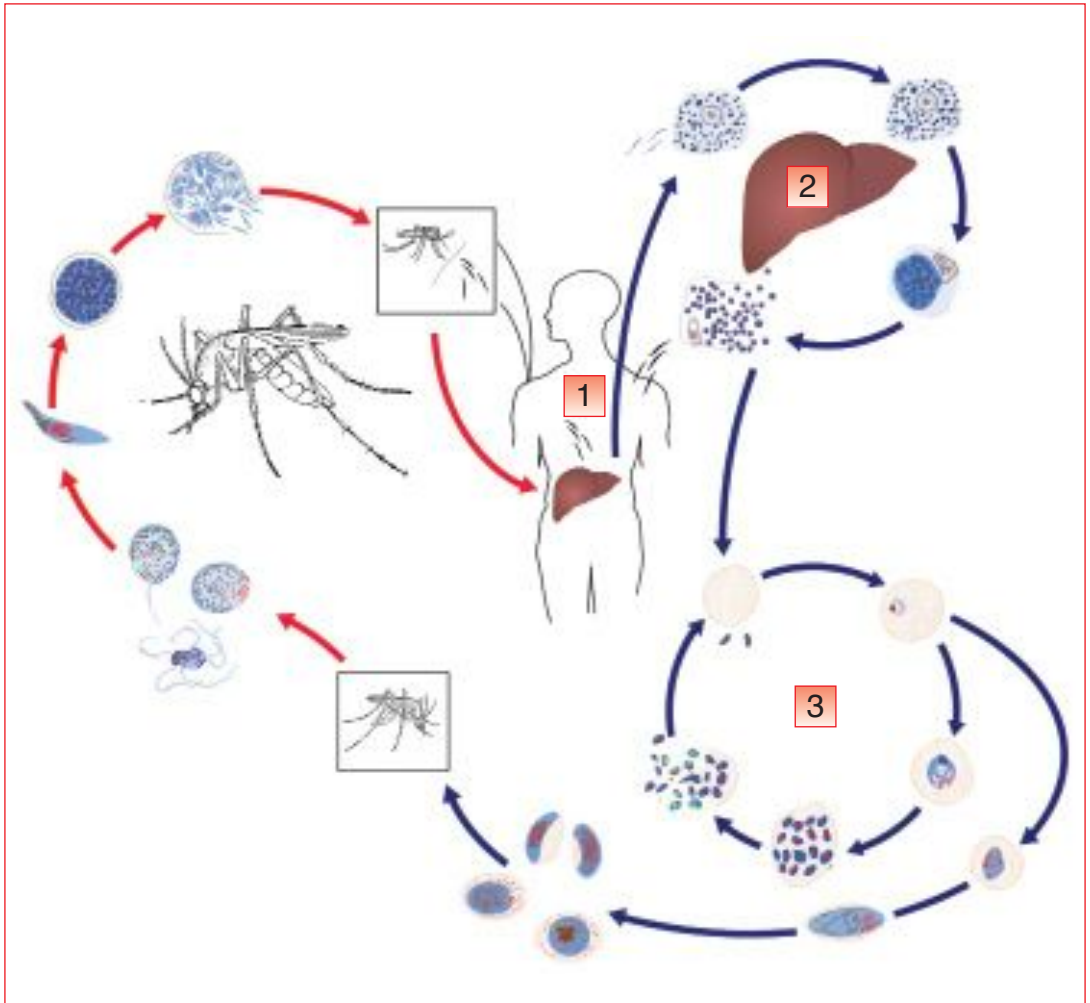
- l'uomo (ciclo asessuato o schizogonico)
- la zanzara (ciclo sessuato o sporogonico)



Uomo: ospite intermedio

Zanzara: ospite definitivo

Plasmodium spp.: Ciclo Biologico



Nell'uomo il ciclo comincia quando gli sporozoi maturi (12 – 15 μ) vengono iniettati con la saliva della zanzara ematofaga infetta, punto 1) della figura del ciclo biologico.

Dopo circa 1 ora gli sporozoi raggiungono il fegato, ne invadono il parenchima ed ha inizio la **Fase di moltiplicazione intraepatica**, che costituisce anche la fase di incubazione della malattia, non essendo ancora presenti, nel paziente parassitato i segni clinici tipici dell'infezione, punto 2) della figura (fase schizogonica esoeritrocitaria). Dopo 5 – 11 gg, a seconda della specie considerata, i parassiti abbandonano il fegato, entrano nel torrente circolatorio e invadono i globuli rossi dando inizio alla **Fase di moltiplicazione intraeritrocitaria**, che costituisce anche la fase clinicamente evidenziata della malattia, punto 3) della figura (fase schizonica eritrocitaria).

Fase intraepatica

La moltiplicazione della maggior parte degli sporozoiti negli epatociti porta alla formazione di grossi schizonti contenenti migliaia di merozoiti mononucleati, questi ultimi sono caratterizzati dalla presenza di un complesso apicale rigido, il conoide, che permette la penetrazione nei globuli rossi, cellule bersaglio per la replicazione schizogonica.

Con una modalità lineare procede l'infezione di *P. falciparum*, perché simultaneamente tutti i merozoiti raggiungono la maturazione nel fegato e invadono il torrente ematico.

Per *P. vivax* e *P. ovale* si osserva un andamento diverso, alcuni sporozoiti penetrati negli epatociti si trasformano in una forma quiescente, l'ipnozoita, che dopo un periodo di latenza variabile, mesi o anni, riprende a svilupparsi in schizonti epatici, costituendo così la vera fonte delle recidive, ripresa cioè delle manifestazioni cliniche della malattia dopo mesi dall'attacco primario.

P. malariae, può dare origine a recrudescenze anche a distanza di anni.

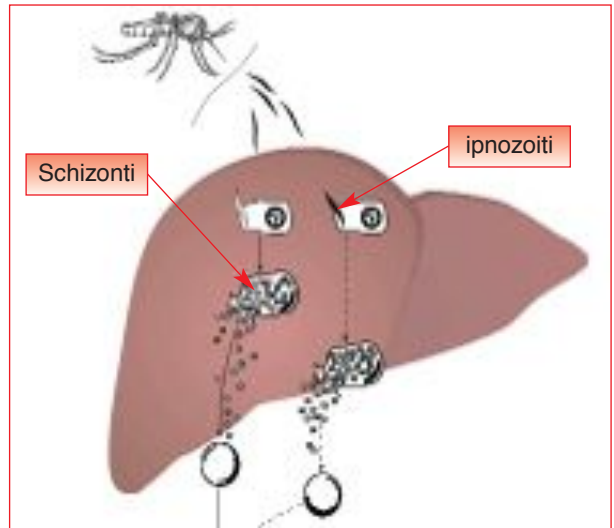
Fase eritrocitaria

I merozoiti, dopo la prima fase intraepatica, che caratterizza l'incubazione della malattia, lasciano il fegato e invadono il sangue.

La penetrazione dei merozoiti nei globuli rossi è dovuta al riconoscimento di particolari recettori di superficie. Dopo l'invasione i parassiti si trasformano in trofozoiti ameboidi, mononucleati, con un grosso vacuolo digestivo e attiva sintesi di DNA. Si accrescono metabolizzando, per glicolisi anaerobica, il glucosio del sangue utilizzando ATP e fattori di crescita presenti nell'eritrocita.

Un pigmento ferroporfirinic, emozoina, si accumula in forma granulare nel citoplasma dei parassiti. Il trofozoite si accresce occupando quasi tutto l'eritrocita, diminuisce il vacuolo digestivo e si trasforma in schizonte andando incontro a una serie di divisioni binarie del nucleo.

I nuovi nuclei, in numero da 6 a 32 a seconda della specie, si dispongono a rosetta. A questo punto l'eritrocita si gonfia ed esplosa, liberando i merozoiti che vanno ad infettare altri eritrociti dando origine a cicli addizionali di schizogonia.



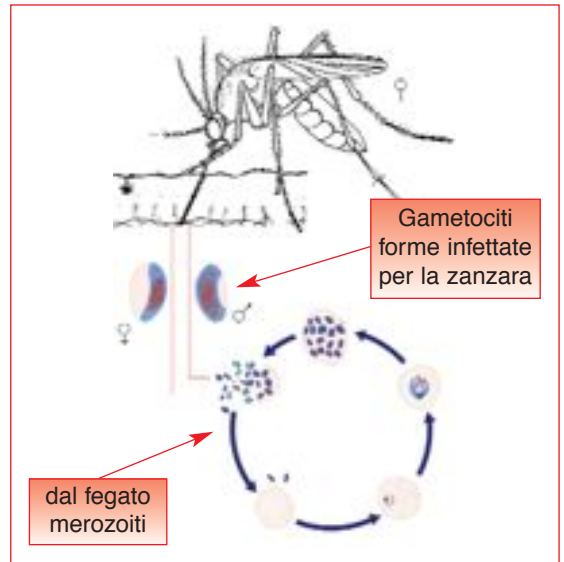
Ciclo biologico intraepatico

Il pigmento viene fagocitato dai leucociti e dalle cellule epiteliali depositandosi soprattutto nella milza e nel midollo osseo.

Lo sviluppo dei parassiti è generalmente sincrono e perciò la rottura dei globuli rossi è simultanea provocando il parossismo malarico con febbre, brividi, e sudorazione associate al rilascio di tossine da parte del parassita.

Tale parossismo si ripete periodicamente dopo tempi corrispondenti alle velocità del ciclo schizogonico nelle differenti specie e precisamente:

ogni **48 ore** per *P. falciparum* (terzana maligna), *P. vivax* (terzana benigna), e *P. ovale*; ogni **72 ore** per *P. malariae* (quartana).



Ciclo biologico intraeritrocitario

Quindi all'interno dell'emazia, i plasmodi assumono le seguenti forme:

- Trofozoiti giovani: forme ad anello o ameboidi
- Trofozoiti anziani
- Schizonti
- Merozoiti
- Gametociti

Dopo vari cicli schizogonici ematici alcuni merozoiti danno origine alle forme sessuate del parassita, i gametociti, i quali aumentano gradualmente di volume senza subire divisioni nucleari. Il genoma aploide del merozoita può originare sia gametociti femminili (macrogametocita) che maschili (microgametocita) che rimangono avvolti dalla membrana dell'eritrocita.

La produzione dei gametociti segue ritmi circadiani per poter infettare le zanzare, coincidendo con il periodo di attività del vettore.

Classificazione dei casi di malaria in aree non endemiche

I casi di malaria sono classificati secondo la provenienza in accordo con la terminologia adottata dall'Organizzazione Mondiale per la Sanità:

un caso di malaria è **'importato'** se l'infezione è stata acquisita al di fuori della zona in cui viene diagnosticata, mentre è definito **'autoctono'** se l'infezione è stata acquisita localmente.

I casi autoctoni, a loro volta, si definiscono come:

1. Indotti, se dovuti a trasfusione sanguigna (malaria trasfusionale) o a un'altra forma di inoculazione parenterale (scambi di siringa tra tossico dipendenti o eventi accidentali);

2. Introdotti, se, diversamente, associati alla puntura di una zanzara. Se la zanzara è stata accidentalmente importata da zone di endemia può dare origine a un caso di malaria definito "aeroportuale" o "da bagaglio", a seconda se il caso si sia manifestato in prossimità di un aeroporto internazionale o altrove; se la zanzara è, invece, indigena può dare origine ad un caso secondario di malaria dopo essersi infettata su un portatore di gametociti proveniente dall'estero.

3. Criptici, se i casi di malaria autoctona sono contratti con modalità non definibili dall'inchiesta epidemiologica.

Forme di resistenza alla malaria

Recettori di superficie e fattori interni, associati per lo più ad anomalie genetiche del globulo rosso possono determinare una resistenza naturale alla malaria.

Un esempio del primo gruppo sono popolazioni africane Duffy negative resistenti a *P. vivax*; l'antigene eritrocitario Duffy, è il recettore attraverso il quale i merozoiti di *P. vivax* penetrano nel globulo rosso, pertanto gli eritrociti che non hanno questo antigene (Duffy negativi) sono refrattari all'infezione da parte di questo plasmodio. In Africa occidentale, una mutazione che elimina l'antigene dalla superficie degli eritrociti ma che non ha altre conseguenze cliniche ha raggiunto (probabilmente in varie migliaia di anni) la frequenza del 100% e quindi la maggior parte degli abitanti dell'Africa centrale e occidentale presenta una resistenza naturale alla malattia e non viene infettata frequentemente dal *Plasmodium vivax*.

Esempi del secondo gruppo sono individui portatori di anomalie genetiche come deficienza della G6PD (glucosio 6fosfato deidrogenasi), talassemia, anemia falciforme; mutazioni dell'emoglobina S, C, beta ed alfa, degli enzimi glucosio-6-fosfato deidrogenasi e piruvato chinasi, che proteggono dalle forme gravi di malaria provocate da *P. falciparum* in portatori eterozigoti e nel caso dell'emoglobina C soprattutto in omozigosi. Le particolari proprietà delle catene di queste emoglobine e le condizioni di stress ossidativo provocate dall'infezione, possono provocare l'emolisi degli eritrociti ostacolando la maturazione dei trofozoiti. Nonostante queste mutazioni siano dannose, grazie alla protezione conferita nei confronti della malaria, si trovano ad alte frequenze in popolazioni che vivono in zone altamente endemiche.

In queste popolazioni la frequenza delle mutazioni di resistenza è comunque destinata ad arrivare ad un valore di equilibrio (intorno al 15-20%) che rispecchia lo svantaggio dovuto alla letalità della mutazione ed il vantaggio rispetto alla malaria.

Nelle zone non malariche, queste mutazioni generalmente sono molto rare o assenti poiché la loro letalità non è controbilanciata da effetti positivi.

Nell'anemia falciforme, si ritiene che l'infezione da *P. falciparum* abbia operato una selezione in popolazioni di aree endemiche per malaria che ha portato un equilibrio tra omozigoti normali, sensibili all'infezione, e anormali, portatori di anomalie genetiche letali.

Il genotipo favorito è perciò l'eterozigote parzialmente resistente a *P. falciparum* e che non manifesta il carattere letale dell'anemia.

Ad eccezione del *P. falciparum*, la cui moltiplicazione può provocare gravi complicanze e persino la morte del paziente, per gli altri plasmodi si può considerare la malaria un'infezione autolimitante.

I segni clinici della malaria sono, nelle forme classiche:

- Febbre alta con brividi
- Sfebbramento con forte sudorazione
- Grave stato generale
- Cefalea
- Nausea
- Vomito e dolori muscolari diffusi

Talvolta la malattia può non presentarsi nella sua forma classica e trarre subdolanente in inganno i clinici.

La malaria, pertanto, va sempre sospettata nei soggetti provenienti da zone endemiche tropicali che sviluppino febbre anche a distanza di tempo e nei soggetti febbrili sottoposti a trasfusioni di sangue o che abbiano fatto uso parenterale di droghe.

RACCOLTA DEL CAMPIONE

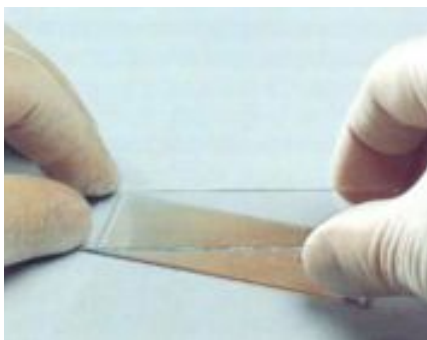
Il prelievo deve essere fatto prima che il paziente inizi il trattamento terapeutico tenendo presente che i parassiti sono generalmente più numerosi nel sangue qualche ora dopo l'inizio dell'accesso febbrile. Per ogni individuo si devono allestire almeno due "goccia spessa" per la ricerca del protozoo e due o tre strisci per l'identificazione della specie.

Il prelievo di sangue periferico va così effettuato: dopo aver disinfettato e sgrassato, con alcool, un dito della mano, asciugare con una garza sterile e stringere fortemente il dito, alcune volte, per stimolare la circolazione sanguigna; con una lancetta sterile pungere il polpastrello, applicare una leggera pressione per fare uscire una prima goccia di sangue che va raccolta direttamente al margine del vetrino; utilizzando un altro vetrino toccare la goccia per permettere al sangue di scorrere lungo il bordo del vetrino, spingere in avanti, con movimento fermo e continuo, mantenendo un angolo di circa 45°. Lo striscio deve arrivare fino all'altro bordo del vetrino. Lasciare asciugare bene lo striscio all'aria e procedere alla colorazione. È consigliabile usare vetrini sabbiati da un lato: è così più facile identificare il vetrino scrivendo a matita (i coloranti spesso sciogliono l'inchiostro di penne e pennarelli) i dati identificativi del paziente e la data del prelievo.

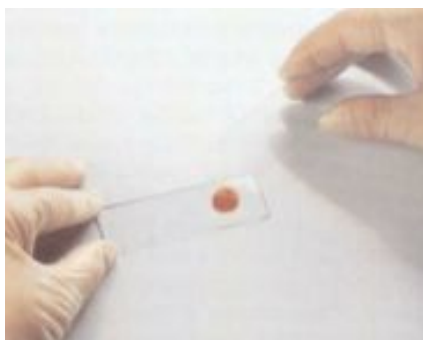
Per allestire la goccia spessa: si pongono 20-50 μ l di sangue periferico al centro di un vetrino sabbiato; mescolare la goccia di sangue con la punta della lancetta, con movimento regolare, per circa 1' spargendo il sangue su una superficie di circa 1 cm di diametro.

Lasciare asciugare il vetrino per almeno 18 h a temperatura ambiente (3-4 h a 37°C) prima di procedere alla colorazione.

Il prelievo viene fatto nell'adulto dal polpastrello, nei bambini al di sotto dei sei mesi, dal tallone. Lo striscio deve essere uniforme e sottile. Condizioni per la buona riuscita di uno striscio sono: la pulizia scrupolosa dei vetrini (che devono essere privi di tracce di grasso e di impronte digitali), le ridotte dimensioni della goccia di sangue prelevata e la rapidità della strisciata. Gli strisci che non vengono subito utilizzati devono essere tenuti al riparo dalla polvere ed essere colorati nel giro di pochi giorni.



Striscio di sangue sottile



Goccia spessa

La diagnosi di laboratorio si fonda:

- sulla ricerca del protozoo in strisci sottili di sangue periferico ottenuti previa puntura del polpastrello del paziente, fatti asciugare all'aria e colorati con colorazione di May-Grunwald-Giemsa,
 - sull'allestimento e colorazione della goccia spessa (arricchimento) che va fatta asciugare a temperatura ambiente per 24 h e poi si colora con Giemsa diluito 1/10
- L'Osservazione, sia degli Strisci che della goccia spessa, si effettua al microscopio ottico con obiettivo 100X

Nel caso di positività, nel riscontro dei plasmodi, si valuta il grado di parassitemia. La diagnosi emoscopica, per la sua semplicità, economicità e rapidità di risposta, rappresenta ancora il metodo standard per la diagnosi di malaria, tuttavia da diversi anni sono disponibili altre tecniche, alcune delle quali standardizzate in kit commerciali, che hanno lo scopo di rendere più semplice e rapida la diagnosi anche per personale non specializzato. Quelli di maggior interesse sono certamente i test cosiddetti immunocromatografici o immunoenzimatici che sono indirizzati prevalentemente alla diagnosi rapida di *P. falciparum*, l'unica specie che determina una infezione che può evolvere in forme gravi o complicate.

È comunque buona regola confermare, appena possibile, le diagnosi effettuate con tecniche alternative, con l'osservazione microscopica diretta del protozoo. Tecniche più recenti, quali i test molecolari trovano, per il momento, il loro massimo impiego in diversi campi della ricerca e solo in alcuni casi possono rappresentare un valido supporto diagnostico all'esame emoscopico.

Le tecniche diagnostiche per la malaria possono quindi essere riunite, nel loro complesso, in 2 gruppi;

il primo gruppo è costituito da metodi diretti, cioè ricerche dirette del protozoo nel campione ematico;

il secondo gruppo invece è costituito da metodi indiretti, cioè ricerche degli anticorpi specifici prodotti dal paziente, contro i parassiti.

- metodi diretti
 1. Diagnosi microscopica di preparati ematici (Col. MGG)
 2. Test immunocromatografici (ICT)
 3. Test molecolari
 4. Immunofluorescenza Indiretta (IFI)
- metodi indiretti
 5. Immunofluorescenza Indiretta(IFI)

Un particolare approfondimento verrà dedicato alla diagnosi microscopica, la quale viene effettuata dopo aver colorato il vetrino di striscio e la goccia spessa; le colorazioni più usata per la ricerca dei plasmodi della malaria sono quelle di May Grunwald - Giemsa e quella di Giemsa. La prima viene utilizzata per fissare e colorare strisci sottili, mentre la seconda per colorare la goccia spessa, senza fissarla, permettendo l'emolisi dei globuli rossi.

Metodi diretti

1. Diagnosi microscopica di preparati ematici

I vetrini, dopo la colorazione, vanno osservati al microscopio ottico con obiettivo 100x (ad immersione con olio di legno di cedro o simile). Lo sfondo del preparato deve apparire privo di detriti grossolani e gli eritrociti di colore rosa grigiastro.

I parassiti, qualora presenti, si colorano nella parte nucleare di rosso porpora e il citoplasma di azzurro pallido.

Negli strisci sottili si evidenziano i vari stadi di sviluppo del protozoo all'interno dell'emazia, dal trofozoite al gametocita, confrontandoli con gli schemi, le fotografie e le tabelle che devono sempre essere disponibili per l'osservatore.

Dalle caratteristiche morfologiche presenti nelle diverse specie di plasmodio, si identifica il parassita in esame.

Si osserverà, anche, la possibile presenza delle granulazioni all'interno dell'emazie, se poche e grossolane si tratta delle granulazioni di Maurer, presenti nell'infezione da *Plasmodium falciparum*, se numerose ed uniformi si tratta delle granulazioni di Schuffner, presenti nell'infezione da *P. vivax* o *P. ovale*. In caso di positività può essere necessario valutare il grado di parassitemia, che si ottiene contando il numero degli eritrociti parassitati su 100 emazie osservate.

Per indicare il valore della parassitemia osservare almeno 2-3 campi microscopici, valori superiori al 5% indicano infezioni gravi.

Di contro, prima di ritenere la ricerca del plasmodio negativa osservare almeno 200 campi microscopici; è comunque necessario in tal caso osservare la goccia spessa prima di giudicare negativo l'esame parassitologico.

La goccia spessa si osserva al microscopio ottico con obiettivo 100x (ad immersione con olio di legno di cedro o simile). Lo sfondo del preparato deve apparire di colore grigio chiaro, causato dalla lisi degli eritrociti, e privo di detriti grossolani. I parassiti malarici, se presenti, appaiono con cromatina rosso scuro e citoplasma azzurro pallido. La goccia spessa può essere ritenuta come una concentrazione o un arricchimento del campione; è molto utile, infatti, qualora i parassiti sono molto scarsi nel sangue periferico e non ne sono stati riscontrati nello striscio sottile. La ricerca va protratta per cento buoni campi prima di giudicare un vetrino come negativo (è considerato un buon campo quello che contiene almeno 15-20 globuli bianchi).

Anche la determinazione della parassitemia, in termini di numero di parassiti per microlitro di sangue (μl), può essere fatta su goccia spessa con questa modalità:

numero di parassiti / numero dei leucociti x 8000 = parassiti per μl

Valutando in 8000 il numero medio di globuli bianchi per μl di sangue, si contano, con l'aiuto di un contacolpi, il numero di parassiti e di globuli bianchi contenuti in 10-20 buoni campi.

Una valutazione molto più precisa si ottiene conoscendo con esattezza il numero di globuli bianchi del paziente.

Diagnosi Differenziale di specie

La diagnosi differenziale delle diverse specie di plasmodi va effettuata esaminando, nello striscio sottile, sia la morfologia dell'eritrocita sia quello del protozoo e la presenza degli specifici granuli (Maurer, Schuffner, Jones, Ziemann).

Dell'eritrocita si deve osservare:

- la forma dell'emazia
- la grandezza dell'emazia
- la presenza dei granuli caratteristici
- i contorni della membrana dell'emazia

La forma e il colore dell'emazia parassitata possono variare a seconda del protozoo ospitato.

Il protozoo può indurre delle modificazioni nella grandezza del globulo rosso e questo può diventare ipertrofico, assumere forme ovali o allungate, decolorarsi o presentare sfrangiature.

Del protozoo si osservano le varie forme che possono essere presenti all'interno delle emazie:

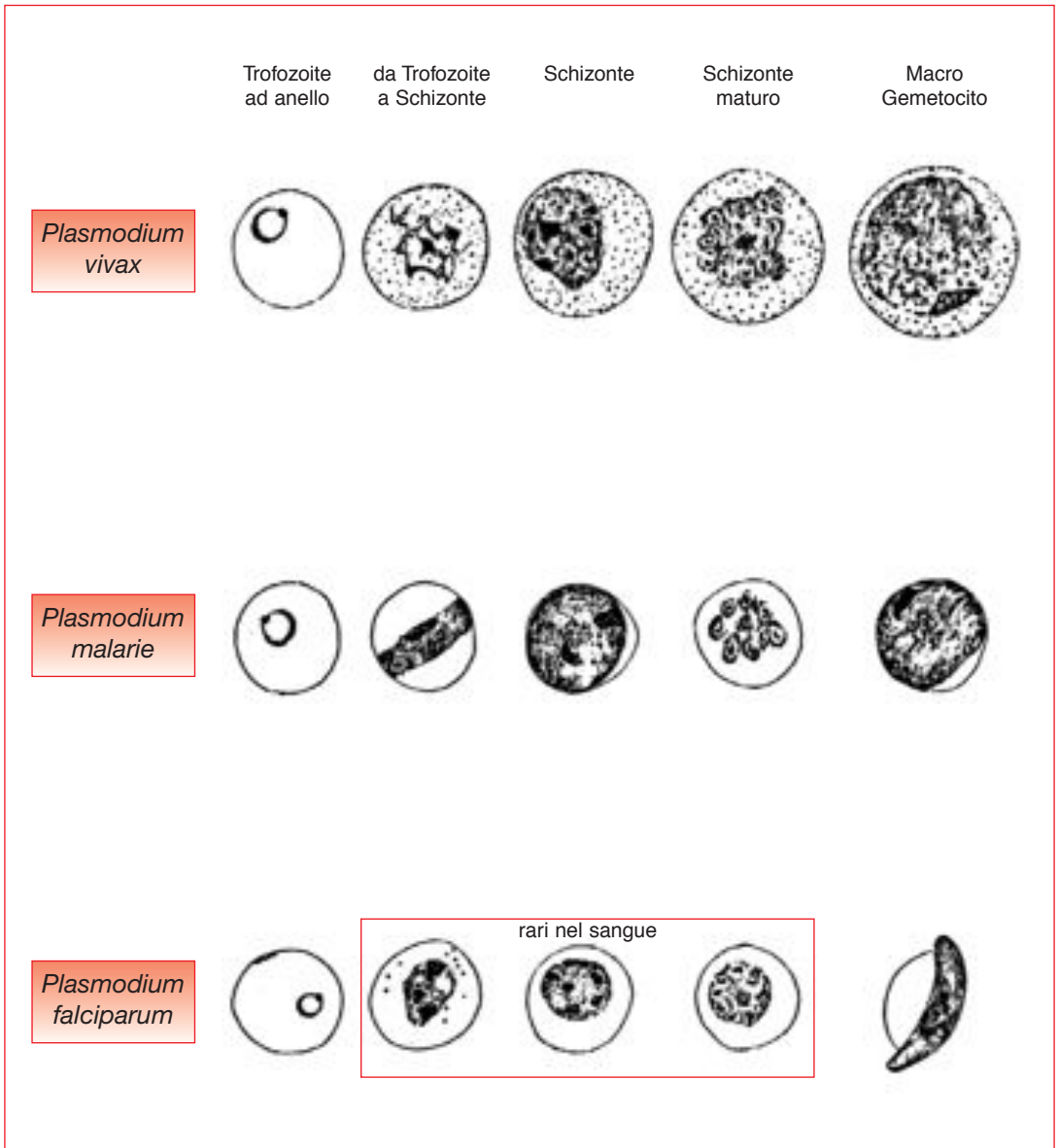
- trofozoite giovane: si presenta con un vacuolo più o meno grande all'interno del citoplasma con il nucleo situato in posizione periferica. Sono forme precoci dei parassiti malarici;
- trofozoite in forma compatta: il nucleo è sempre in posizione più o meno periferica ed il vacuolo appare notevolmente ridotto;
- trofozoite in forma ameboide: il citoplasma appare ripartito in più masserelle, simili a pseudopodi, queste sono forme adulte del parassita malarico.
- numero di merozoiti presenti negli schizonti maturi, che può variare a seconda della specie di plasmodio, in genere da 4 a 32. In questo stadio il protozoo può raggiungere dimensioni tali da riempire tutto il globulo rosso che lo contiene.
- i gametociti: sono lo stadio sessuato del protozoo. Sono forme molto grandi che occupano l'intera emazia, spesso la deformano in maniera caratteristica. Il nucleo è composto da una grossa massa di cromatina più o meno compatta, di forma tondeggiante o allungata.

Sono molto evidenti i granuli di pigmento (Emozoina).

Infine, non bisogna dimenticare che, nello striscio che stiamo osservando, è possibile la contemporanea, eventuale, compresenza di parassiti di specie diverse (INFEZIONE MULTIPLA).

L'identificazione delle specie plasmodiali è indispensabile per il clinico, perché influenzerà la scelta della terapia più adeguata da effettuare e, quindi, la prognosi del caso.

Schema delle forme di Plasmodio



	<i>P. vivax</i>	<i>P. ovale</i>	<i>P. malariae</i>	<i>P. falciparum</i>
EMAZIA PARASSITATA	Ingrandita: presenza di granuli di Schuffner	Ingrandita; può essere ovale, presenza di granuli di Jones	Dimensione normale o ridotta.	Dimensione normale; possono essere presenti granuli di Maurer.
TROFOZOITE GIOVANE	Abbastanza grande, contorno irregolare; 1-2 grossi granuli di cromatina; possono essere 2 per eritrocita.	Piccolo, contorni netti; 1-2 piccoli granuli di cromatina.	Compatto, contorni netti: 1 grosso granulo di cromatina.	Piccolo e sottile spesso 2 o più forme per emazia; spesso accollati alla superficie delle emazia.
TROFOZOITE ADULTO	Grande, ameboide; citoplasma frammentato con piccoli granuli di pigmento.	Piccolo, non ameboide; citoplasma con qualche granulo di pigmento.	Piccolo, compatto, spesso a forma di banda; granuli di pigmento giallo bruno.	Dimensioni medie, di solito compatto, comuni le forme a "virgola"; a volte pochi granuli di pigmento.
SCHIZONTE MATURO	Grande; 12-24 grandi merozoiti pigmento sparso.	Più piccolo di <i>P. vivax</i> ; 6-12 merozoiti; pigmento più scuro che in <i>P. vivax</i> , a volte centrale.	Piccolo; 6-12 grandi merozoiti spesso disposti a rosetta intorno a una massa di pigmento giallo bruno.	Rarissimo nel sangue periferico. ove è segno di grave infezione; 8-26 piccoli merozoiti; 1 sola massa di pigmento.
GAMETOCITI	Grandi, rotondi-ovali; granuli sparsi di pigmento. Il gametocita femminile si colora più intensamente e il nucleo è più compatto.	Piccoli, rotondi, spesso difficili da distinguere dai trofozoiti adulti; nucleo spesso laterale. Il gametocita femminile è più grande, si colora più intensamente e il nucleo è più compatto.	Piccoli, rotondo-ovali, compatti, nucleo di solito laterale. Il gametocita femminile è più grande, si colora più intensamente e il nucleo è più compatto.	A forma di "falce", rare le forme ovali. Il gametocita femminile si colora più intensamente in blu, il nucleo è più compatto e presenta meno granuli.

Caratteristiche morfologiche intraeritrocitarie delle specie di Plasmodio

Limiti di sensibilità dell'esame microscopico

Le alte parassitemie non sfuggono alla diagnostica microscopica tradizionale, mentre il problema si pone nei casi di bassa o addirittura bassissima parassitemia.

La diagnosi microscopica dei parassiti malarici ha infatti una soglia di sensibilità di 10-20 parassiti per μ l di sangue. Come noto, basse parassitemie possono essere presenti essenzialmente in tre situazioni cliniche:

- Infezione malarica in soggetti semi-immuni, che sviluppando una vigorosa reazione immunitaria impediscono una schizogonia massiva;
- Infezione malarica in soggetti non immuni in corso di profilassi, o in seguito a trattamento improprio o incompleto;
- Infezioni da *P. falciparum* molto sincronizzate: casi piuttosto rari in cui lo striscio periferico può essere negativo (parassitemia al di sotto della soglia) perché quasi tutti i plasmodi sono allo stadio di schizonte, sequestrati nei capillari degli organi interni e quindi assenti dal periferico, oppure perché vi è appena stata emolisi massiva dovuta alla rottura degli schizonti stessi e dell'emazia che li conteneva.

Nel secondo e nel terzo caso poter fare rapidamente diagnosi di malaria è essenziale, perché un risultato falsamente negativo può portare all'exitus. Anche nel primo caso una diagnosi rapida è comunque auspicabile, sia per alleviare un disagio anche grave durante l'attacco acuto, sia per evitare il rischio di forme di malaria cronica o evolutiva.

La diagnosi della malattia passa inevitabilmente per l'osservazione microscopica e l'identificazione di specie.

La ricerca di anticorpi specifici, che si esegue con il metodo dell'immunofluorescenza indiretta ha scarso significato diagnostico, ma può talvolta essere utile per verificare se il paziente ha in epoca recente contratto la malattia e ne è guarito. Potrebbe essere impiegata specialmente nei centri trasfusionali per testare le sacche di sangue proveniente da donatori extracomunitari.

Infine è oggi possibile una diagnosi rapida con test immunoenzimatici e/o di biologia molecolare.

2. Test immunocromatografici (ICT)

Recentemente sono stati commercializzati numerosi test rapidi per la diagnosi di malaria di cui tre facilmente reperibili in Italia. Due di questi, si basano sull'individuazione nel sangue intero di un antigene solubile, la glicoproteina di tipo 2 ricca in istidina di *P. falciparum* (PfHRP-II) che è liberata durante il ciclo eritrocitario del protozoo con un picco durante la rottura degli schizonti.



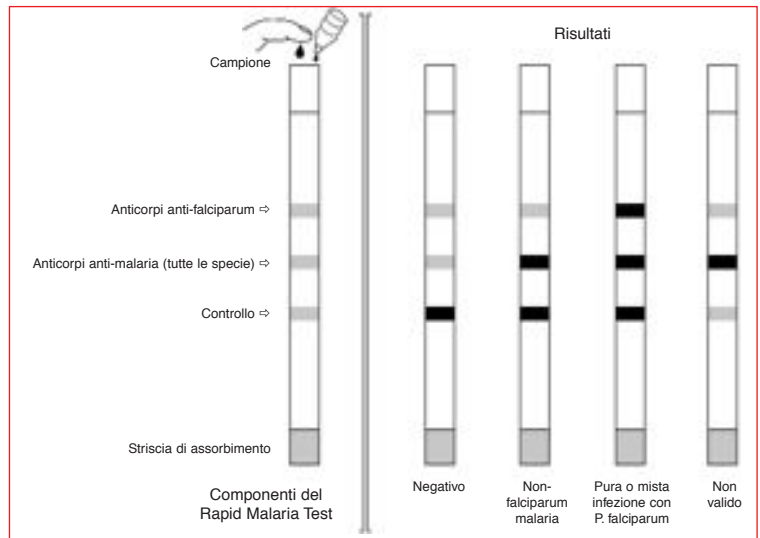
Il test è specifico per la diagnosi di *P. falciparum*, esiste oggi anche un test che rivela le infezioni da altri plasmodi. Un altro test si basa sull'individuazione nel sangue intero di lattato deidrogenasi (pLDH) liberata dai plasmodi.

Il procedimento è il seguente:

con capillari tarati si prelevano 10-50 ml di sangue dal polpastrello; che si trasferiscono su una apposita striscia sensibilizzata o in pozzetti di reazione, si aggiungono alcune gocce di reagenti lisanti e anticorpi specifici, marcati con un sistema rivelatore, dopo qualche minuto si sciacqua, con alcune gocce di detergente, e si legge il risultato a occhio nudo. In caso di positività, sulla estremità delle strisce appariranno due o tre linee di colore o forma diversa a seconda del prodotto utilizzato.

Una striscia rappresenta sempre il controllo positivo, un'altra la positività per *P. falciparum* e l'eventuale terza la positività generica per *Plasmodium* spp.

Tutti i sistemi presentano specificità elevata e una sensibilità in grado di rivelare parassitemie superiori a 100-200 parassiti per microlitro di sangue. Inoltre presentano diversi vantaggi rispetto al tradizionale esame emoscopico: non richiedono microscopio o altra apparecchiatura, bastano pochi minuti per il risultato, dispongono di un controllo positivo integrato per svelare eventuali errori di procedimento, posso-



Membrana di reazione del test di Immunocromatografia

no essere eseguiti e interpretati anche da operatori non specializzati e infine i kit sono di poco ingombro e di facile trasporto.

Nella diagnosi della malaria, questi test immunocromatografici possono risultare un ausilio diagnostico particolarmente utile in caso di infezioni con bassa parassitemia o in situazioni di urgenza, quando risulta importante conoscere rapidamente se un caso di malaria diagnosticato clinicamente è dovuto a *P. falciparum* o ad altre forme plasmodiali.

Va peraltro ricordato che all'impiego di questi test rapidi deve essere comunque associato un successivo esame emoscopico.

I limiti di questi test

Reazioni falsamente positive si sono evidenziate in pazienti portatori di fattore reumatoide. I fattori reumatoidi sono infatti rappresentati da una popolazione eterogenea di autoanticorpi (prevalentemente IgM, ma anche IgG, IgA e IgE) capaci di reagire con alcuni determinanti antigenici localizzati sul frammento Fc delle immunoglobuline G. Poiché i fattori reumatoidi sono riscontrabili in circa il 5% di persone apparentemente sane, e nel 10-20% dei soggetti di oltre 65 anni di età, la non completa affidabilità di questo saggio, in tali soggetti, deve essere tenuta in considerazione per la corretta interpretazione dei risultati.

3. Test molecolari

Le tecniche molecolari più sensibili, oggi, sono basate sull'amplificazione di determinate regioni del DNA del protozoo attraverso la reazione di polimerizzazione a catena (Polymerase Chain Reaction, PCR).

Questa semplice tecnica ha fornito le basi per lo sviluppo di nuove procedure da impiegare in malariologia non solo per la diagnostica di specie, ma soprattutto indagini epidemiologiche e per la caratterizzazione genetica dei vari ceppi di plasmodio. La PCR ha permesso la diagnosi differenziale delle quattro specie di plasmodi umani attraverso l'amplificazione del gene che codifica per una piccola subunità dell'RNA ribosomiale.

La diagnosi con tecniche molecolari trova però, ancora scarsa applicazione nella diagnostica di routine.

I principali limiti sono costituiti dalla necessità di operare in laboratori attrezzati, con personale specializzato e i costi sono ancora piuttosto alti. Tuttavia l'elevata sensibilità (la sensibilità della nested-PCR è di 1 parassita/ml) e specificità (a livello di singolo genoma), nonché la semplicità di interpretazione e la riproducibilità dei risultati rendono questi metodi uno strumento estremamente valido per la diagnosi in presenza di basse parassitemie (submicroscopiche), per la diagnosi di infezioni miste in presenza di una specie prevalente, per distinguere tra reinfezioni e recrudescenze dovute alla stessa specie plasmodiale, per caratterizzare ceppi farmaco-resistenti e per le diagnosi di malaria *post mortem* in assenza di preparati istologici.

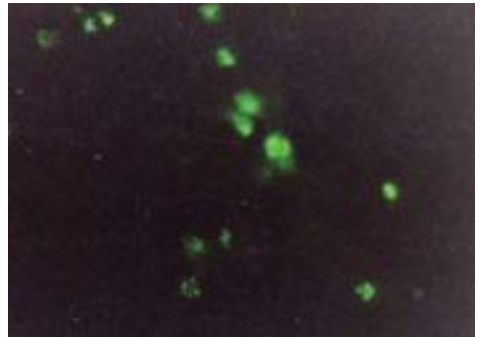
4. Immunofluorescenza Indiretta (IFI)

I plasmodi malarici possono essere ricercati, nel campione di sangue posto in una provetta con eparina, mediante l'impiego di anticorpi monoclonali murini specifici che riconoscono tutte le forme intraeritrocitarie del plasmodio.

Il complesso antigene-anticorpo, qualora presente, viene rilevato con un'antiglobulina marcata con isotiocianato di fluoresceina.

Procedimento

- Si prepara una sospensione di emazie del campione di sangue in provetta con eparina con 2 centrifugazioni a 400 g per 10'
- Si lava il sedimento ottenuto, si diluisce 1/5 con PBS 7.6 e si depone 20µl sul pozzetto del vetrino per immunofluorescenza
- Depositare 20µl di anticorpo monoclonale che riconosce tutte le forme intraeritrocitarie del plasmodio
- Incubare in camera umida a 37°C per 30'
- Lavare il vetrino con PBS 7.6 e asciugare
- Depositare 20µl di coniugato, anticorpi anti IgG e anti IgM legati all'isotiocianato di fluoresceina
- Incubare in camera umida a 37°C per 30'
- Lavare
- Osservare al microscopio a fluorescenza a 40 e 100x
- Si osserveranno, in caso di positività, elementi fluorescenti su fondo nero o bruno



Emazie con plasmodi fluorescenti

Utilità

L'impiego degli anticorpi monoclonali e la immunofluorescenza permette di esaminare un elevato numero di campioni di sangue in breve tempo e di reperire senza dubbio i parassiti. Questa tecnica si utilizza, prevalentemente, nei centri trasfusionali, per testare sacche di sangue di donatori extracomunitari; si utilizza, anche, nelle diagnosi difficili, quando non si è riusciti ad evidenziare i plasmodi con l'osservazione microscopica di preparati colorati e per studiare l'efficacia della profilassi e/o le forme chemio-resistenti a bassa parassitemia, fornendo, tale test, una maggiore sensibilità rispetto all'osservazione microscopica classica.

Metodi indiretti

5. Immunofluorescenza Indiretta (IFI)

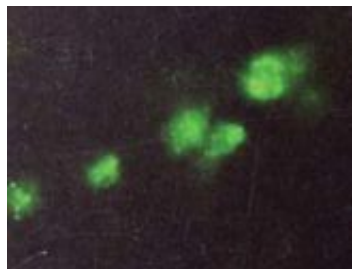
Ricerca degli anticorpi anti-*Plasmodium*

In commercio sono disponibili vetrini con emazie parassitate dai *P. falciparum* da testare con il siero del paziente utilizzando la tecnica di immunofluorescenza indiretta

La metodica utilizzata con l'impiego di questi vetrini è descritta di seguito:

- Scomplementare il siero del paziente in esame a 56°C. per 30'.
- Effettuare delle diluizioni a raddoppio del siero e cimentare ciascuna diluizione con un pozzetto del vetrino test.
- Incubare in camera umida a 37°C per 30'.
- Lavare con acqua distillata delicatamente e lasciar asciugare.
- Deposporre 20 µl. di coniugato anti IgG umane legato ad isotiocianato di fluoresceina.
- Incubare in camera umida a 37°C per 30'.
- Lavare con acqua distillata delicatamente e lasciar asciugare.
- Depositare una goccia di glicerina tamponata sul pozzetto, coprire con coprioggetto.
- Osservare con microscopio a fluorescenza l'intero preparato con obiettivo 40x.

I protozoi presenti sul vetrino appariranno di color verde mela sul fondo nero-marrone se nel siero del paziente sono presenti anticorpi specifici.



Emazie parassitate fluorescenti

Interpretazione dei risultati

Titoli < 1/20 indicano assenza di infezione

Titoli compresi tra 1/20 e 1/40 indicano probabile esposizione passata all'infezione malarica da *P. falciparum* o possibile infezione attiva da *P. malariae* o *vivax*. Il test va ripetuto dopo 15 gg

Titoli > 1/80 indicano infezione attiva da *P. falciparum*

La diagnosi necessita comunque del reperto del protozoo nel sangue periferico.

Utilità

Possibilità di effettuare uno screening sui donatori di sangue che hanno soggiornato in un'area endemica.

Casi sospetti di malaria con negatività dello striscio.

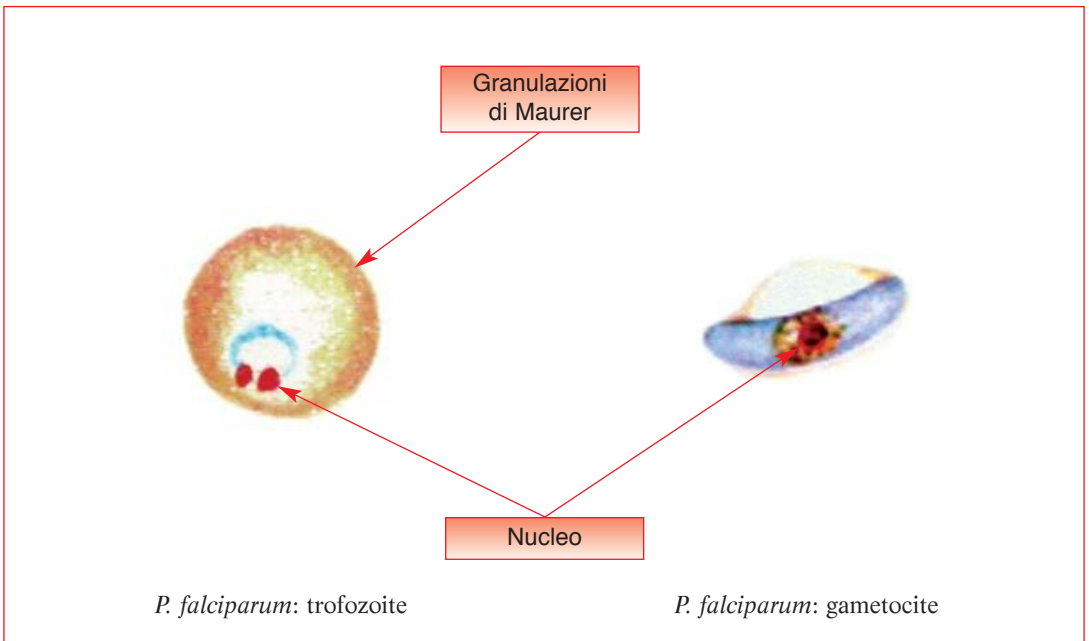
Plasmodium falciparum

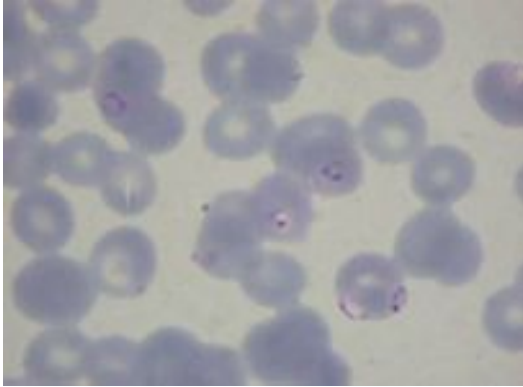
Il *P. falciparum* è l'agente eziologico della terzana maligna, responsabile di più della metà dei casi di malaria nel mondo e di quasi tutti i decessi per malaria.

Il periodo di incubazione, nell'uomo, va generalmente da 9 a 19 giorni. Il ciclo schizogonico ematico si completa in 48 ore e gli accessi febbrili si ripetono quindi ogni terzo giorno; spesso i parossismi malarici si susseguono a ritmi più ravvicinati ed irregolari. Nei soggetti non immuni spesso *P. falciparum* provoca attacchi improvvisi e letali a livello cerebrale (encefalite febbrile acuta), cardiaco, renale (insufficienza acuta ed uremia) e intestinale, per accumulo degli eritrociti parassitati nei capillari. In tali soggetti la morte può sopravvenire entro 1-2 settimane dall'attacco primario; nella maggioranza dei casi i sopravvissuti non hanno recrudescenze e mai recidive (questo protozoo non forma ipnozoiti).

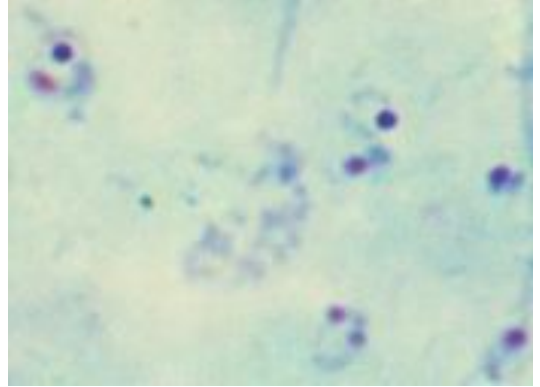
I primi trofozoiti ad anello compaiono negli eritrociti e sono di solito evidenziabili ad un normale esame del sangue periferico verso il 9°-10° giorno. Dopo circa 30 ore gli eritrociti infetti scompaiono dal sangue periferico e si concentrano nei capillari degli organi interni (tra cui il cervello) dove inizia la schizogonia. Gli eritrociti infetti aderiscono all'endotelio dei capillari ostruendone il lume. Lo schizonte libera 18 merozoiti (talvolta fino a 24) che invadono altri globuli rossi; sono frequenti infezioni multiple in un unico eritrocito. Nei soggetti non immuni può colpire fino al 25% dei globuli rossi. Gli eritrociti parassitati non si ingrandiscono, si colorano pallidamente e presentano poche granulazioni cromofile, dette di Maurer. I gametociti appaiono nel sangue periferico all'incirca 15 giorni dopo l'inoculazione. Hanno la caratteristica forma a mezzaluna o a falce (da cui il nome del parassita).

Nelle infezioni da *P. falciparum*, non di rado letali, il successo terapeutico dipende dalla precocità della diagnosi.

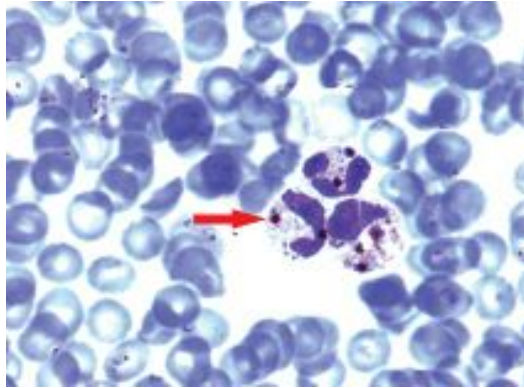




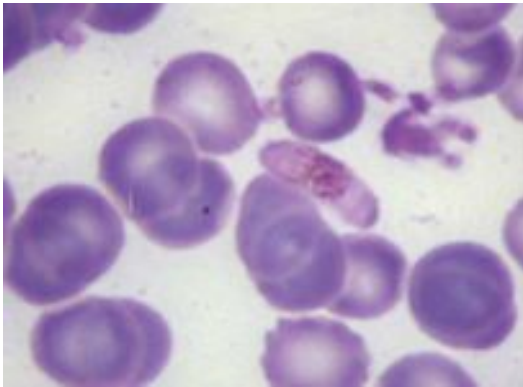
Trofozoite di *P. falciparum*
striscio di sangue 1000x (Col. MGG)



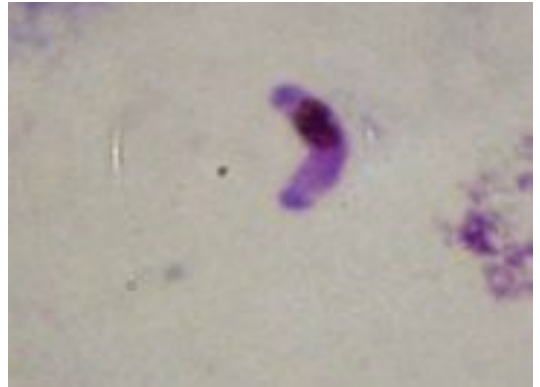
Trofozoite di *P. falciparum*
goccia spesa 1000x (Col. MGG)



Granuli di pigmento (Emozoina) 1000x (Col. MGG)



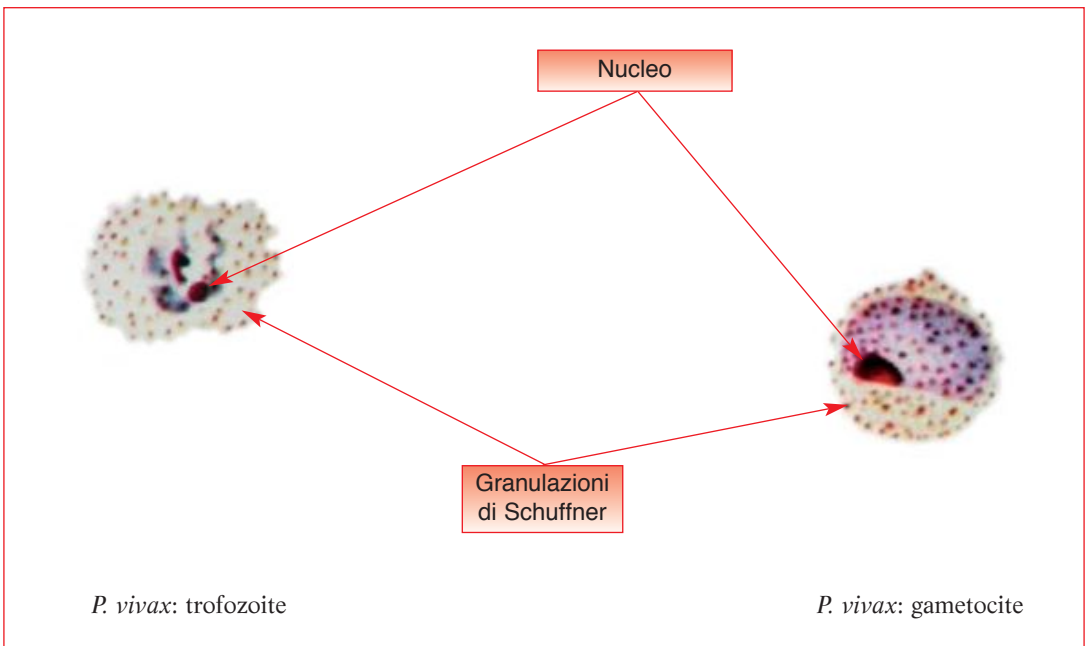
Gametocita di *P. falciparum*
striscio di sangue 1000x (Col. MGG)



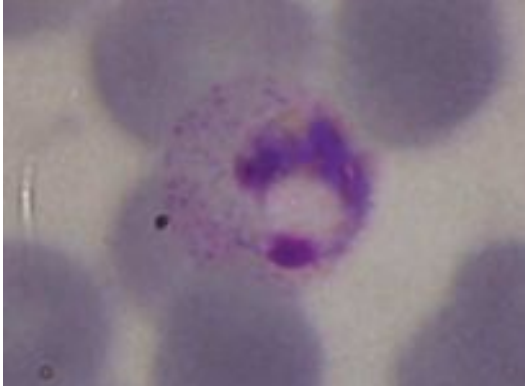
Gametocita di *P. falciparum*
goccia spesa 1000x (Col. MGG)

Plasmodium vivax

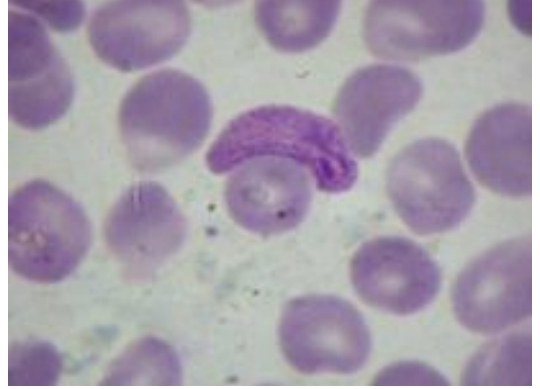
Il *P. vivax* è l'agente eziologico della terzana benigna, che aveva larghissima diffusione tra il 55° parallelo Nord e il 43° Sud. Questo protozoo è responsabile di circa il 40% dei casi di malaria nel mondo; è praticamente assente in Africa occidentale dove sono numerose le popolazioni Duffy negative; le sue infezioni sono caratterizzate da frequenti ricadute, ma sono raramente letali. Il periodo di incubazione va generalmente dai 12 ai 18 giorni. Il ciclo preeritrocitario di *Plasmodium vivax* dura normalmente otto giorni; alcuni sporozoi inoculati si trasformano in ipnozoiti, e restano quiescenti nel fegato. Normalmente, tra l'undicesimo e il tredicesimo giorno dall'inoculazione si notano nel sangue periferico i primi eritrociti infetti, contenenti grosse forme ad anello che occupano un terzo del loro diametro. Questi trofozoiti hanno rapidi movimenti ameboidi (da cui deriva il nome della specie); l'accrescimento del protozoo è seguito da quello del globulo rosso che passa da 7 a 10-11 μ di diametro. Alla colorazione di May Grunwald-Giemsa l'eritrocito presenta numerose granulazioni rosse, dette di Schuffner. Dopo 36 ore il trofozoite si trasforma in uno schizonte che occupa quasi tutto l'eritrocito ipertrofico. Si formano 12-24 merozoiti (in media 16), che invadono altri eritrociti.



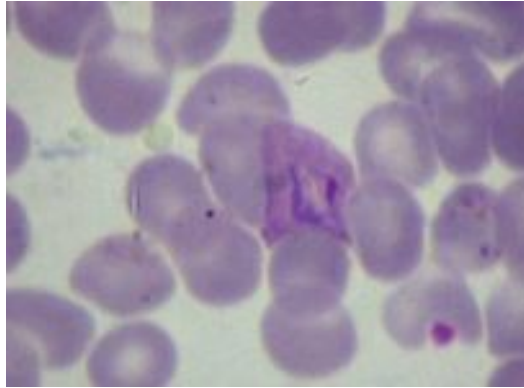
Il grado d'infezione da *P. vivax* è molto più basso di quello da *P. falciparum* e molto rare sono le emazie poliparassitate. Il ciclo schizogonico ematico di *P. vivax* si completa in 48 ore; gli accessi febbrili si susseguono ogni terzo giorno. Le recidive sono frequenti perchè alcuni sporozoi inoculati si trasformano in ipnozoiti e restano per mesi quiescenti nel fegato, gli ipnozoiti in condizioni favorevoli possono riprendere, dopo tempo, il loro sviluppo, lasciare il fegato ed iniziare il ciclo eritrocitario.



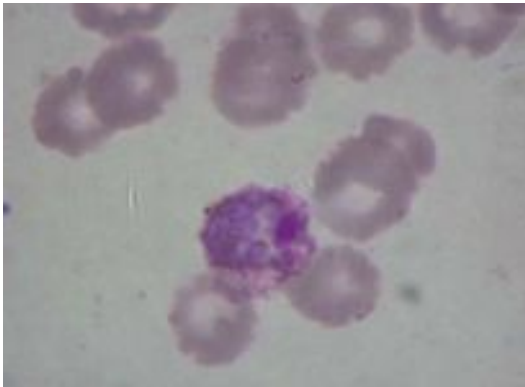
Trofozoite ad anello di *P. vivax* 1000x
(Col. MGG)



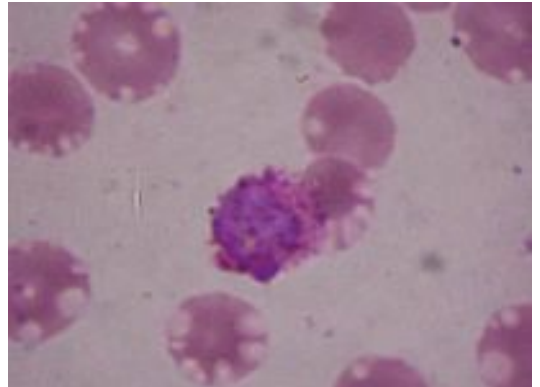
Trofozoite anziano di *P. vivax* 1000x
(Col. MGG)



Trofozoite di *P. vivax* 1000x (Col. MGG)



Macrogametocito di *P. vivax* 1000x (Col. MGG)



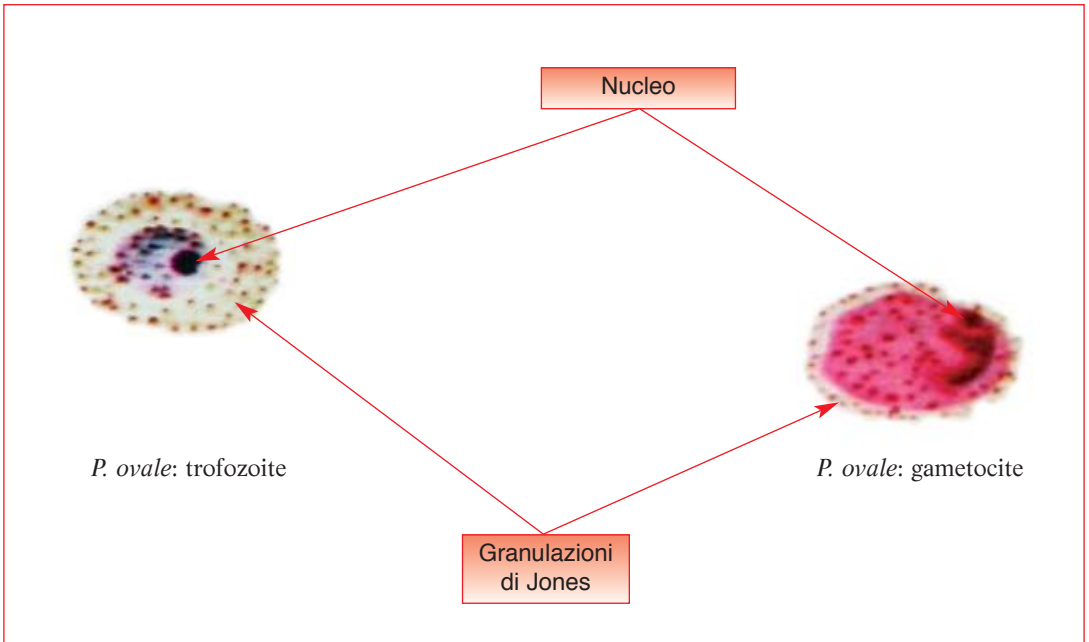
Microgametocito di *P. vivax* 1000x (Col. MGG)

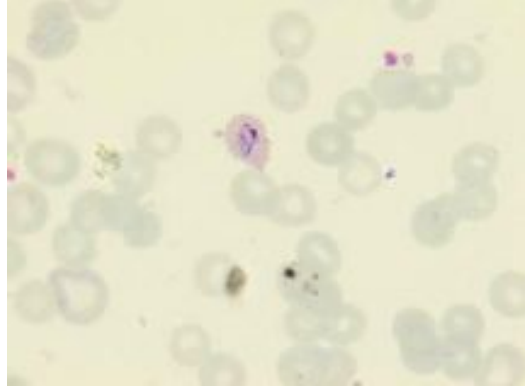
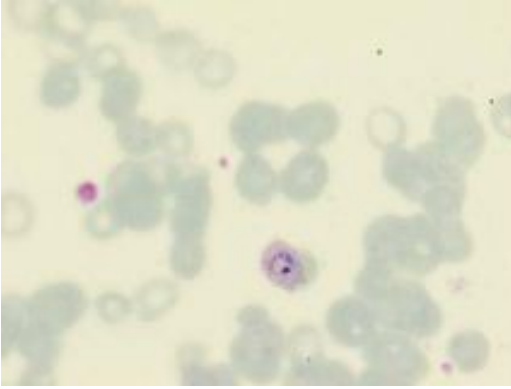
Plasmodium ovale

Il *P. ovale* è responsabile di circa il 4% dei casi di malaria nel mondo; è diffuso in piccoli focolai in Sudamerica e Africa e colpisce soprattutto bambini sotto gli 8 anni, presumibilmente perché la premunizione è acquisita precocemente.

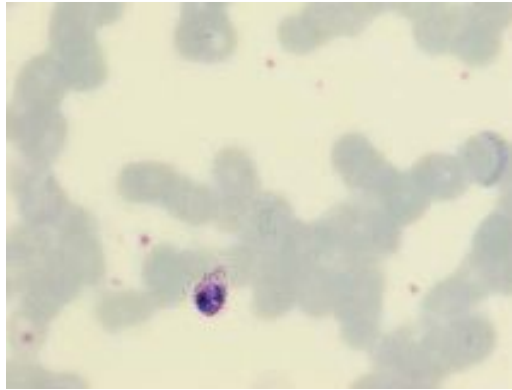
Il ciclo preritrocitario di *Plasmodium ovale* dura normalmente otto giorni; alcuni sporozoi inoculati si trasformano in ipnozoiti. I suoi trofozoiti e gli schizonti ematici sono più compatti e più piccoli di quelli di *P. vivax* e sono dotati di un nucleo oblungo e grosso. I globuli rossi parassitati sono solo leggermente ipertrofici e assumono forma ovale, spesso sfrangiata; il loro citoplasma, dopo colorazione di May Grunwald-Giemsa, appare costellato di granulazioni di Jones.

Gli schizonti maturi danno origine in media a 8 grossi merozoiti, che abbandonano il globulo rosso dopo 48 ore dall'ingresso del protozoo, pertanto gli accessi febbrili si ripetono ogni 48 ore; questo tipo di terzana è più benigno di quello da *P. vivax*.

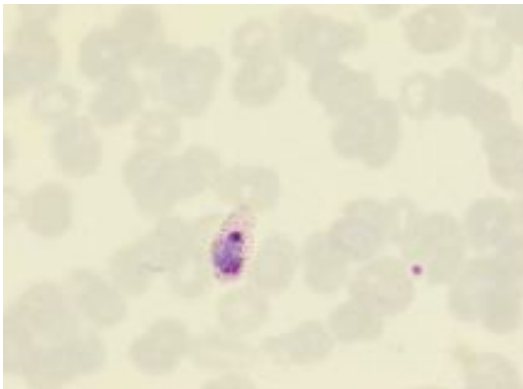




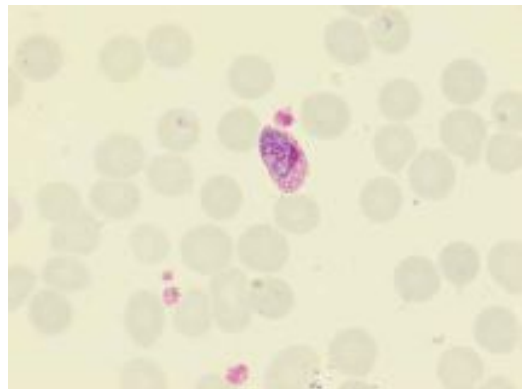
Trofozoite di *P. ovale* 1000x (Col. MGG)



Schizonte di *P. ovale* 1000x (Col. MGG)



Microgametocite di *P. ovale* 1000x (Col. MGG)



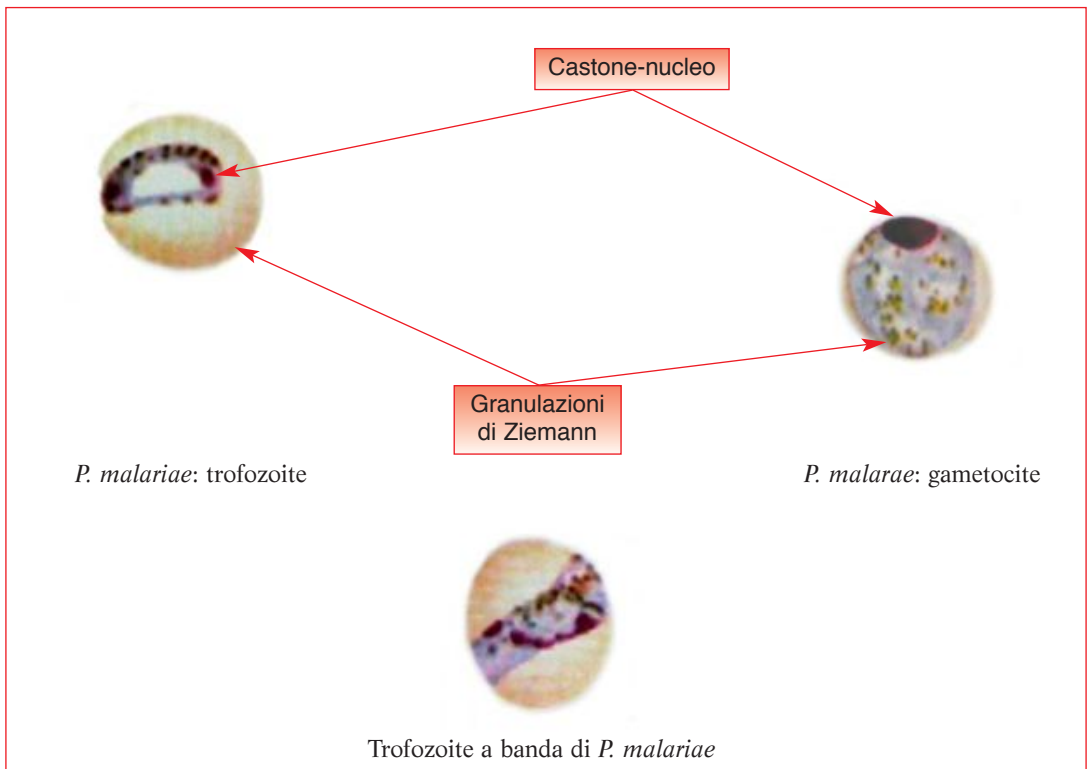
Macrogametocite di *P. ovale* 1000x (Col. MGG)

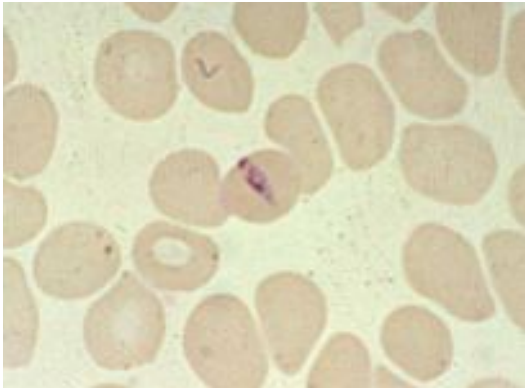
Plasmodium malariae

Il *P. malariae* è l'agente eziologico della malaria quartana, che si manifesta generalmente dopo un mese dall'inoculazione, alla fine dell'estate in focolai isolati. Esso è responsabile di circa il 5% dei casi di malaria nel mondo. L'accesso febbrile si verifica ogni 72 h, perché il ciclo schizogonico è più lento e la rottura dei globuli rossi avviene dopo 72 h dall'inizio del ciclo intraeritrocitario. La malaria quartana ha un andamento generalmente benigno, ma alcune infezioni si riattivano periodicamente per più di 50 anni, in pratica per tutta la vita. Talvolta insorgono gravi nefriti, dovute alla formazione di immunocomplessi che si depositano sulla membrana basale del glomerulo renale. I primi trofozoiti ad anello si notano nel sangue periferico dopo circa 15 giorni dall'inoculazione. Si sviluppano lentamente; il protozoo spesso si dispone come una larga fascia attraverso l'eritrocito parassitato. Dopo circa 50 ore i trofozoiti si trasformano in schizonti, che riempiono quasi tutto il globulo rosso, senza deformarlo. Mediante forti colorazioni è possibile mettere in evidenza negli eritrociti parassitati delle piccole granulazioni poco cromofile, dette di Ziemann. Entro 18-20 ore gli schizonti danno origine a 6-12, in media 8 merozoiti, spesso disposti a rosetta attorno a un notevole grumo di pigmento.

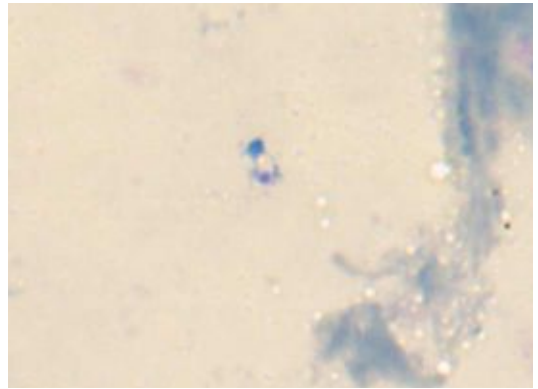
La parassitemia è sempre assai bassa.

I gametociti appaiono nel sangue periferico già maturi, simili a quelli di *P. vivax*, ma più piccoli e contenuti in eritrociti non ipertrofici. Nel citoplasma del protozoo si notano pochi, grossi granuli di pigmento.

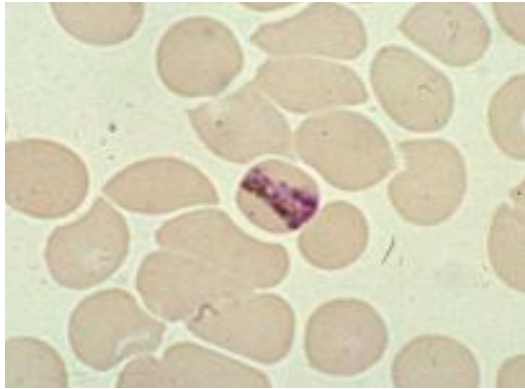




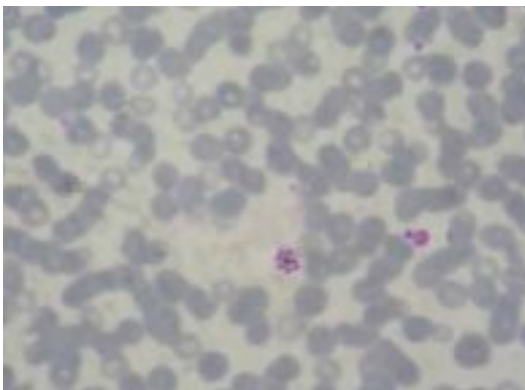
Trofozoite di *P. malariae*
striscio 1000x (Col. MGG)



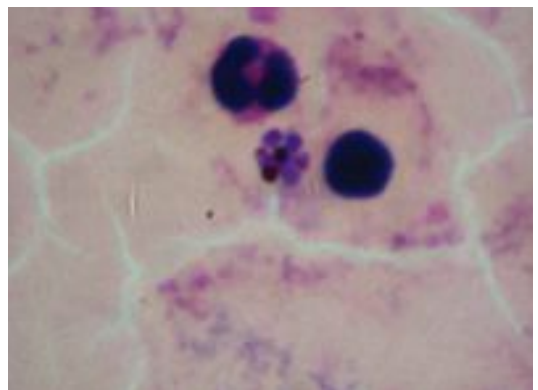
Trofozoite di *P. malariae*
goccia spessa 1000x (Col. MGG)



Trofozoite di *P. malariae*
striscio 1000x (Col. MGG)



Schizonte di *P. malariae*
striscio 1000x (Col. MGG)



Schizonte di *P. malariae*
goccia spessa 1000x (Col. MGG)

Babesia spp. e Theileria spp.

Al genere *Babesia* ordine Piroplasmida, phylum Apicomplexa appartengono i parassiti degli eritrociti di mammiferi, uccelli ed emazie umane.

Allo stesso gruppo tassonomico appartiene il genere *Theileria* che presenta cicli di sviluppo anche in linfociti e macrofagi di numerosi animali.

Phylum	Apicomplexa						
Classe	Sporozoa						
Sottoclasse	Coccidiasina					Piroplasmatina	
Ordine	Eucoccidiorida					Piroplasmida	
Sottordine	Eimeriorina				Haemosporina		
Famiglia	Eimeriidae	Cryptosporidiidae	Sarcocystidae		Plasmodiidae	Babesiidae	
Genere	<i>Isospora</i>	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Sarcocystis</i>	<i>Toxoplasma</i>	<i>Plasmodium</i>	<i>Babesia</i>	<i>Theileria</i>
Specie	<i>belli</i>	<i>parvum</i>	<i>hominis</i>	<i>gondii</i>	<i>falciparum</i>	<i>divergens</i>	
		<i>bayleyi</i>	<i>lindemanni</i>		<i>vivax</i>	<i>microti</i>	
			<i>suihominis</i>		<i>ovale</i>		
					<i>malanae</i>		

Posizione tassonomica di *Babesia* e *Theileria*

Babesia è un parassita molto comune negli animali a vita libera, poco comune, invece, nell'uomo, a cui viene trasmesso dal morso di zecche ixodidi.

Theileria, molto simile a *Babesia*, si differenzia soprattutto per la diversa localizzazione iniziale nell'ospite vertebrato, solo recenti studi di biologia molecolare hanno differenziato biologicamente le due specie.

Oltre alla trasmissione della babesiosi, attraverso il morso delle zecche, vi può essere una trasmissione per via trasfusionale sia di sangue intero che di emocomponenti (come eritrociti o piastrine), in cui pare che il parassita possa sopravvivere fino a tre settimane anche se congelato, infine, anche se si ritiene molto rara, sono stati identificati solamente due casi di tal genere, la via transplacentare costituisce una via di trasmissione.

Il genere *Babesia* venne, comunque, formalmente identificato nel 1888 ad opera di Victor Babes che stava studiando la causa della emoglobinuria febbrile nella mucca. Attualmente sono note più di 100 specie attribuite al genere *Babesia* ma di queste solo un numero assai limitato sono state identificate come causa di malattia nell'uomo: soprattutto, in Europa *Babesia divergens* (che colpisce anche i cervi e i bovini) e, negli Stati Uniti, *Babesia microti*, che ha come ospiti piccoli roditori.

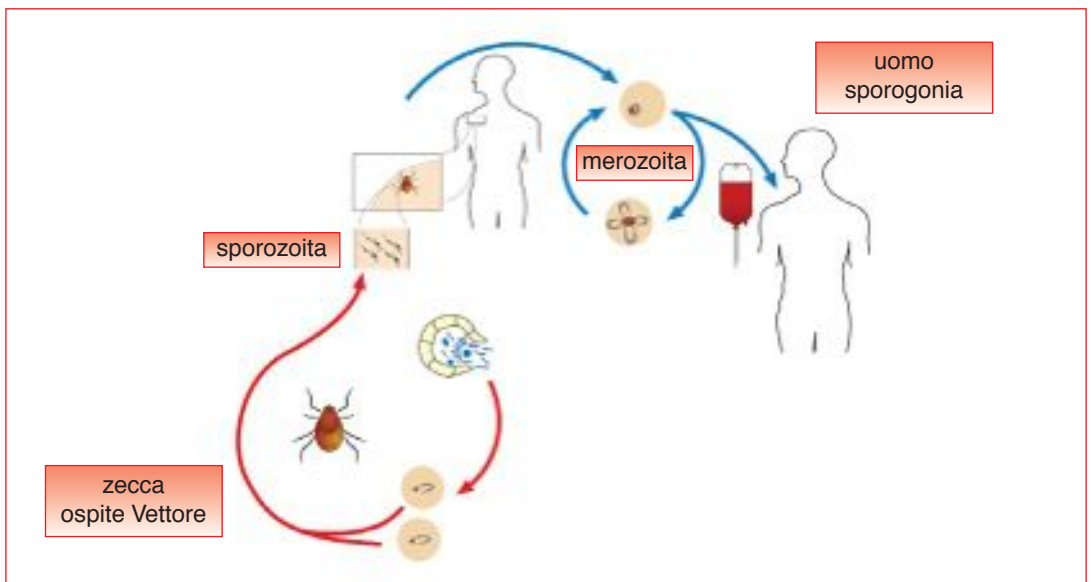
Il primo caso di babesiosi umana descritto risale al 1957 nella ex Jugoslavia.

Si trattò d'un agricoltore splenectomizzato che venne a morte, a causa d'una insufficienza renale dopo un quadro clinico grave con presenza d'anemia, emoglobinuria e

febbre, per un'infezione da *Babesia bovis*. Successivamente in Europa sono stati descritti circa trenta casi determinati, il più delle volte, da *Babesia divergens* (qualche autore sostiene che anche il caso del 1957 potrebbe essere stato causato da *Babesia divergens* la quale è difficile da distinguere morfologicamente dalla *B. bovis*). La mortalità, in base alla casistica, risulta essere abbastanza elevata (circa il 40%), specie in soggetti immunocompromessi, anziani o sottoposti a splenectomia. Recentemente, per mezzo delle metodiche di biologia molecolare è stato caratterizzato un ceppo, denominato EU1 (da *European union 1*) responsabile di due casi, rispettivamente in Italia e Francia. Sebbene siano stati riportati 136 casi di babesiosi nell'area di New York tra il 1970 ed il 1991 e 160 in Asia, a Nantuck, tra il 1969 ed il 1998, si ritiene che il numero d'infezioni sia molto più elevato. Alcuni dei casi si sono verificati a seguito di trasfusioni, mentre in Europa non si è a conoscenza di simili situazioni. Negli Stati Uniti d'America, il tasso di letalità da *Babesia microti* è all'incirca del 5%. Nel resto del mondo sono stati descritti pochi altri casi di babesiosi umana.

Parlando di zecche come vettori, rimane ancora molto importante l'eventualità di coinfezioni con gli agenti della malattia di Lyme o di ehrlichiosi, come già dimostrato da studi sierologici.

Babesia spp.: Ciclo Biologico



Babesia è un parassita obbligato, dixeno, svolge il suo ciclo biologico in due ospiti: l'ospite vertebrato costituito per lo più artiodattili, mammiferi domestici e selvatici e l'uomo e l'ospite vettore rappresentato da zecche della famiglia Ixodidae.

Le zecche si infettano ingerendo i parassiti contenuti negli eritrociti. Nell'intestino della zecca avviene la fase sessuata della riproduzione della *Babesia* (gamogonia) con

formazione degli sporozoit. Gli sporozoit, raggiunta la maturazione sono grandi 2,2 - 0,8 μ e presentano una morfologia piriforme, alcune centinaia di sporozoit vengono depositati nel derma, dell'ospite vertebrato durante il pasto ematico.

Gli sporozoit invadono i linfociti e si differenziano in schizonti multinucleati che successivamente, per gemmazione, danno origine a merozoit che lisano la cellula ospite e invadono i globuli rossi, evento che si verifica anche per gli sporozoit delle specie di *Babesia* che non hanno uno stadio preeritrocitario. Il microorganismo penetra nel globulo rosso tramite un fenomeno d'invaginazione, con formazione d'un vacuolo parassitoforo la cui membrana va incontro a disgregazione con liberazione del parassita piriforme. All'interno del globulo rosso i merozoit o gli sporozoit si trasformano in trofozoit che, dividendosi per scissione binaria, danno origine a dei merozoit (fino a quattro per volta).

I merozoit, visti al microscopio ottico, possono assumere varie forme, da quelle ad anello fino a quella, piÙ tipica di *Babesia*, d'una croce maltese.

Alcuni trofozoit, invece, aumentano di dimensioni e, dopo essere stati ingeriti da una nuova zecca, nel suo intestino danno origine a dei gametociti che, una volta usciti dai globuli rossi, si sviluppano a formare i gameti.

La localizzazione nell'ospite vertebrato è nelle emazia, mentre nell'ospite invertebrato è nelle cellule intestinali, nelle ghiandole salivari e negli ovociti.

Si osserva nell'uomo un contagio stagionale che va da maggio-settembre, in relazione alla maggiore probabilitÙ di essere a contatto con le zecche.

RACCOLTA DEL CAMPIONE

Diagnosticare una piroplasmosi puÒ risultare complicato a causa dei suoi sintomi poco specifici.

Si dovrebbe iniziare con un'anamnesi accurata che rilevi una storia di viaggi in aree endemiche e di eventuali punture di zecca. Si deve anche avere informazioni su eventuali trasfusioni effettuate in tempi recenti e sull'effettuazione d'una splenectomia.

Il prelievo deve essere fatto prima che il paziente inizi il trattamento terapeutico tenendo presente che i parassiti sono generalmente piÙ numerosi nel sangue durante l'accesso febbrile.

La raccolta del campione è simile a quella effettuata per la ricerca del plasmodio, quindi per ogni individuo, si devono allestire almeno una goccia spessa e uno striscio per la ricerca del protozoo.

La goccia spessa e gli strisci sottili vanno colorati con May-Grumwald Giemsa descritto in dettaglio nel capitolo generalitÙ.

La diagnosi di laboratorio si fonda:

- metodi diretti
 1. Diagnosi microscopica di preparati ematici
 2. Test molecolari
- metodi indiretti
 3. Immunofluorescenza (IFI)

1. Diagnosi microscopica di preparati ematici si basano essenzialmente, sulla ricerca del protozoo in strisci sottili di sangue periferico ottenuti previa puntura del polpastrello del paziente, fatti asciugare all'aria e colorati con colorazione di May-Grunwald-Giemsa, sull'allestimento e colorazione della goccia spessa (arricchimento) che va fatta asciugare a temperatura ambiente per 24 h e poi si colora con Giemsa diluito 1/10.

L'Osservazione, sia degli strisci che della goccia spessa, si effettua al microscopio ottico con obiettivo 100X

La parassitemia da *Babesia*, generalmente, è alta durante la fase acuta di infezione (5-80% di globuli rossi parassitari)

Nello striscio di sangue colorato con May-Grunwald Giemsa si ricercano:

- Forme ad anello A)
- Forme a pera B)
- Tetradi (patognomoniche)
(**croce di Malta**) C)

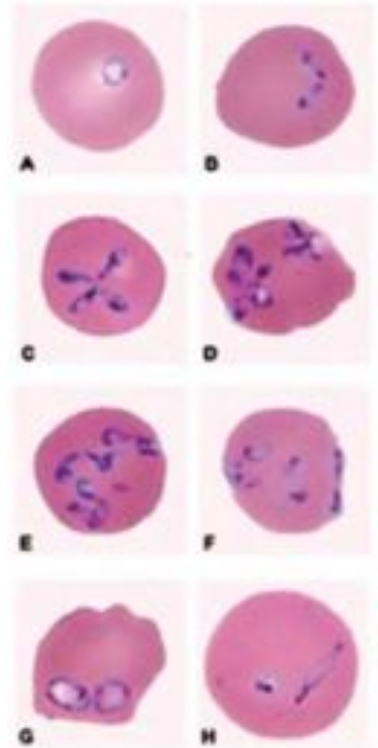
Si può notare che le forme ad anello vedi A) sono molto simili ai trofozoiti del *Plasmodium falciparum*, con nuclei periferici ben colorati ed un grosso vacuolo, pertanto per identificare con certezza la *Babesia* bisogna ricercare, nello striscio, le tetradi:

quattro merozoiti all'interno d'un globulo rosso uniti dall'apice in senso verticale ed orizzontale (configurazione a croce maltese) vedi C) patognomoniche, ed osservare la mancanza di pigmento (emozoinico) negli eritrociti.

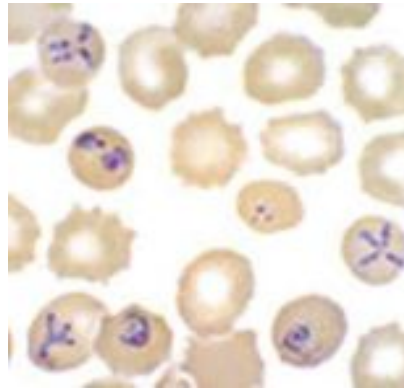
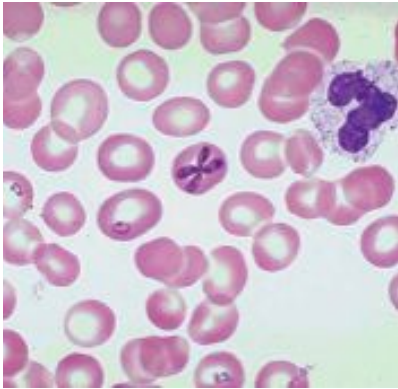
In caso di babesiosi, inoltre si possono rinvenire merozoiti extracellulari.

La diagnosi differenziale con la malaria è un elemento assai importante in quanto una diagnosi inaccurata può ritardare un trattamento specifico, che potrebbe risultare assai pericoloso. Oltre alle forme ad anello sono riscontrabili configurazioni piriformi i trofozoiti B) che possono essere singoli o in coppia.

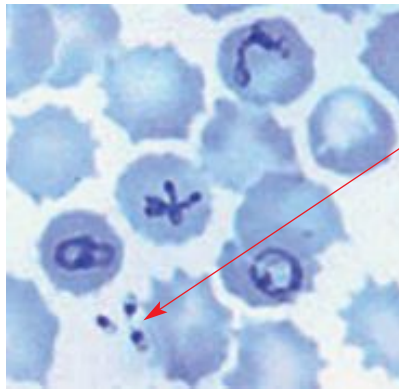
Si possono anche notare forme filamentose od amorphe che vengono considerate come forme degenerative vedi E),F),G),H).



Forme intraeritrocitarie di *Babesia* spp.



Babesia spp. striscio 1000x (Col. MGG)



Merozoiti
extracellulari

Babesia spp. striscio 1000x (Col. MGG)

Il limite del test

I limiti della diagnosi microscopica sono dati dall'abilità dell'operatore, dal tempo dedicata all'osservazione microscopica e dal livello della parassitemia presente nello striscio osservato.

2. Test molecolari

Le metodiche d'amplificazione genica basate sulla reazione a catena della polimerasi, sono per la diagnosi di Babesiosi/Theileriosi le più specifiche e sensibili.

Sono state, infatti, sviluppate PCR sia per individuare *Babesia microti* (= *Theileria*) che *Babesia divergens* attraverso l'amplificazione di regioni conservate, in particolare amplificazione del gene completo dell'RNA ribosomiale 18S.

Alcuni studi hanno individuato una rapida eliminazione del DNA del microorganismo in assenza d'una sua replicazione, pertanto si ritiene che la rivelazione del materiale genomico possa intendersi come un indice d'infezione attiva.

Metodi indiretti

3. Immunofluorescenza Indiretta (IFI)

Si tratta, comunque, d'una metodica valida solo per l'evidenziazione di *Babesia microti* (= Theileria), con buona sensibilità (88-96%) e specificità (90-100%), in quanto per *B. divergens* essa risulta essere poco specifica.

In commercio sono disponibili vetrini con emazie parassitate da *Babesia microti*

La metodica utilizzata con l'impiego di questi vetrini è descritta di seguito:

- Scomplementare il siero del paziente in esame a 56°C. per 30'
- Effettuare delle diluizioni a raddoppio del siero e cimentare ciascuna diluizione con un pozzetto del vetrino test
- Incubare in camera umida a 37°C per 30'.
- Lavare con PBS 7,2 delicatamente e lasciar asciugare.
- Deposare 20 µl. di coniugato anti IgG, IgM, IgA umane legate ad isotiocianato di fluoresceina.
- Incubare in camera umida a 37°C per 30'.
- Lavare con PBS 7,2 delicatamente e lasciar asciugare.
- Depositare una goccia di glicerina tamponata sul pozzetto, coprire con coprioggetto.

Osservare con microscopio a fluorescenza l'intero preparato con obiettivo 40x.

I protozoi presenti sul vetrino appariranno di color verde mela sul fondo nero-marrone se nel siero del paziente sono presenti anticorpi specifici.

Il titolo anticorpale significativo per determinare la positività di un risultato è di 1: 64

Il limite del test

Nel paziente con babesiosi gli anticorpi si sviluppano solamente in una fase tardiva dell'infezione ed in effetti la metodica ad immunofluorescenza indiretta viene usata, come controllo, nei casi in cui la diagnosi da *Babesia microti* sia già stata posta con l'esame microscopico diretto.

Il titolo anticorpale può rimanere elevato dai 13 mesi fino a 6 anni ed alcuni autori hanno notato che una diminuzione più lenta del livello delle IgG si può associare ad una persistente presenza del protozoo.

Emoflagellati

Generalità

Gli emoflagellati appartengono allo stesso phylum dei flagellati intestinali i Sarcostigofora, ma caratterizzano l'ordine dei Kinetoplastida, famiglia dei Trypanosomatidae.

phylum	Sarcostigofora								
Subphylum	Mastigophora								
Classe	Zoomastigophora								
Ordine	Kinetoplastida		Diplomonadida		Retortamonadida		Trichomonadida		
Sottordine	Trypanosomatina								
Famiglia	Trypanosomatidae		Hexamitidac	Tetranitidac			Trichomonadidae		Monocercomonadide
Genere	<i>Leishmania</i>	<i>Trypanosoma</i>	<i>Giardia</i>	<i>Enteromonas</i>	<i>Retortamona</i>	<i>Chilomastix</i>	<i>Trichomonas</i>	<i>Pentatrichomonas</i>	<i>Dientamoeba</i>
Specie	<i>major</i>	<i>cruzi</i>	<i>intestinalis</i>	<i>hominis</i>	<i>intestinalis</i>	<i>mesnilis</i>	<i>vaginalis</i>	<i>hominis</i>	<i>fragilis</i>
	<i>aethiopica</i>	<i>rangeli</i>					<i>lenax</i>		
	<i>infantum</i>	<i>brucei gambiense</i>							
	<i>tropica</i>	<i>brucei rhodiense</i>							
	<i>mexicana</i>	<i>brucei brucei</i>							
	<i>donovani</i>								
	<i>archibaldi</i>								

Posizione tassonomica di *Leishmania* spp. e *Trypanosoma* spp.

A questa famiglia di emoflagellati appartengono solo due generi che parassitano l'uomo: ***Leishmania* e *Trypanosoma***.

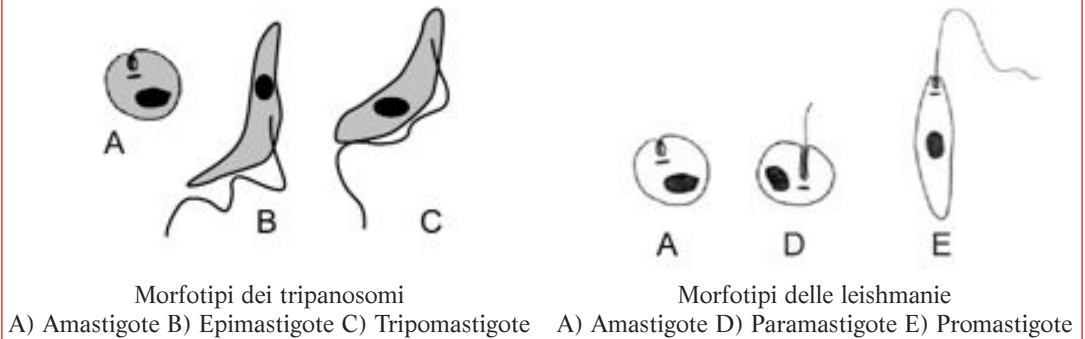
Entrambi sono parassiti, per lo più asessuati, dixeni trasmessi da insetti ematofagi.

I due generi sono morfologicamente e biologicamente molto simili. Sono polimorfi, cioè nel corso del loro ciclo biologico nell'uomo e negli insetti le varie specie passano attraverso alcuni stadi di sviluppo assumendo forme diverse.

I morfotipi più importanti sono:

- Tripomastigote
- Epimastigote
- Promastigote
- Paramastigote
- Amastigote.

Fig. 1



Negli amastigoti (A) il corpo è tondeggiante, privo di flagello e di membrana ondulante, presenta solo un abbozzo di flagello.

Negli epimastigoti (B) è presente il flagello che origina in vicinanza del nucleo e la membrana ondulante è, quindi, più breve.

Nei tripomastigoti (C) la forma allungata contiene un singolo nucleo diploide centrale, in prossimità del cinetoplasto si origina il flagello che percorso tutto il protozoo delinea la membrana ondulante e termina verso la parte anteriore del corpo come flagello libero.

Nei paramastigoti (D) compare il flagello, e sono una forma di sviluppo dei promastigoti nell'insetto vettore.

Nei promastigoti (E) il flagello si origina davanti al nucleo ed emerge dall'estremità anteriore; in essi è assente la membrana ondulante.

Gli emoflagellati appartenenti a:

Leishmania spp. nel loro ciclo di sviluppo assumono solo il primo, quarto e quinto morfotipo (amastigote, paramastigote e promastigote), vedi figura 1;

Trypanosoma brucei gambiense e *Trypanosoma brucei rhodesiense* solo il terzo e il secondo (tripomastigote e epimastigote).

Trypanosoma cruzi solo il primo, il secondo e il terzo (amastigote, epimastigote e tripomastigote), vedi figura 1.

Trypanosoma cruzi

Le tripanosomiasi umane sono costituite da due entità nosogeografiche ben distinte, la tripanosomiasi americana o malattia di Chagas, e la tripanosomiasi africana o malattia del sonno.

La prima è causata da *Trypanosoma cruzi*, trasmesso principalmente mediante le deiezioni di cimici triatomine in gran parte dell'America Latina.

La seconda è causata da due sottospecie di *Trypanosoma brucei*: *T. b. gambiense* e *T. b. rhodesiense*, protozoi salivari che vengono trasmessi all'uomo con la puntura di glossine (mosche tse-tse) in aree geografiche differenti dell'Africa tropicale.

Tripanosomiasi americana:

È una tipica zoonosi (circa 150 specie di mammiferi selvatici possono fungere da serbatoio e oltre 100 specie di triatomine sono in grado di trasmettere il parassita), ma in alcune circostanze è possibile una trasmissione interumana intradomiciliare, sostenuta da alcune specie di cimici adattate ad ambienti domestici. Ulteriori vie di trasmissione sono quella trasfusionale (10% delle infezioni) e congenita (1-3%).

Distribuzione geografica

La malattia nell'uomo è diffusa dal Texas fino alla Patagonia

Elevati tassi di prevalenza si riscontrano in numerose aree rurali degli stati Latino-Americani, con circa 18 milioni di individui infetti.

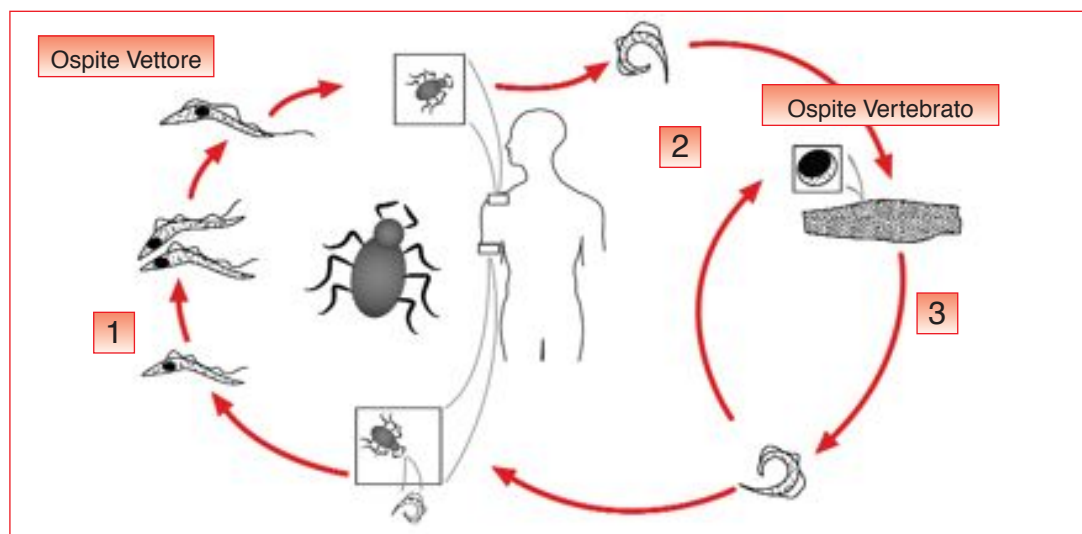
In Italia vengono diagnosticati ogni anno presso l'ISS 2-4 casi di malattia, soprattutto in bambini adottati dalle aree rurali della zona americana endemica.

La possibilità di infezione del viaggiatore turista o lavoratore è estremamente rara.



■ Distribuzione di *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi: Ciclo biologico



Il ciclo biologico di questo protozoo comprende il passaggio attraverso insetti vettori (grosse cimici ematofaghe della sottofamiglia Triatominae) in cui i tripomastigoti ingeriti con la puntura si trasformano in epimastigoti di 13-35 μ che aderiscono alle pareti dell'ampolla rettale e si riproducono per divisione binaria e si trasformano di nuovo in tripomastigoti infettanti.

Questi, (punto 1 della figura), vengono espulsi con le feci delle cimici durante il pasto e penetrano attraverso la ferita nell'uomo.

Nell'uomo i tripomastigoti vengono fagocitati dai macrofagi e assumono la forma di amastigoti che si moltiplicano per scissione binaria, quindi, si trasformano nuovamente in tripomastigoti, (punto 2 della figura), che, dopo rottura della cellula ospite attraverso il torrente circolatorio raggiungono le fibre muscolari striate dei muscoli scheletrici e del cuore, dove si trasformano di nuovo in amastigoti e si moltiplicano formando dei nidi allungati (punto 3 della figura).

Gli amastigoti hanno morfologia simile a quelli di *Leishmania* (1.5-4 μ di diametro); i tripomastigoti presenti nel sangue hanno dimensioni variabili e dotati di un grosso cinetoplasto (quelli più lunghi arrivano fino a 15-20 μ , quelli più tozzi sono spesso incurvati a falce).

Le Triatominae suggono di notte il sangue dell'uomo e di numerosi mammiferi; esse pungono di preferenza il viso dei dormienti; già durante il pasto defecano, spesso sulla pelle e sulle mucose umane trasmettendo così il protozoo.

Clinicamente, si distinguono 3 stadi di infezione, non sempre presenti nello stesso individuo:

1. una forma acuta, associata alla moltiplicazione del protozoo che segue l'infezione;
2. una forma indeterminata, senza manifestazioni specifiche nella quale il parassita appare quiescente;
3. una forma cronica, che può coinvolgere il miocardio e/o il tratto digestivo e che è principalmente determinata da fenomeni autoimmunitari.

Trypanosoma brucei

Tripanosomiasi africana:

La prevalenza delle infezioni è stimata in circa 2 milioni.

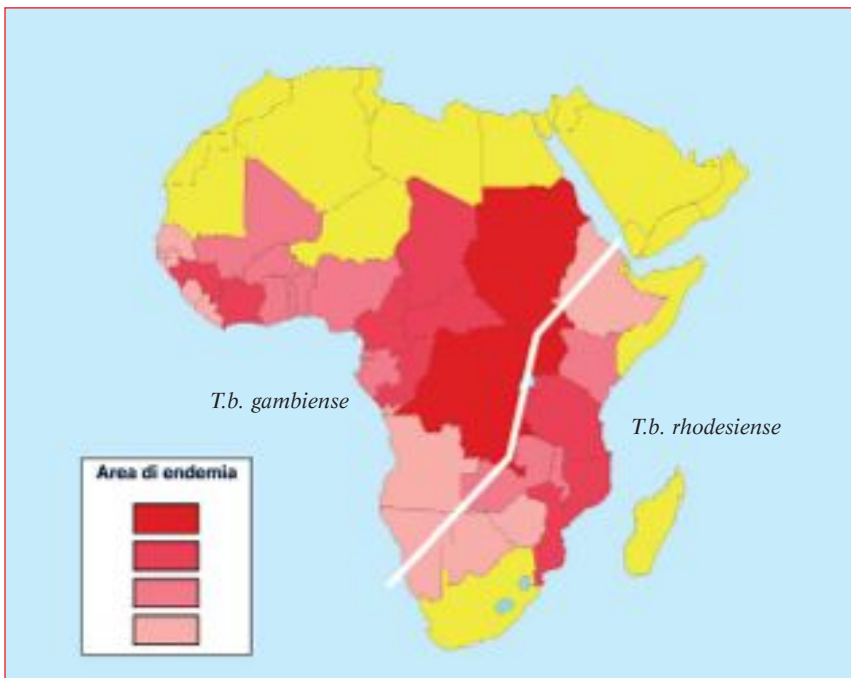
Per il suo carattere prevalentemente antroponotico (solo il maiale può costituire un'ulteriore fonte di infezione) l'entità sostenuta da *T. b. gambiense* assume frequentemente caratteristiche epidemiche legate a migrazioni umane o attività lavorative lungo i corsi d'acqua.

I casi dovuti a *T. b. rhodesiense* sono più rari e sono associati ad attività di lavoro o turismo in ambiente di savana, dove gli animali selvatici ne costituiscono il serbatoio primario. In Italia i casi di tripanosomiasi africana accertati presso l'ISS sono rarissimi (<1/anno).

Distribuzione geografica

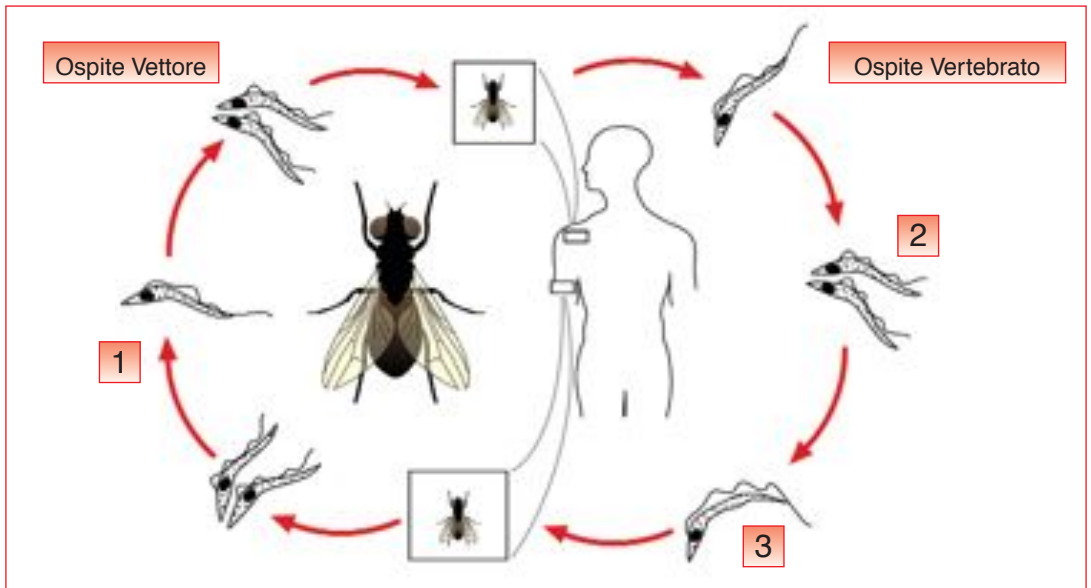
Interessa oltre 30 stati della fascia tropicale africana a sud del Sahara.

È costituita da due entità separate geograficamente dalla Valle del Rift: un'antropo-nosi prevalente causata da *Trypanosoma brucei gambiense* diffusa nelle zone umide fluviali dell'Africa centro-occidentale, e una zoonosi causata da *Trypanosoma brucei rhodesiense* nelle savane delle regioni africane sudorientali.



Distribuzione di *Trypanosoma brucei*

Trypanosoma brucei: Ciclo Biologico



Il ciclo biologico comprende una moltiplicazione asessuata nell'insetto vettore costituito da "mosche tse-tse" delle specie *Glossina pallidipes*, *G. morsitans* e *Glossina palpalis*.

I tripomastigoti ingeriti dall'insetto iniziano a moltiplicarsi nell'intestino medio, poi si trasformano in epimastigoti, che raggiungono le ghiandole salivari e si trasformano in tripomastigoti infettanti (punto 1 della figura)

Iniettati con la puntura nel sangue dei mammiferi, vivono da tripomastigoti come parassiti esocellulari nel sangue, linfa e nel liquido cerebro-spinale. Nel sangue assumono due forme; la prima è una forma ematica "snella" (circa 30μ) ed è spesso in fase di divisione, (punto 2 della figura); la seconda forma, definita "tozza", lunga solo 18μ , poco mobile, è una forma di resistenza agli anticorpi. (punto 3 della figura).

Le due sottospecie, *Trypanosoma brucei gambiense* e *T.b. rhodesiense*, sono indistinguibili morfologicamente e si differenziano per la distribuzione geografica, le specie delle glossine che le trasmettono e la diversa azione patogena sull'uomo.

Trypanosoma brucei rhodesiense, diffuso nelle savane della parte sud-orientale dell'Africa tropicale, è trasmesso abitualmente da *Glossina pallidipes* e *G. morsitans*, mosche tse-tse zoofile della savana.

T. brucei gambiense, l'agente eziologico della malattia del sonno, è invece diffuso in zone più umide, ad es. nello Zaire e nei paesi del golfo di Guinea; è trasmesso da uomo a uomo da *Glossina palpalis*, insetto che può vivere in natura anche nutrendosi solo sull'uomo. Questo protozoo si va progressivamente adattando all'uomo, in cui l'infezione, prima di provocare la morte, perdura per molti mesi con elevata parassitemia, il che facilita un nuovo passaggio nelle glossine.

La forma clinica della malattia differisce sostanzialmente tra le due entità, in quanto l'evoluzione dell'infezione da *T. b. rhodesiense* è molto più rapida e grave di quella

da *T. b. gambiense*, che presenta invece un decorso di tipo cronico noto come ‘malattia del sonno’ nella sua fase terminale.

In questo ultimo caso la malattia presenta due stadi caratteristici:

1. uno stadio emolinfatico, associato alle ondate parassitemiche che seguono l’infezione, e
2. uno stadio meningoencefalitico, determinato dall’invasione del sistema nervoso centrale da parte dei parassiti. In questa fase le principali lesioni sono di tipo autoimmunitario.

Le tripanosomiasi africane vanno sospettate nei soggetti provenienti dalle zone endemiche con febbri irregolari, linfadenite, manifestazioni cutanee, forti cefalee o sintomatologia nervosa.

RACCOLTA DEL CAMPIONE

Oltre alle modalità di prelievo consigliate per la ricerca dei plasmodi (prelievo di sangue periferico con allestimento di strisci sottili e goccia spessa), si effettua un preparato allestendo un vetrino con una piccola goccia di sangue, coperta da un coprioggetto, che inviato subito in laboratorio va osservato al microscopio in tempi brevi per evitare l’immobilità degli eventuali parassiti.

Inoltre va effettuato anche un prelievo di sangue venoso posto in una provetta con EDTA, e un prelievo di liquido cefalo-rachidiano (liquor) per le localizzazioni cerebrali del *Trypanosoma* africano.

La diagnosi di laboratorio si fonda:

- metodi diretti
 1. Esame a fresco
 2. Colorazione di Giemsa
 3. Concentrazione dal prelievo in EDTA
 4. Esame del buffy-coat
 5. Esame del liquor
 6. Coltura
- metodi indiretti
 7. Ricerca degli anticorpi anti-*Trypanosoma* (IHA).
 8. Ricerca degli anticorpi anti-*Trypanosoma* (IFI)

1. Esame a fresco

La goccia di sangue fresca, posta su di un vetrino, coperta con coprioggetto deve essere subito osservata al microscopio ottico con obiettivo 10x e 40x per evidenziare, se presente, un rapido movimento tra le emazie. A 40x i tripanosomi appaiono rifrangenti e si evidenziano facilmente, a contrasto di fase o con intensità luminosa ridotta del microscopio ottico e ridotta apertura del condensatore.

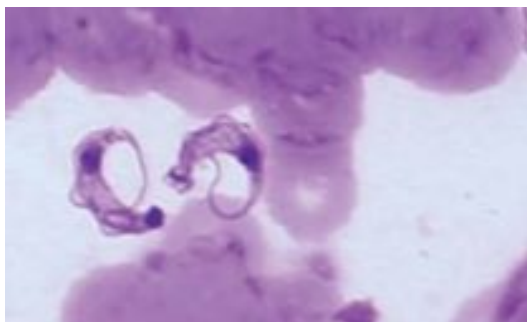
2. Colorazione di Giemsa

La ricerca di *Trypanosoma* si completa con l'osservazione degli strisci di sangue colorati con May-Grunwald Giemsa che permette di evidenziare, se presenti, i tripanosomi come tripomastigoti pleiomorfi di 18-35 μ di lunghezza, cinetoplasto puntiforme, situato posteriormente, colorato in rosso porpora.

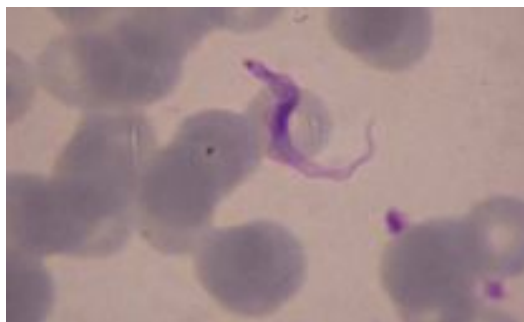
Dal cinetoplasto parte un unico flagello che si prolunga verso il margine esterno della membrana ondulante e termina verso la parte anteriore del corpo come flagello libero. Il nucleo color violetto è situato centralmente al corpo del protozoo che appare colorato in rosa pallido.

Si possono identificare, al microscopio ottico, le varie specie di *Trypanosoma*:

<i>Trypanosoma brucei</i>	corpo di 18-35 μ con cinetoplasto puntiforme.
<i>Trypanosoma cruzi</i>	corpo di 12-30 μ spesso disposto a "C", cinetoplasto grande e rotondo.
<i>Trypanosoma rangeli</i>	corpo più sottile di 27-32 μ con cinetoplasto piccolo posto in posizione terminale e nucleo situato anteriormente.



Trypanosoma cruzi striscio 1000x (Col. MGG)



Trypanosoma brucei striscio 1000x (Col. MGG)

3. Ricerca dopo concentrazione dal prelievo in EDTA

Dal prelievo venoso posto in EDTA si preleva 1ml di sangue e si miscela, in una provetta da centrifuga, con 10ml di formalina al 1-2%. Si attende 10' che le emazie siano ben emolizzate. Si centrifuga a 3000 giri per 5'; si elimina il sovrantante e si risospinde il sedimento con soluzione fisiologica. Si depone una goccia di sedimento su un vetrino sabbiato, con i dati del paziente e data del prelievo, e si effettuano strisci sottili. I vetrini asciugati vanno colorati con May Grunwald-Giemsa ed osservati al microscopio ottico con obiettivo 100x.

4. Esame del buffy-coat:

si esegue centrifugando a 3000 giri per 10-15 minuti il sangue prelevato in una provetta con EDTA in modo da ottenere la separazione del plasma dagli eritrociti, fra le due fasi si dispongono i leucociti e in caso di positività i tripanosomi.

Con questo materiale si allestisce uno striscio e una goccia spessa per la colorazione May Grunwald-Giemsa

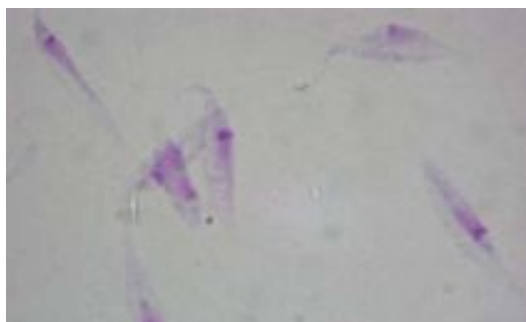
5. Esame del liquido cefalo-rachidiano (nelle forme meningoencefaliche):

per la ricerca del *Trypanosoma brucei gambiense*

Il liquor, prelevato con la puntura intrarachidiale, quasi sempre limpido, presenta aumento delle proteine, riduzione del glucosio, presenza di pleocitosi linfo-monocitaria. Deve essere tenuto a temperatura ambiente, non deve essere refrigerato o diluito e deve pervenire in laboratorio al massimo entro 24 ore.

In laboratorio, viene centrifugato a basso numero di giri, 200 giri per 10', per evitare di distruggere gli eventuali parassiti presenti.

Si elimina la maggior parte di liquido sovrannatante, si risospende il sedimento e si allestiscono dei vetrini per l'esame a fresco e per la colorazione May Grunwald-Giemsa. All'esame microscopico si evidenziano i tripanosomi.



Tripanosomi nel liquor 1000x (Col. MGG)

6. Coltura

I Tripanosomi sono facilmente coltivabili utilizzando il terreno EMTM (Tobie mod. da Evans) essendo lo stesso terreno utilizzato per la coltura di *Leishmania* si rimanda la descrizione al paragrafo dedicato alla coltura *Leishmania*.

La diagnosi di laboratorio può essere eseguita anche in maniera indiretta, cioè con la ricerca degli anticorpi specifici, prodotti dal paziente in esame, utilizzando l'emoagglutinazione indiretta e la immunofluorescenza.

Metodi indiretti

7. Ricerca degli anticorpi anti-*Trypanosoma*

Emoagglutinazione indiretta (IHA)

Prelievo di sangue in provetta da sierologia

Il siero del campione in esame viene scomplementato a 56° per 30'

La ricerca viene effettuata con il metodo dell'emoagglutinazione indiretta (IHA), si utilizza un kit contenente emazia umane sensibilizzate con antigeni di *Trypanosoma cruzi*, un siero di controllo positivo e un siero di controllo negativo.

Si esegue seguendo il protocollo operativo conservato nel kit in uso.

In caso di positività la diagnosi sierologica viene confermata con un altro metodo, cioè l'immunofluorescenza indiretta.

La ricerca anticorpale viene eseguita anche sul sovranatante del liquor e/o su altri campioni biologici liquidi.

8. Ricerca degli anticorpi anti-*Trypanosoma*

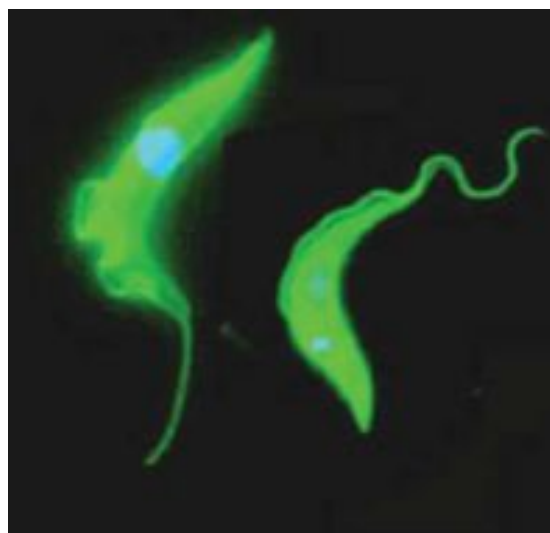
Immunofluorescenza indiretta (IFI)

In commercio sono disponibili vetrini con antigeni di *Trypanosoma* per la ricerca degli anticorpi

La metodica utilizzata con l'impiego di questi vetrini è descritta di seguito:

- Scomplementare il siero del paziente in esame a 56°C.
- Effettuare delle diluizioni a raddoppio del siero e cimentare ciascuna diluizione con un pozzetto del vetrino test
- Incubare in camera umida a 37°C per 30'.
- Lavare con acqua distillata delicatamente e lasciar asciugare.
- Deposare 20 µl. di coniugato anti IgG umane legato ad isotiocianato di fluoresceina.
- Incubare in camera umida a 37°C per 30'.
- Lavare con acqua distillata delicatamente e lasciar asciugare.
- Depositare una goccia di glicerina tamponata sul pozzetto, coprire con coprioggetto.
- Osservare con microscopio a fluorescenza l'intero preparato con obiettivo 40x.

I protozoi presenti sul vetrino appariranno di color verde mela sul fondo nero-marone se nel siero del paziente sono presenti anticorpi specifici.



Trypanosoma spp.: Immunofluorescenza Positiva

Generalità

Nel 1885 Cunningham descrisse una lesione cutanea (Bottone di Oriente); su sezioni di tessuto osservò la presenza di “corpi” di $12.6\mu \times 8.8\mu$ (probabilmente macrofagi) contenenti “corpi nucleoidi” che egli ritenne essere spore di Mycetozoa e che denominò “BATTERI DI DELHI”.

Nel 1903 Leishman osservò al microscopio strisci prelevati dalla milza di un soldato morto 2 giorni prima a Dum-Dum (Calcutta) e descrisse gli agenti eziologici come “corpuscoli ovoidali o rotondeggianti di 2-3 μ di diametro”.

Nel 1903 Donovan lesse l'articolo di Leishman ed osservando strisci di biopsia splenica di un indiano di 12 anni sofferente di febbri irregolari, che non presentava parassiti malarici nel sangue, osservò corpi che non ritenne essere né artefatti splenici né tripanosomi degenerati.

Nel 1906 Leishman, divenuto professore di Patologia a Londra, dopo aver infettato sperimentalmente un ratto con tripanosomi africani, notò la somiglianza dei tripanosomi degenerati con gli agenti eziologici che aveva visto a Calcutta. Fu il primo a descrivere gli agenti eziologici della Leishmaniosi viscerale ed a riconoscere la relazione con i tripanosomi.

Nel 1908 Nicolle e Comte segnarono per la prima volta la Leishmaniosi canina.

Attualmente l'O.M.S. stima che l'incidenza annuale delle leishmaniosi è di 2 milioni di casi di cui 500.000 di Leishmaniosi viscerale e 1.500.000 di Leishmaniosi cutanee causate da 15 specie di interesse umano, prevalentemente nei paesi della fascia equatoriale e sub-equatoriale.

Le leishmaniosi umane possono essere distinte in tre tipologie cliniche:

cutanea;

mucocutanea;

viscerale.

Sono causate da un unico genere (*Leishmania*) ma da diverse specie. La diffusione di queste specie è limitata ad alcune aree geografiche ed è peraltro, legata alla presenza di specifici insetti vettori.

La classificazione in specie si basa sulla distribuzione geografica, sulla trasmissione operata da specie diverse di flebotomi, sullo sviluppo preferenziale in determinati organi e tessuti dell'uomo, sulla diversa patogenicità, sulle caratteristiche immunologiche, sugli isoenzimi e sul DNA mitocondriale del protozoo.

Le leishmaniosi cutanee del Vecchio Mondo sono diffuse in focolai discontinui in Asia, Medio Oriente, Africa settentrionale e nei paesi mediterranei. Sono causate da specie diverse di leishmanie con quadri clinici diversi. *Leishmania tropica* (l'agente eziologico del "bottonone d'Oriente") è diffusa in Medio Oriente, Turchia e Grecia. *Leishmania major* è diffusa in Asia Centrale ed in Africa. *L. aethiopica* è presente sull'altipiano etiopico. Ceppi dermatropi di *L. infantum* sono presenti nel bacino del Mediterraneo ma questa specie è stata anche importata in tempi storici in America latina, dove è nota con il nome di *L. chagasi*. L'infezione è spesso asintomatica. Nel bottonone d'Oriente nel luogo dell'inoculazione si forma il granuloma che si estende ulcerando ed esponendo il tessuto sottostante. I parassiti si localizzano nelle cellule reticolo-endoteliali del derma, ai margini delle lesioni (dove i parassiti vanno ricercati per la diagnosi microscopica), nei vasi e nei linfonodi vicini. La diagnosi è trattata nel IV capitolo.

Le leishmaniosi cutanee e mucocutanee del Nuovo Mondo sono diffuse nell'America latina.

Serbatoi di questa zoonosi sono mammiferi selvatici e domestici, mentre l'uomo è un ospite accidentale. Le forme più gravi sono caratterizzate dalla tendenza all'invasione delle mucose e delle cartilagini rino-oro-faringee.

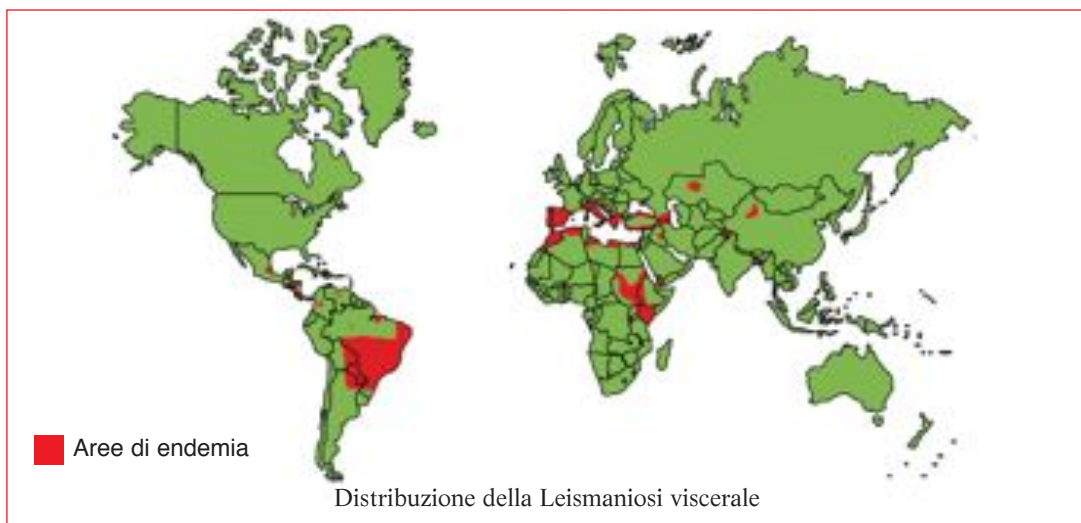
I flebotomi vettori appartengono al genere *Lutzomyia*.

La leishmaniosi viscerale (L. V.) è causata da *Leishmania donovani* (agente di antroponosi), e da *L. infantum/chagasi* (agente di zoonosi). È diffusa nelle zone tropicali e subtropicali (Asia Centrale e Meridionale, Medio Oriente, Africa Equatoriale e Settentrionale e bacino del Mediterraneo).

In Sud America è causata da *L. chagasi*, un parassita geneticamente identico a *L. infantum* di cui attualmente è considerato sinonimo.

In Italia è causata da *L. infantum* ed il vettore principale della leishmaniosi viscerale è *Phlebotomus perniciosus* (in piccoli areali *P. neglectus* e *P. ariasi*).

Il serbatoio di questa zoonosi è costituito dai cani (in cui *L. infantum* si moltiplica anche nei tegumenti facilitando l'infezione dei flebotomi).





■ Aree tradizionali di endemia ■ Focolai di recente introduzione

In Italia, sono presenti entrambe le forme di malattia. La diffusione della leishmaniosi viscerale (L. V.) è localizzata, prevalentemente, nel versante tirrenico della penisola; focolai di endemia sono localizzati nelle zone rurali e periurbane della fascia costiera e nelle aree collinari ad ovest della dorsale appenninica, fino ad un'altitudine di 500-600 m. s.l.m. e nelle isole maggiori e minori. In particolare, in Campania, esistono focolai attivi di endemia di L. V. nelle isole (in particolare ad Ischia), nelle zone vesuviane e nel casertano.

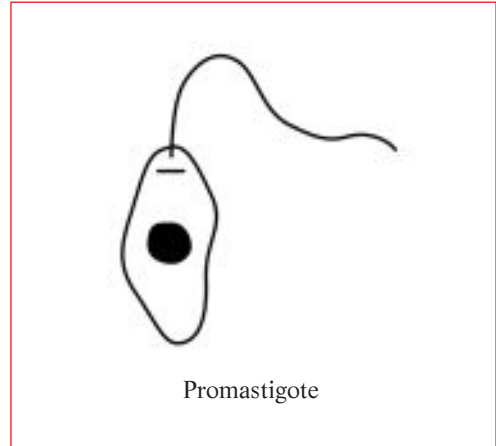
Nei vertebrati le leishmanie vivono nel citoplasma delle cellule reticolo-endoteliali nello stadio di amastigoti: corpuscoli rotondi od ovoidali di 1.5-4 μ di diametro con un grosso nucleo ovoidale posto ad un lato del citoplasma ed un cinetoplasto a forma di bastoncino posto lateralmente al nucleo. Nel citoplasma è presente l'abbozzo intracellulare del flagello (rizonema), che origina vicino al cinetoplasto.



Amastigote

Il vettore

Negli insetti vettori, e nelle colture in vitro, le leishmanie si presentano nello stadio di promastigoti con il corpo allungato (15 μ di lunghezza) ed un flagello altrettanto lungo. Le femmine di flebotomo succhiano gli amastigoti presenti nel sangue, derma e nella linfa dei mammiferi infetti; i parassiti si trasformano in promastigoti e si moltiplicano nel proventricolo dell'insetto. Dopo quattro-cinque giorni risalgono fino alla valvola esofagea, smettono di dividersi e diventano infettanti (promastigoti metaciclici). Quando l'insetto punge nuovi mammiferi, i promastigoti vengono rigurgitati e iniettati nel nuovo ospite.

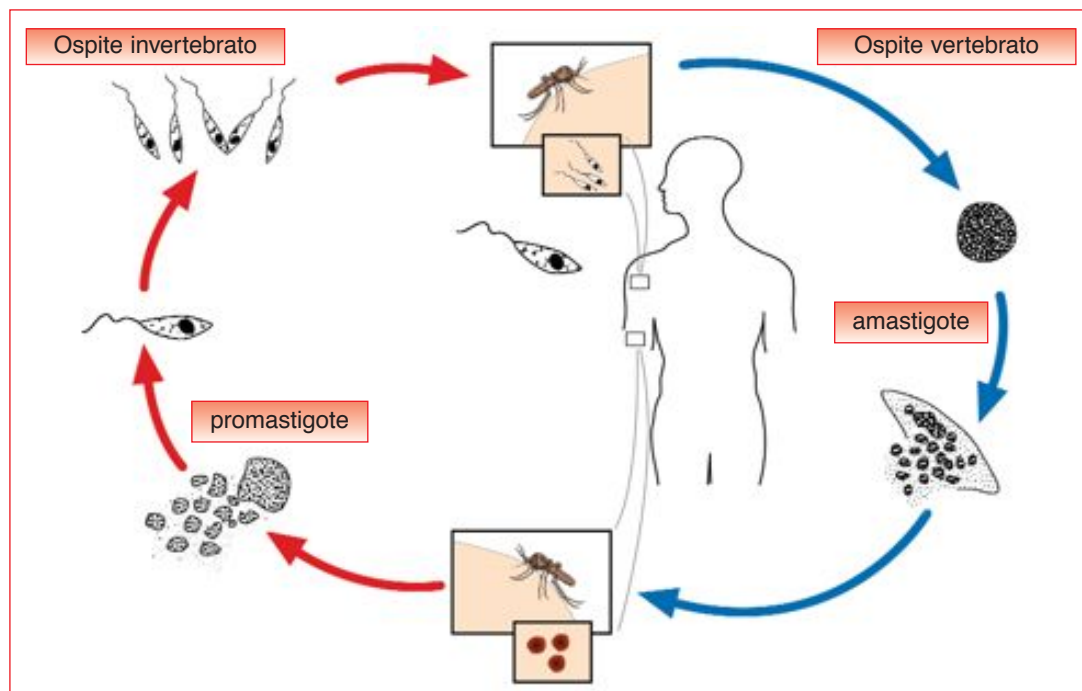


Promastigote



Phlebotomus spp.

Leishmania spp.: Ciclo Biologico



Leishmania spp. è un protozoo dicensi; svolge il suo ciclo biologico in due distinti ospiti, uno vertebrato ospite definitivo, nelle nostre zone, prevalentemente il cane, occasionalmente l'uomo; l'altro invertebrato il vettore che, nelle nostre aree geografiche, è prevalentemente il *Phlebotomus perniciosus*.

Il protozoo, nella forma amastigote (aflagellata), penetra nell'insetto quando questo punge l'ospite vertebrato e qui si sviluppa trasformandosi in promastigote (forma flagellata); dopo la maturazione i promastigoti migrano nella proboscide e vengono trasmessi, mediante puntura, all'ospite vertebrato.

L'ospite vertebrato più colpito, nelle nostre zone, è il cane, che quindi funge da serbatoio, l'uomo è solo un ospite occasionale.

Nell'uomo l'infezione inizia quando i promastigoti penetrano nel sangue attraverso la puntura dell'insetto e vengono, prontamente, fagocitati dalle cellule macrofagiche.

All'interno di queste cellule, i promastigoti, si trasformano in amastigoti in conseguenza del cambiamento della temperatura e dell'ambiente circostante; la parte della *Leishmania* impegnata per questa trasformazione è il cinetoplasto, una struttura di DNA extranucleare.

Segni clinici

Leishmania spp. nell'uomo, si localizza, elettivamente, nei macrofagi della milza, del fegato, dei linfonodi e del midollo osseo; il quadro clinico che, quindi, si osserva, generalmente, in corso di leishmaniosi viscerale è una marcata iperplasia della milza, iperplasia del fegato, iperplasia dei linfonodi, febbre irregolare talvolta remittente ed una crescente astenia.

Dal punto di vista ematochimico si riscontrano, nel paziente con leishmaniosi, salvo rare eccezioni, marcata anemia, leucopenia, piastrinopenia, ipergammaglobulinemia ed ipoalbuminemia.

La malattia può avere esito infausto in assenza di una diagnosi tempestiva e di una corretta terapia.

A tal fine l'Osservatorio epidemiologico della regione Campania d'intesa con l'Istituto Superiore di Sanità ha individuato alcuni centri di riferimento per la corretta diagnosi e terapia di questa patologia, tra cui, per i pazienti adulti, quello dell'Ospedale Cotugno.

RACCOLTA DEL CAMPIONE

Il biopsato midollare viene prelevato con ago-aspirazione attraverso puntura intrasternale, il frammento di tessuto aspirato viene in parte strisciato su vetrini sabbatiati, con nome del paziente e data del prelievo, ed in parte raccolto in provette con EDTA. L'aspirato splenico, viene prelevato con ago-aspirazione ecoguidata e il frammento di tessuto aspirato viene in parte strisciato su vetrini sabbatiati, con nome del paziente e data del prelievo, ed in parte raccolto in provette con EDTA.

La diagnosi di laboratorio, si fonda, diversamente a tutte le altre diagnosi parassitarie fino ad ora esaminate, in prima istanza sulla messa in evidenza degli anticorpi specifici anti-*Leishmania*, nel siero del paziente in esame, con il metodo dell'immunofluorescenza indiretta, e, in caso di positività del test, alla ricerca ed alla coltura del protozoo nel materiale prelevato tramite biopsia midollare e/o aspirato splenico.

Per la ricerca, di anticorpi specifici, con la tecnica dell'immunofluorescenza indiretta, si utilizza come antigene un ceppo standard di promastigoti di *Leishmania infantum*, fornito dall'ISS, coltivato e tenuto vitale con passaggi ogni 10-15 giorni in terreno di coltura fresco la cui fase solida viene fornita dall'Istituto Zooprofilattico di Portici.

Per l'esecuzione del test viene preparata, per ciascun siero in esame, una serie di diluizioni per raddoppio, partendo da una diluizione 1/80.

Dopo aver processato il vetrino con l'antigene test, attraverso la procedura dettagliatamente descritta di seguito, il vetrino viene osservato con microscopio a fluorescenza e in caso di positività del test si osserveranno i promastigoti colorati in verde mela su fondo nero; il titolo anticorpale si determina sulla base della fluorescenza del pozzetto su cui è stata deposta la maggiore diluizione del siero. Si considera il test positivo già ad una diluizione di 1/80.

- metodi indiretti
 1. Immunofluorescenza Indiretta (IFI)

- metodi diretti
 2. Colorazione May-Grumwald Giemsa (MGG)
 3. Coltura

1. Immunofluorescenza Indiretta (IFI)

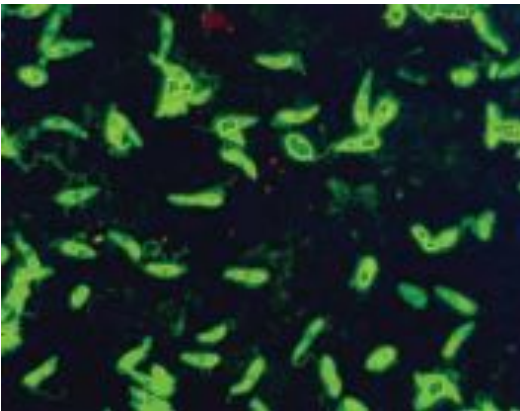
Prelievo in provetta da sierologia

Il siero del campione viene scongelato a 56°C per 30'

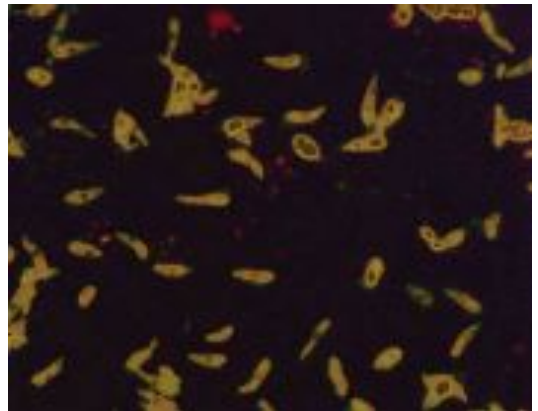
Al momento dell'esecuzione del test il vetrino con l'antigene viene tolto dal congelatore e tenuto per 15' a temperatura ambiente, lavato in PBS 7,2 ed asciugato a temperatura ambiente.

- Si preparano diluizioni scalari, a raddoppio, del siero in esame e del controllo positivo a partire da una diluizione 1/20 (50µl del siero + 950µl di PBS 7,2)
- Su ciascun pozzetto del vetrino test si pongono 20µl di ciascuna diluizione del siero e del controllo positivo.
- Si incuba a 37°C per 30' in camera umida.
- Si lava il vetrino in PBS 7,2
- Si asciuga a temperatura ambiente
- Si pongono 20µl del coniugato (anti IgG-A-M umane coniugate con isotiocianato di fluoresceina diluito 1/30) con l'aggiunta di una goccia di blu evans, su ciascun pozzetto del vetrino test.
- Si incuba a 37°C per 30' in camera umida,
- Si lava e si asciuga come sopra
- Si monta il vetrino con glicerina tamponata e si osserva al microscopio a fluorescenza a 40x

In caso di positività si osserveranno le Leishmanie, sul vetrino test, intensamente verde brillante, la titolazione è data dall'ultimo pozzetto che presenta fluorescenza.



Promastigoti di *Leishmania infantum*: IFI+



Promastigoti di *Leishmania infantum*: IFI-

Il limite del test

Pur essendo molto sensibile e specifico, tale test, presenta dei limiti: positività aspecifiche si sono osservate in pazienti che avevano malattie autoimmuni; anticorpi anti-DNA, anti-nucleo e anti-tubulina rendono fluorescenti **aspecificamen-**

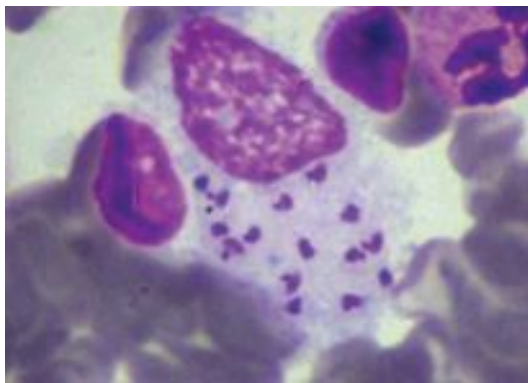
te, rispettivamente il cinetoplasto, il nucleo, l'intero corpo della *Leishmania* posta sul vetrino test, questa positività, però, è presente solo a bassi titoli 1/80 e 1/160.

Per contro la negatività del test non sempre fa escludere un'infezione da *Leishmania* in corso; pazienti immunocompromessi, come i soggetti HIV, non sempre producono anticorpi specifici in corso di infezioni, pertanto la diagnosi di certezza si fonda sulla messa in evidenza del protozoo nell'adatto campione biologico che è rappresentato dal biopsato midollare e/o aspirato splenico.

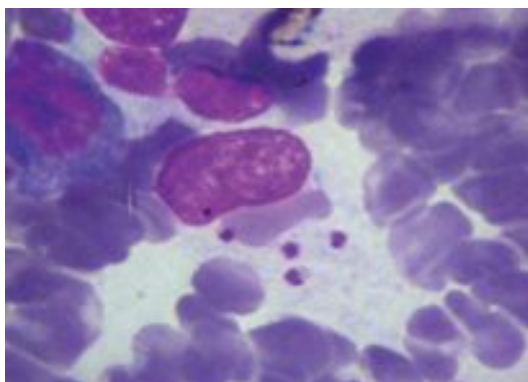
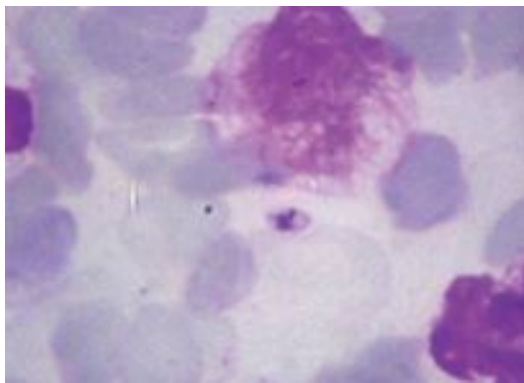
2. Colorazione May-Grumwald Giemsa (MGG)

I vetrini strisciati, lasciati asciugare, vengono colorati con May-Grumwald Giemsa descritta nel capitolo generalità ed osservati al microscopio ottico con obiettivo 100x. In caso di positività si risconteranno le leishmanie intra ed extracellulare.

Gli amastigoti di *Leishmania* appaiono come corpiccioli rotondeggianti od ovoidali della grandezza di 1.5-4 μ con nucleo eccentrico, cinetoplasto bastoncellare affianco al nucleo, entrambi colorati in rosso violaceo e con citoplasma colorato in azzurro, i parassiti si riscontrano prevalentemente raggruppati all'interno del citoplasma dei macrofagi, talvolta si evidenziano tra gli spazi intercellulari.



Leishmania infantum: Biopsia midollare 1000x (Col. MGG)



Leishmania infantum: Aspirato splenico 1000x (Col. MGG)

3. Coltura

Il materiale raccolto in provetta con EDTA si utilizza per l'allestimento della coltura che viene effettuata utilizzando il terreno di Tobie modificato da Evans (EMTM 1987)

Il terreno abbastanza complesso è costituito da una fase solida e una fase liquida.

La fase solida:

Estratto di carne	3 gr/l
Peptone	5 gr/l
NaCl	8 gr/l
Agar	20 gr/l



Costituenti del terreno di coltura

Preparazione della fase solida del terreno di Tobie:

L'agar viene sciolto, autoclavato a 121°C per 20', raffreddato a 45°C; ad esso viene aggiunto il 15% di sangue di coniglio prelevato mediante puntura cardiaca.

L'agar viene distribuito in tubi e lasciato solidificare a becco di clarino.

I tubi, così preparati, sono mantenuti in frigo per non più di 20 giorni.

La fase liquida è una miscela di Sali:

KCl	0,4 g./l
Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	0,006 g./l
KH ₂ PO ₄	0,006 g./l
CaCl ₂	0,185 g./l
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,1 g./l
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,1 g./l
NaCl	8 g./l
L-Prolina	1 g./l

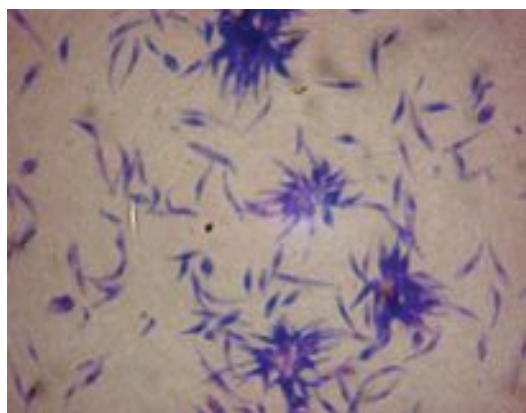
A questa miscela di Sali viene aggiunto :

Siero fetale di vitello	5-10% del volume finale
Gentamicina	250 µg/ml per inibire i batteri
5-Fluorocitosina	500 µg/ml per inibire i funghi

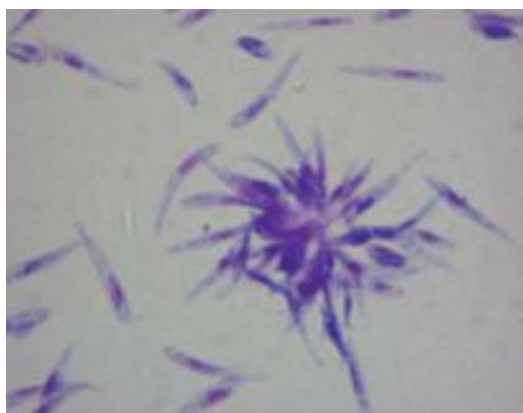
Per ciascun terreno completo vengono inoculate 3-5 gocce di biopsato e viene incubato a 23° C per al massimo 30 giorni; trascorsi i primi 10-15 giorni si effettua una prima osservazione microscopica, prelevando una goccia di fase liquida, per evidenziare la positività della coltura, in caso di negatività, si effettua una ulteriore semina: 2-3 gocce di fase liquida della prima coltura si inoculano in terreno di coltura fresco. In caso di positività della coltura si evidenzieranno, al microscopio ottico, i promastigoti che appaiono come flagellati mobili lunghi 10-15µ con nucleo centrale ed il cinetoplasto all'estremità anteriore del corpo del protozoo da cui si origina un unico flagello lungo fino a 15µ.

La coltura di *Leishmania* isolata dal materiale biologico è molto importante per la tipizzazione del protozoo, che si ottiene attraverso l'analisi elettroforetica degli isoenzimi e lo studio del DNA cinetoplastico; ciò raggruppa *Leishmania* spp. in Zimodemi e Schizodemi e quindi si identifica la specie di leishmania isolata.

- La tipizzazione ha consentito di confermare la perfetta identità genetica delle leishmanie isolate dall'uomo, dal cane e dal flebotomo vettore.
- Ha consentito, inoltre, di definire che le LEISHMANIOSI VISCERALI in Italia sono tutte causate da *LEISHMANIA INFANTUM ZIMODEMA MON 1* e varianti.



Promastigoti di *Leishmania infantum*
coltura in vitro 200x



Promastigoti di *Leishmania infantum*
coltura in vitro 400x

Refertazione e registrazione dei risultati

I risultati degli esami parassitologici devono essere espressi con la massima chiarezza, ricorrendo il meno possibile a sigle ed abbreviazioni che possono lasciare dubbi interpretativi.

Sul referto devono essere riportati le specie di parassiti identificati e nel caso di malaria il grado di parassitemia. Anche per gli emoflagellati è sempre utile segnalare la carica osservata nel campione biologico che va espressa come: Rari, Alcuni, Diversi o Numerosi.

Sul referto viene anche descritto il metodo che è stato utilizzato per effettuare la ricerca parassitologica.

I risultati devono essere controllati prima della refertazione e della consegna sia dall'esecutore dell'esame che dal responsabile dell'equipe. L'archiviazione dei risultati ottenuti deve essere eseguita con adeguato sistema informatico; la registrazione informatizzata consente di ricavare statistiche sui parassiti identificati, sui materiali biologici esaminati, sui tempi di esecuzione degli esami, sui costi dei materiali utilizzati, ecc.

La malaria, la leishmaniosi viscerale e le tripanosomiasi sono soggette a notifica obbligatoria (DM del 15 dicembre 1990; Circolare Ministeriale n. 22 del 12 maggio 1992).

I laboratori delle Aziende Sanitarie Locali diagnosticano i casi clinici mediante osservazione al microscopio degli strisci.

I casi positivi vengono notificati dalle Autorità Sanitarie regionali al Dipartimento della Prevenzione del Ministero della Salute con l'invio della scheda di notifica standard (contenente dati demografici, epidemiologici, clinici e parassitologici) **e i vetri- ni su cui è stata effettuata la diagnosi.**

Il Reparto di Malattie Trasmesse da Vettori dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS) provvede alla conferma di diagnosi di tutti i casi denunciati.

Capitolo III

Liquido di lavaggio broncoalveolare (BAL), broncoaspirato (BAS) ed espettorato indotto (EI)

Le malattie respiratorie affliggono il genere umano in ogni parte del mondo; le polmoniti sono al 6° posto tra le cause di morte più frequente.

Il termine polmonite indica uno stato d'infiammazione acuta della parte del polmone destinata agli scambi respiratori, caratterizzata dalla presenza di liquido negli alveoli polmonari (piccole sacche alle terminazioni dei bronchioli), con conseguenti gravi difficoltà nella respirazione.

Può interessare gli alveoli (polmonite alveolare) e/o il tessuto interstiziale (polmonite interstiziale); può coinvolgere un intero lobo (polmonite lobare) o solo una parte di un lobo polmonare (polmonite lobulare), oppure interessare gli alveoli contigui ai bronchi (broncopolmonite)

Anche nell'ambito delle infezioni broncopolmonari si parla oggi di polmoniti emergenti: si tratta sia di infezioni sostenute da patogeni "nuovi", in quanto la loro importanza è stata riconosciuta solo recentemente, sia di infezioni in "nuovi" pazienti, vale a dire categorie di soggetti portatori di deficit immunologici primitivi o secondari all'impiego di terapie altamente immunosoppressive, come sono quelle eseguite con antiblastici, la terapia radiante e terapie antirigetto.

In queste particolari categorie di soggetti prevalgono, quali agenti eziologici delle infezioni respiratorie, le specie microbiche definite "opportunisti", fra le quali, vi sono specie già note che hanno però acquisito caratteristiche particolari (resistenza agli antibiotici, ruolo da saprofita a patogeno ecc.), l'incidenza delle varie specie è strettamente correlata con l'ambiente considerato (comunità, ospedale), con l'età del soggetto, con le condizioni del sistema immunitario ecc.

L'opportunismo di molti agenti infettivi è già noto da tempo agli infettivologi ed agli oncologi, ma, recentemente, si è riscontrata una sempre maggiore incidenza di tali patologie in pazienti immunocompromessi, sia per cause patologiche, quali neoplasie in generale ed emolinfopatie, in particolare, sia per cause iatrogene quali terapie con corticosteroidi, terapie radianti ed immunodepressive anti-rigetto applicate ai pazienti sottoposti a trapianti d'organo.

L'AIDS ha notevolmente contribuito ad ampliare ed aggravare il problema della patologia infettiva opportunistica; nell'AIDS, infatti, sono numerose le infezioni secondarie, provocate da microrganismi di natura virale, batterica, fungina e parassitaria che trovano condizioni favorevoli di sviluppo a causa del deficit dell'immunità cellulo-mediata a carico dei T- linfociti.

Il prevalere delle varie specie si è modificato nel corso degli anni, proprio in considerazione dei motivi più sopra ricordati. In particolare le specie definite "opportunisti", assumono oggi particolare rilievo nei pazienti immunocompromessi, anche se si può parlare di patogeni "emergenti" anche per la popolazione immunocompetente o comunque non vistosamente immunodepressa.

Dalla fine degli anni '30 fino agli inizi degli anni '60 si definiva polmonite atipica quella non sostenuta dal *Pneumococco*; nel 1961 è stato isolato e riconosciuto per la prima volta *Mycoplasma pneumoniae*, e quindi, si sono attribuite a questo microrganismo le forme di polmonite, cosiddetta, atipica.

Successivamente si è potuto osservare che molti microrganismi potevano essere responsabili di processi patologici a carico del polmone, e ciò è avvenuto grazie alle più affinate metodiche diagnostiche di cui i laboratori di microbiologia si sono dotati nel corso degli anni. Anche se non esiste a tutt'oggi una definizione ufficiale di polmonite atipica, si fa comunemente riferimento, con questo termine, alle infezioni sostenute da microrganismi non facilmente isolabili dalla coltura dell'espettorato eseguita con i metodi convenzionali; oggi riteniamo possibili agenti eziologici della polmonite atipica diversi agenti batterici, virali e alcuni protozoi.

Limitandoci al campo degli agenti infettivi costituiti da protozoi e funghi unicellulari responsabili di processi patologici a carico del polmone, il primo posto è occupato da *Pneumocystis jiroveci*, di seguito da *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium* e microsporidi.

Anche se, ormai, *Pneumocystis* è posizionata nel regno dei Funghi, questo capitolo tratterà in particolare le modalità di raccolta e le metodiche di laboratorio finalizzate alla sua identificazione perché, per tradizione, rimane ancora oggi di competenza dei parassitologi; *Toxoplasma* è trattato in dettaglio nel IV capitolo e *Cryptosporidium* e i microsporidi sono trattati in dettaglio nel I capitolo.

La polmonite da *P. jiroveci* si conferma in assoluto la più frequente infezione opportunistica rilevabile in pazienti AIDS e trapiantati di razza bianca, con circa il 60% di incidenza.

La diagnosi di certezza, di infezione respiratoria determinata da protozoi, si basa naturalmente sull'identificazione dell'agente eziologico isolato da idoneo materiale biologico.

I materiali biologici di elezione per la ricerca dei parassiti sono nell'ordine:

- **Biopsia polmonare (Biopsia transbronchiale, Agobiopsia percutanea)**
- **Lavaggio bronco-alveolare(BAL)**
- **Espettorato indotto**
- **Espettorato**

Nella pratica quotidiana si utilizzano solo gli ultimi tre, in quanto le biopsie sono estremamente invasive per il paziente.

I campioni più utilizzati sono: Espettorato indotto e Lavaggio bronco-alveolare.

RACCOLTA DEL CAMPIONE

Espettorato

Immediatamente prima della raccolta del campione di espettorato si devono far praticare al paziente dei gargarismi con acqua, e si fanno lavare i denti.

Aprire il contenitore sterile di propilene, nel momento della raccolta del campione, invitare il paziente a tossire ed espettorare e, facendo attenzione a non contaminare le pareti esterne del contenitore, raccogliere l'espettorato, chiudere il contenitore ed inviare, quindi, il campione il più presto possibile, al laboratorio.

Si raccomanda di non superare il limite di 2 h tra il prelievo del campione e la consegna al laboratorio.

Espettorato indotto (EI)

L'espettorato indotto (più idoneo dell'espettorato per la ricerca dei parassiti) si ottiene facendo inalare al paziente soluzione ipertonica salina al 5%; operare su paziente a digiuno da almeno 8 ore.

Invitare il paziente a lavarsi accuratamente i denti con spazzolino e dentifricio.

Far gargarizzare il paziente con acqua senza colluttori e rimuovere con una garza le eventuali placche di mugugno.

Far inalare per aerosol 20-30 ml di soluzione ipertonica salina al 3-5% per 20'.

Invitare il paziente ad espettorare e raccogliere in un barattolo sterile l'espettorato, indicando che si tratta del primo espettorato.

Invitare di nuovo il paziente a lavarsi la bocca ed a gargarizzare.

Far inalare una seconda volta 10 ml di soluzione ipertonica salina per 10'.

Invitare il paziente a tossire profondamente ed espettorare.

Raccogliere l'espettorato in un secondo barattolo sterile ed indicare che si tratta della seconda raccolta.

Inviare subito i due barattoli al laboratorio con la scheda della richiesta esame opportunamente compilata.

Questo campione biologico risulta poco invasivo, richiede, cooperazione attiva del paziente, la collaborazione di personale infermieristico, l'utilizzo di un nebulizzatore; il tempo di esecuzione del prelievo è di circa 15'-20'.

I problemi che possono insorgere durante il prelievo sono: astenia ed ipossemia del paziente.



Contenitore per la raccolta dell'espettorato indotto

Lavaggio bronco-alveolare (BAL)

Il liquido di lavaggio broncoalveolare si preleva, previa anestesia locale del paziente, con la introduzione del fibroscopio fino al bronco lobare medio.

Si iniettano aliquote di 20-50 ml di fisiologica sterile, preriscaldata a 37°C, attraverso il fibroscopio, quindi si aspira delicatamente quanto iniettato, questa operazione viene eseguita 2-3 volte.

La terza volta la quantità di fisiologica aspirata viene raccolta in un contenitore sterile ed inviata in laboratorio.

Risulta abbastanza invasivo, richiede cooperazione passiva del paziente, la collaborazione di personale medico (fibroscopista); il tempo di esecuzione del prelievo è di circa 20'; i problemi che si possono avere sono legati al rifiuto del paziente di sottoporsi al prelievo, astenia ed ipossemia.

In laboratorio il campione deve essere concentrato (non è necessaria la fluidificazione); la lettura microscopica è più agevole; la sensibilità è vicina al 100%.

Le caratteristiche del prelievo dei campioni biologici è schematizzata nella tabella che segue:

Espettorato indotto	Lavaggio bronco-alveolare
<ul style="list-style-type: none">• Lavaggio preliminare di denti e bocca.• Aerosol con nebulizzatore ad ultrasuoni di soluzione salina per 10'-20'.• Raccolta di due espettorazioni successive (la seconda è più ricca di eventuali parassiti)	<ul style="list-style-type: none">• Previa anestesia locale si introduce il fibroscopio fino al bronco lobare medio.• Si iniettano aliquote di 20-50 ml di fisiologica sterile, preriscaldata a 37°C, aspirando delicatamente ogni volta per due tre volte. La terza volta si aspira e si raccoglie in contenitore
<ul style="list-style-type: none">• Poco invasivo• Cooperazione attiva del paziente• Ausilio di personale infermieristico• Nebulizzatore• 15'-20'• Problemi: astenia, ipossemia.	<ul style="list-style-type: none">• Abbastanza invasivo• Cooperazione passiva del paziente• Fibroscopista• Fibroscopio• 20'• Problemi: Rifiuto del paziente

Caratteristiche del prelievo dell'Espettorato indotto e del BAL

Preparazione del campione

In laboratorio si procede al trattamento del campione biologico sia che si tratti di espettorato, espettorato indotto che di BAL o BAS

Si raccomanda di lavorare sotto cappa a flusso laminare, muniti di mascherina e guanti monouso perché i campioni in esame sono molto pericolosi per la possibile formazione di aerosol infetti.

L'operatore osserva la consistenza del campione, se molto mucoso occorrerà molto fluidificante, se fluido vengono messe nel campione poche gocce di fluidificante.

Il fluidificante (Sputasol), soluzione di dithiotreitolo, si scioglie con 5 ml d'acqua distillata, si pongono 0.5/1 ml di Sputasol diluito più 1 ml d'acqua per campione, quindi il campione così trattato viene lasciato per circa mezz'ora a temperatura ambiente.

Dopo questo tempo si versa il campione in provetta e si centrifuga a 2000 giri per 10'. Si elimina il sovrnatante, si pongono 10ml d'acqua distillata e si ricentrifuga a 2000 giri per 10'. Si elimina il sovrnatante e dal sedimento, risospeso in poca acqua distillata, si prelevano 20µl per:

- allestire 2 vetrini con pozzetto per la fluorescenza
- 2 vetrini sabbiati, per le colorazioni.

Espettorato e Espettorato indotto	Liquido di lavaggio broncoalveolare
Fluidificazione <ul style="list-style-type: none">• Concentrazione• Lettura delicata• Sensibilità: 70-100%	<ul style="list-style-type: none">• Lettura più agevole• Sensibilità: vicina al 100%
<ul style="list-style-type: none">• Mescolare il campione con eguale quantità di soluzione mucolitica• Agitare con Vortex ed incubare per 10' a 37°C• Se necessario ripetere l'agitazione e l'incubazione• Diluire con acqua distillata e centrifugare a 2.000 giri per 10'	<ul style="list-style-type: none">• Centrifugare 10-20 ml del campione per 10' a 1.500 – 2.000g• Risultati analoghi si ottengono con la citocentrifugazione
Si depositano 20 µl di sedimento su ciascun vetrino da allestire e si fissa in metanolo per 10'	

Treatment of the sample of Induced Sputum and BAL

RICERCA ED IDENTIFICAZIONE DEI PROTOZOI

È questa la fase più importante e delicata dell'attività del parassitologo.

È necessario analizzare i seguenti punti:

- Tempi di osservazione dei preparati
 - Metodo di osservazione dei campioni al microscopio
 - Schemi e tavole iconografiche dei parassiti
 - Allestimento di preparati stabili
 - Risoluzione dei casi dubbi
 - Capacità professionale dei componenti dell'equipe
-
- Tempi di osservazione dei preparati
I tempi di osservazione, al microscopio, dei campioni preparati devono essere prolungati, specialmente nella ricerca di parassiti che sono patogeni anche se presenti in bassa concentrazione nei campioni biologici (Tachizoiti di *Toxoplasma gondii*, cisti di *P. jiroveci* e oocisti di *Cryptosporidium* spp.).
 - Metodo di osservazione dei campioni al microscopio
Il metodo di ricerca, al microscopio, deve essere aggiustato in base alla grandezza del protozoo da ricercare: la ricerca di Tachizoiti di *Toxoplasma gondii* richiede l'utilizzo dell'obiettivo 100x, mentre le cisti di *P. jiroveci* e oocisti di *Cryptosporidium* spp. vengono ricercate con obiettivi 40x.
 - Schemi e tavole
Durante la lettura del preparato al microscopio è fondamentale avere a disposizione tavole e schemi riportanti le caratteristiche morfologiche dei parassiti per consentire una valutazione corretta dei preparati osservati.
 - Allestimento di preparati stabili
È fondamentale, allestire, dal campione biologico da analizzare, diversi preparati stabili: strisci per colorazioni permanenti, e apposizioni su vetrini con pozzetto per l'immunofluorescenza.
 - Risoluzione dei casi dubbi
È utile stabilire contatti con centri di riferimento riconosciuti per risolvere dubbi interpretativi. Talora può essere necessario inviare campioni e/o preparati stabili a tali centri per avere conferma di una diagnosi difficile.
 - Capacità professionale dei componenti dell'equipe
La diagnostica parassitologica è fondata prevalentemente sull'individuazione e sul riconoscimento microscopico dei parassiti nei materiali biologici. L'attività lavorativa del Parassitologo è, perciò, in gran parte dedicata all'osservazione microscopica dei preparati, **pertanto il Parassitologo deve, necessariamente,**

conoscere il ciclo biologico e le modalità di trasmissione dei protozoi, che hanno grande importanza per la scelta, il trattamento, le modalità di invio del campione biologico e deve, necessariamente, conoscere la morfologia, la grandezza e le affinità tintoriali del protozoo da ricercare.

Nel polmone i protozoi maggiormente responsabili di processi patologici nell'uomo sono:

- *Pneumocystis jiroveci*
- *Toxoplasma gondii*
- *Cryptosporidium* spp.

La diagnosi di laboratorio si fonda, essenzialmente:

Metodi diretti

1. May Grunwald-Giemsa (MGG):

per evidenziare i tachizoiti di *Toxoplasma gondii*, e i trofozoiti di *Pneumocystis* spp. La colorazione di May Grunwald-Giemsa permette di associare la diagnosi parassitologica ad un esame del materiale cellulare presente nel campione, cellule ciliate, macrofagi, cellule alveolari, linfociti, polinucleati, eosinofili.

Consente, così, di stimare la qualità del campione in esame.

Si considera "idoneo" quel campione che ha un numero di neutrofili per campo microscopico, osservando a 10x, da 10 a 25.

Quando si osserva che la presenza di muco e di cellule epiteliali sono inferiori a 10 per campo microscopico si considera il campione non idoneo (**classificazione di Bartlett**).

2. Ziehl-Neelsen mod:

per evidenziare i microrganismi acido-alcool resistenti quindi, in campo protozoario, le oocisti di *Cryptosporidium*.

3. Blue di Toluidina:

per evidenziare la parete cistica di *Pneumocystis* che apparirà blue con banda trasversale; contenuto cistico e trofozoiti invisibili.

4. Immunofluorescenza:

per cimentare il campione con monoclonali diretti alle cisti di *Pneumocystis*, oocisti di *Criptosporidium* e ai Tachizoiti di *Toxoplasma*.

5. Test molecolare

Pneumocystis jiroveci

Generalità

Pneumocystis spp. è un microrganismo eucariota ubiquitario in grado di colonizzare i polmoni di molte specie di mammiferi uomo compreso, localizzandosi elettivamente a livello degli alveoli polmonari.

Pneumocystis carinii, fu osservato per la prima volta nel 1909 da Chagas nei polmoni di un bambino malnutrito (ma egli ritenne che si trattasse di una fase del ciclo di *Trypanosoma cruzi*, da lui scoperto in quel periodo);

nel 1910 Antonio Carini ipotizzò che si trattasse di entità diverse;

nel 1912 Delanoe confermò l'ipotesi di Carini e successivamente diversi AA. riconobbero *P. carinii* come agente eziologico di polmoniti interstiziali plasmacellulari di neonati prematuri e distrofici e poi in bambini ed adulti immuno-compromessi per patologie tumorali e per cause iatrogene (anti-neoplastici, corticosteroidi, farmaci antirigetto).

Dal 1981 *P. carinii* venne segnalata come la più frequente causa di morbilità e mortalità nei soggetti con infezione da HIV. Gradualmente profilassi e terapie adeguate hanno contribuito ad una notevole riduzione del numero di casi e della gravità delle infezioni.

La posizione tassonomica di *P. carinii*, è stata argomento di numerosi studi, alcuni AA. lo considerano un Micete, altri un Protozoo.

Gli argomenti a favore dell'appartenenza ai Protozoi sono: l'aspetto ameboide del trofozoite, la mancata crescita sui terreni di coltura dei miceti, la sensibilità ai farmaci anti-protozoari e l'insensibilità agli anti-fungini; gli argomenti a favore dei Miceti sono: la somiglianza delle forme cistiche alle ascospore dei lieviti, l'affinità tintoriale ai coloranti dei miceti.

Ancora nel 1978 Hughes definì *P. carinii* come un microrganismo anomalo, una sorta di "ponte" tra protozoi e funghi.

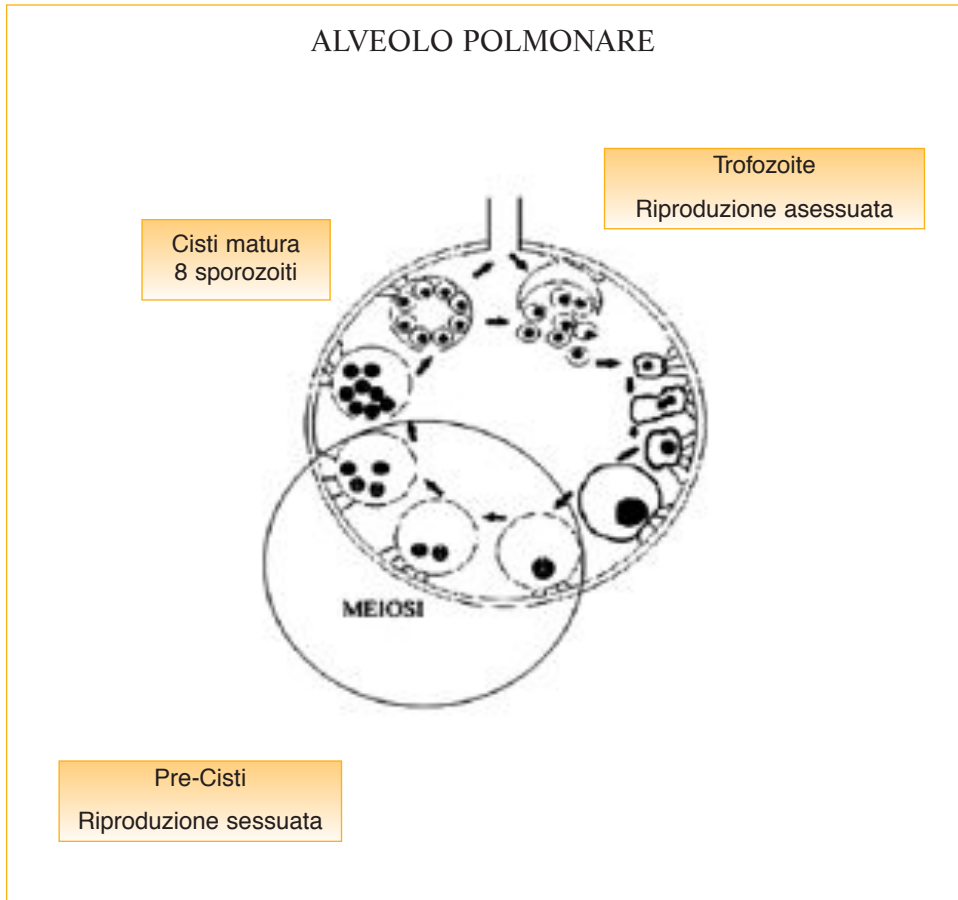
Gli studi di biologia molecolare e di microscopia elettronica hanno chiarito con certezza, oggi, che *Pneumocystis* appartiene al regno dei funghi, poichè si è visto che sequenze di rRNA e la sequenza del DNA mitocondriale sono omologhe a quelle dei funghi.

Studi di biologia molecolare, hanno, inoltre, stabilito l'esistenza di più specie di *Pneumocystis*: il termine di *Pneumocystis carinii* è risultato nel tempo "obsoleto" per definire il microrganismo che infetta gli esseri umani, ed è sorta la necessità di rinominare "*Pneumocystis*" che infetta l'uomo con il nuovo termine binominale di *Pneumocystis jiroveci*, in onore al primo autore (Jirovec) che ha riconosciuto *Pneumocystis* nell'uomo.

Oggi *Pneumocystis carinii* (patogena per il topo) e *Pneumocystis jiroveci* (patogena per l'uomo) sono considerate specie differenti e con diversa specificità di ospite.

Pneumocystis spp. è un microrganismo extracellulare, che si moltiplica all'interno degli alveoli polmonari.

ALVEOLO POLMONARE



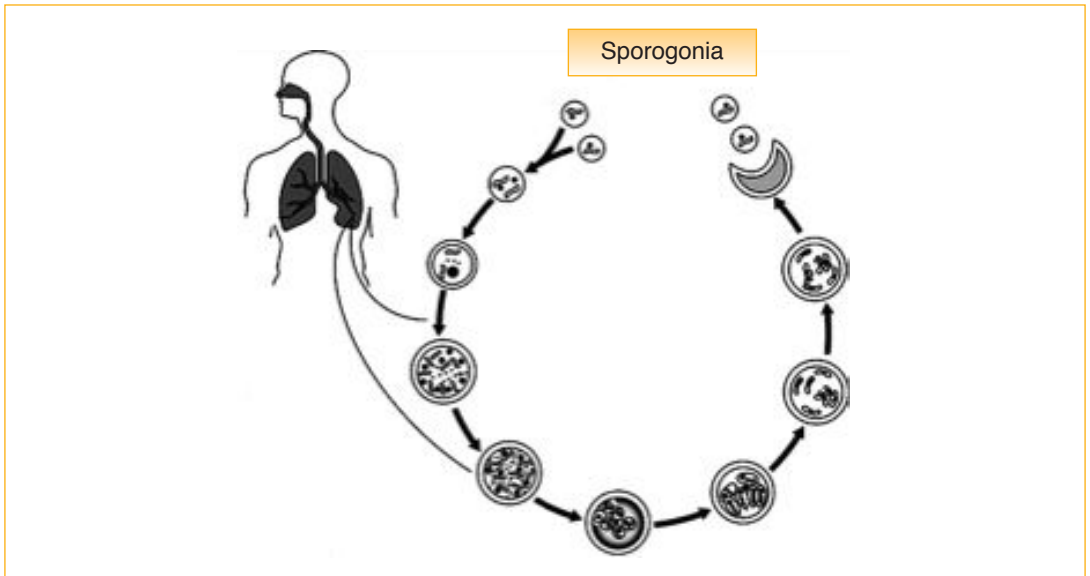
P. jirovecii: Ciclo intrapolmonare

Pneumocystis spp. è diffusa in tutto il mondo ed infetta l'uomo e molti mammiferi (cane, gatto, roditori, pecora, coniglio, ecc.) che probabilmente fungono da serbatoio. Si presenta in due distinti stadi biologici: la forma cistica ad 8 corpi intracistici (gli sporozoiti) e la forma vegetativa (trofozite).

Tra forma vegetativa e forma cistica sono riscontrabili precisti e cisti immature localizzate sia a contatto degli pneumociti, sia libere nel lume alveolare..

I trofoziti di forma ovale presentano dimensioni assai variabile (2-8 μ) e morfologia assai simile alle forme vegetative amebiche, caratteristica è la tendenza a riunirsi in clusters, spesso associati a cisti.

P. jiroveci: Ciclo biologico



Nel ciclo biologico di *Pneumocystis jiroveci*, si distingue una fase di moltiplicazione binaria ed una sporogonia sessuata.

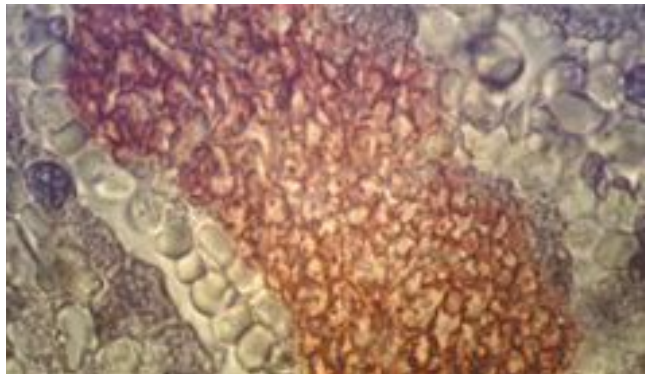
Nella prima fase il protozoo ha aspetto ovale o ameboide ($1,5-2\mu$), è dotato di nucleo e di mitocondri; accrescendosi raggiunge dimensioni maggiori (fino a 5μ). Vive negli spazi alveolari dei polmoni di vari mammiferi, aderendo ai pneumociti mediante filamenti. Poi ha luogo un processo sessuato dopo il quale i microrganismi si trasformano in sporoblasti di $7-10\mu$, il cui nucleo aumenta fino a $1,5-2\mu$.

Il processo sporogonico termina con la formazione di 8 spore aploidi ovali, avvolte in una robusta membrana cistica ($6-8\mu$).

Lo spazio alveolare, in seguito a numerose divisioni cellulari, si riempie di materiale disposto a nido d'ape, questo materiale è costituito da cluster di *Pneumocystis jiroveci*, da proteine, cellule degenerate dell'ospite e da macrofagi alveolari.

Si determina così infiammazione e la malattia progredisce con iperplasia interstiziale, edema ed infiltrazione.

L'interessamento dell'interstizio polmonare comporta una riduzione degli scambi gassosi con conseguente riduzione della disponibilità di ossigeno per l'organismo.



P. jiroveci alveolo polmonare sezione 1000x
(Col. Immunoperossidasi)

I segni clinici

In soggetti immunocompromessi i segni clinici di pneumocistosi sono, nei casi tipici, tosse non produttiva, dispnea, febbre, l'incubazione e l'esordio di questa patologia possono essere prolungati ed estremamente subdoli ed i segni clinici possono essere completamente assenti.

Pneumocystis jiroveci generalmente, determina una polmonite interstiziale, questa si presenta con un quadro subdolo che inizia lentamente in diversi giorni (o in qualche caso in 1-2 settimane) caratterizzato dalla comparsa di tosse secca e stizzosa, dispnea da sforzo (fame d'aria) ingravescente e febbre che, si presenta tipicamente elevata (39-40 °C);

A volte l'esordio è più rapido e il paziente può giungere all'osservazione già con un quadro di insufficienza respiratoria (tachipnea, dispnea a riposo, colorazione blu delle mucose), inoltre, il quadro radiografico del torace può essere anche normale e soltanto dopo alcuni giorni presenterà le alterazioni tipiche della polmonite interstiziale.

La polmonite, può complicarsi, inoltre, con pneumotorace spontaneo (presenza di aria tra i foglietti pleurici) bilaterale e ricorrente; che può, in assenza di diagnosi e di terapia specifica portare alla morte dei soggetti colpiti nel 100% dei casi.

La diagnosi di laboratorio si basa su metodi diretti cioè sul riconoscimento microscopico del protozoo nel materiale biologico in esame.

La radiologia e gli altri esami di laboratorio (inclusa la ricerca degli anticorpi specifici), sono del tutto insufficienti a formularne la diagnosi, soprattutto per l'immunodeficienza che accompagna la pneumocistosi.

I materiali biologici di elezione per la ricerca del protozoo sono nell'ordine: la biopsia transbronchiale, l'agobiopsia percutanea, il lavaggio bronco-alveolare, l'espettorato indotto, l'espettorato (nella pratica quotidiana si utilizzano solo gli ultimi tre).

Per il prelievo ed il trattamento dei campioni si segue l'iter descritto nella Raccolta campione di questo capitolo.

Metodi diretti

1. Colorazione blue di Toluidina;
2. Colorazione Gram Weigert;
3. Colorazione May-Grunwald Giemsa (MGG);
4. Immunofluorescenza Indiretta (IFI).

1. Blue di Toluidina:

La colorazione prevede prima un trattamento di solfatazione dei vetrini da colorare;

Si prepara il **Reagente di solfatazione**:

Acido acetico	45 ml
Acido solforico	15 ml

Aggiungere l'acido solforico goccia a goccia all'acido acetico, miscelando continuamente, sotto cappa aspirante, e mantenendo il contenitore in bagno di ghiaccio. La reazione è fortemente esotermica con liberazione di notevoli quantità di vapore dal contenitore con i due reagenti. La soluzione, conservata a temperatura ambiente, può essere utilizzata per una settimana.

La **soluzione di colorazione** è costituita da:

Blu di toluidina O	0,3 g
Acqua distillata sterile	60 ml
Acido cloridrico	2 ml
Alcool etilico assoluto	140 ml

Sciogliere il colorante in polvere, pesato, nell'acqua distillata; aggiungere l'acido cloridrico e poi l'alcool.

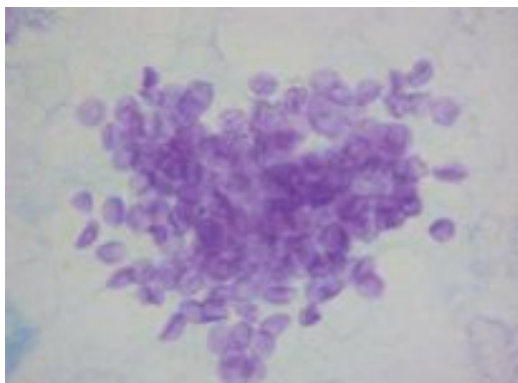
La soluzione è stabile per una settimana a temperatura ambiente.

La colorazione

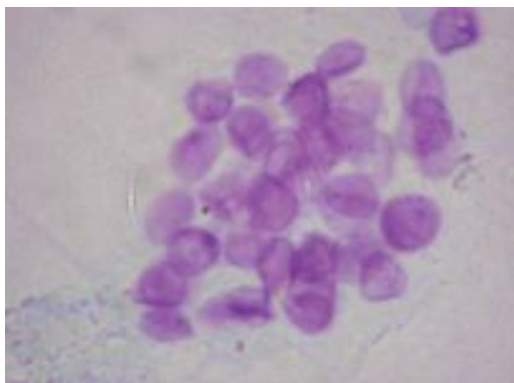
- Immergere i vetrini, nel reagente di solfatazione, per 10' agitando di tanto in tanto.
- Sciacquare i vetrini sotto acqua corrente per 5'
- Sciacquare per qualche minuto in acqua distillata.
- Immergere i vetrini nella soluzione colorante per 3'
- Immergere i vetrini per 10"-15" in alcool 95°
- Ripetere l'operazione in bagno costituito da metà alcool e metà xilene.
- Immergere i vetrini in xilene
- Montare in Entellan
- Osservare al microscopio ottico con obiettivo 20 e 40x.

Le cisti appariranno vuote, a morfologia polimorfa, con dimensioni 4 - 6 μ . La parete esterna risulta colorata in blu-violetto.

Si osserverà sui contorni cistici delle parti più intensamente colorate che corrispondono ai punti di rottura delle cisti.



Cisti di *Pneumocystis jirovecii* 400x
(Col. blue di toluidina)



Cisti di *Pneumocystis jirovecii* 1000x
(Col. blue di toluidina)

La colorazione Toluidina è una colorazione relativamente semplice e rapida che consente di mettere in evidenza solo la parete cistica (che appare blue con banda trasversale); il contenuto cistico e i trofozoiti non si colorano perché il colorante non penetra nella cisti.

Il limite del test

La lettura dei preparati è agevole, ma i limiti sono dati dai falsi positivi che si possono evidenziare in quanto i miceti hanno la stessa affinità tintoriale col colorante e solo occhi esperti riescono a distinguerne le differenze.

Le differenze sono date solo dalla uniformità della colorazione dei miceti, mentre le cisti di *Pneumocystis* presentano una colorazione più disomogenea con bande di colorazione più intensa sulla membrana della cisti.

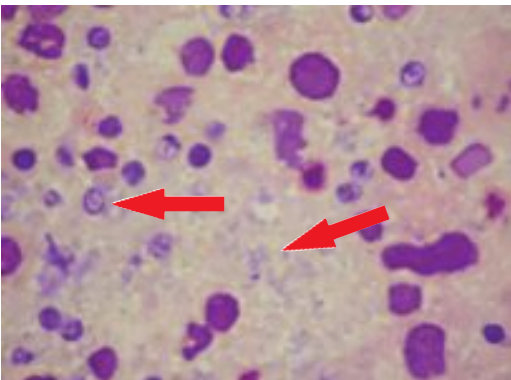
La colorazione di toluidina appare, quindi, più adatta ad essere eseguita su campioni come BAL o BAS meno ricchi di spore di miceti.

2. Colorazione di Gram-Weigert

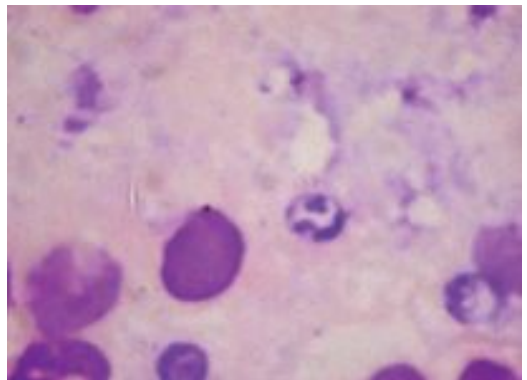
La colorazione non prevede nessun trattamento preliminare:

- Fissare i vetrini in alcool-etere per 20'
- Colorare i vetrini con Emallume di Mayer per 3'-5'
- Lavare in acqua di rubinetto fino al viraggio al blue-violetto
- Colorare con Eosina 1% per 5'
- Lavare in acqua di rubinetto
- Colorare con Violetto di Genziana per 2'
- Lavare rapidamente con acqua di rubinetto
- Mordenzare con Lugol per 1'
- Lavare rapidamente con acqua di rubinetto
- Asciugare i vetrini su carta da filtro; attendere che siano ben asciutti.
- Differenziare e disidratare con miscela 1:1 di olio di anilina e xilene; ricoprire e svuotare i vetrini fino all'eliminazione completa del violetto (circa 2')
- Immergere i vetrini in xilene per 5' quindi montarli con Entellan
- Osservare al microscopio ottico a 400 e 1000x.

La colorazione di Gram-Weigert, abbastanza complessa e lunga, ha, però, il vantaggio di rendere visibili la parete, il contenuto cistico ed i trofozoiti.



Trofozoiti e cisti di *Pneumocystis jirovecii* 400x
(Col. di Gram-Weigert)



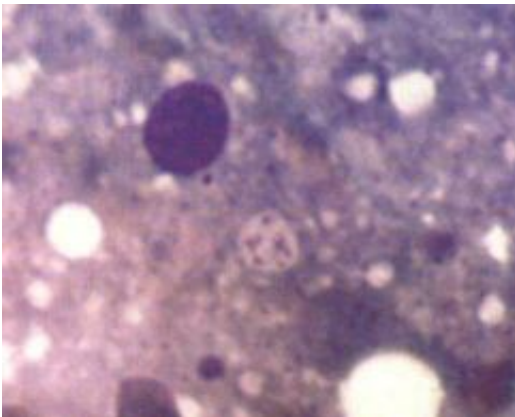
Cisti di *Pneumocystis jirovecii* 1000x
(Col. di Gram-Weigert)

3. Colorazione di May Grumwald-Giemsa (MGG)

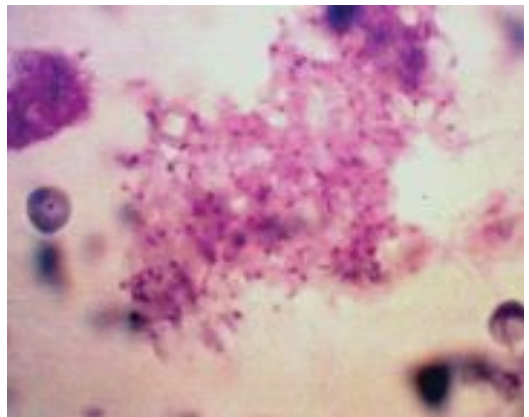
Deporre sul vetrino 1 ml di May Grumwald intero

- Dopo 3'-5' aggiungere 1 ml di acqua distillata senza allontanare il primo colorante
- Dopo 5'-10' lavare con acqua di fonte
- Colorare per 30' con soluzione 1:20 di Giemsa
- Osservare al microscopio ottico a 1000x

La colorazione è di semplice e rapida esecuzione (è la colorazione utilizzata anche per i preparati ematologici), sono visibili contenuto cistico e trofozoiti mentre la parete cistica non assume il colorante e resta invisibile come una impronta negativa



Cisti di *P. jiroveci* 1000x
(Col. MGG)



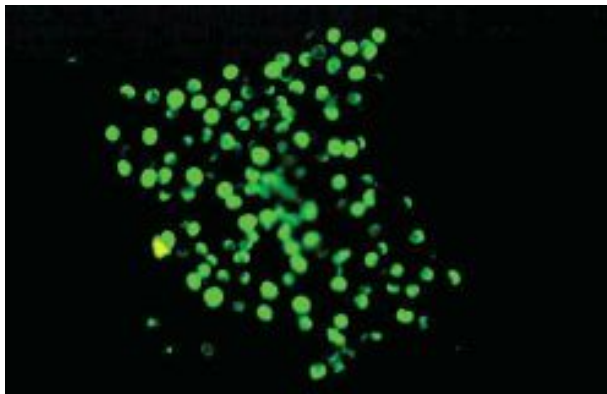
Cluster di trofozoiti di *P. jiroveci* 1000x
(Col. MGG)

I limiti di questi test

La lettura dei preparati colorati con questa colorazione è riservata a personale qualificato e con notevole esperienza; in quanto nei campioni di espettorato non è semplice, visto la quantità di batteri saprofiti presenti, poter identificare con tranquillità i trofozoiti (1,5-2 μ).

4. Immunofluorescenza Indiretta (IFI)

- Depositare 20 µl. del campione, trattato, nel pozzetto di un vetrino per IFI.
- Lasciar asciugare il preparato per 24 h.
- Fissare in acetone.
- Deposare 20 µl. di enzima mucolitico preparato al momento dell'uso, diluito 1/10.
- Incubare in camera umida a 37°C per 30'.
- Lavare con acqua distillata delicatamente e lasciar asciugare.
- Deposare 20 µl. di anticorpo monoclonale (IgG murine).
- Incubare in camera umida a 37°C per 15'.
- Lavare con acqua distillata delicatamente e lasciar asciugare.
- Deposare 20 µl. di coniugato (anti-IgG murine legate ad isotiocianato di fluoresceina).
- Incubare in camera umida a 37°C per 15'.
- Lavare con acqua distillata delicatamente e lasciar asciugare.
- Depositare una goccia di glicerina tamponata sul pozzetto, coprire con coprioggetto.
- Osservare con microscopio a fluorescenza l'intero preparato con obiettivo 20 e 40x.



P. jirovecii: cisti rotonde od ovali di color verde mela contrastano sul fondo nero-marrone.

La tecnica dell'immunofluorescenza è una tecnica che richiede pochi passaggi di media difficoltà ed è molto sensibile; nel nostro laboratorio viene impiegata, routinariamente, su tutti i vari tipi di materiale che ci vengono inviati.

Utilizzando anticorpi monoclonali diretti agli antigeni specifici della cisti, si possono evidenziare anche rare cisti, nel campione biologico analizzato, così la ricerca è notevolmente più sensibile.

La lettura dei preparati è abbastanza agevole, ma richiede l'utilizzo del microscopio a fluorescenza, l'unico dato negativo è che è molto più costosa rispetto alle tecniche precedenti

Altre tecniche di diagnosi sono:

Immunoperossidasi, Microscopia elettronica, Biologia molecolare.

Queste sono utilizzate, essenzialmente, a scopo di ricerca, in particolare la biologia molecolare viene impiegata anche nella pratica clinica ma l'interpretazione del dato analitico mostra ancora qualche problema data la cross- reazione che la *Pneumocystis* mostra nei confronti di numerosi miceti.

Dopo diversi anni, nei quali abbiamo utilizzato l'intero protocollo diagnostico, siamo giunti alla considerazione che una buona diagnosi di laboratorio delle pneumocistosi si raggiunge utilizzando:

- colorazione di **MayGrunwald-Giemsa** che consente, oltre alla individuazione dei trofozoiti e cisti, soprattutto su campioni come BAL e/o BAS, anche un esame cellulare del materiale da analizzare e, quindi, saggiare la bontà del campione e;
- la **immunofluorescenza** indiretta che ci ha consentito di individuare anche una sola cisti nel campione analizzato e che riteniamo, quindi, per la corretta diagnosi, indispensabile utilizzarla routinariamente su tutti i campioni biologici da analizzare.

Toxoplasma gondii

Come per la pneumocistosi anche la toxoplasmosi è suscettibile di riattivazione a causa dell'immunodepressione. La posizione tassonomica e il ciclo biologico del *Toxoplasma* sono rimandati al IV capitolo.

La riattivazione endogena della toxoplasmosi, rappresenta la modalità più comune di comparsa di complicanze, tipicamente localizzate, nel paziente immunodepresso, al polmone.

Nelle polmoniti da toxoplasma, infiltrati interstiziali diffusi possono progredire rapidamente verso il consolidamento e causare insufficienza respiratoria; un'endoarterite può portare all'infarto di piccoli segmenti polmonari.

Difetti della conduzione sono comuni ma spesso asintomatici nelle miocarditi e possono rapidamente portare all'insufficienza cardiaca.

Le infezioni non diagnosticate e quindi non trattate adeguatamente sono di solito fatali.

L'accertamento diagnostico, che, nei soggetti normoergici, viene affidato a metodi sierologici, alla ricerca delle IgG ed IgM specifiche, non dà mai risposte soddisfacenti nei pazienti AIDS o immunodepressi in generale, pertanto si deve ricorrere alla ricerca diretta del protozoo.

Per il prelievo ed il trattamento dei campioni si segue l'iter descritto nella Raccolta campione di questo capitolo.

La diagnosi di laboratorio si fonda su metodi diretti, in prevalenza, sulla messa in evidenza del protozoo nell'adatto campione biologico.

I campioni idonei per la ricerca diretta sono:

- BAL (liquido di lavaggio broncoalveolare)
- Espettorato

Il BAL e l'espettorato vengono trattati come descritto all'inizio del capitolo, cioè vengono allestiti per ciascun campione, 2 vetrini per le colorazioni e 1 vetrino con pozzetto per la fluorescenza per l'impiego del monoclonale diretto ai tachizoiti.

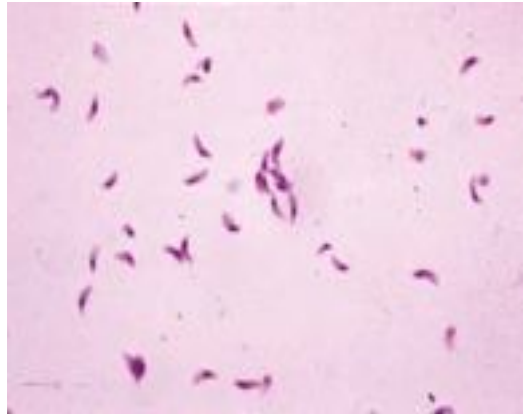
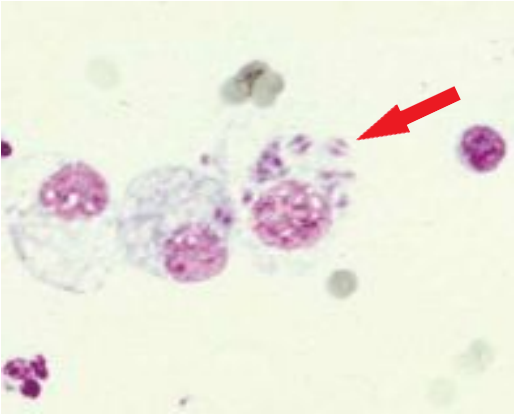
Metodi diretti

1. Colorazione May-Grumwald Giemsa (MGG)
2. Immunofluorescenza Indiretta (IFI)

1. Colorazione May-Grumwald Giemsa (MGG)

I campioni trattati, vengono colorati e osservati al microscopio ottico a 1000x

In caso di positività si evidenzieranno i tachizoiti di *Toxoplasma* come corpi di forma ovalare o leggermente arcuata a mezzaluna di 4-8 μ azzuri con nucleo unico centrale colorato in viola e con localizzazione sia intra- che extra-cellulare.



Tachizoiti di *Toxoplasma* 1000x (Col. MGG)

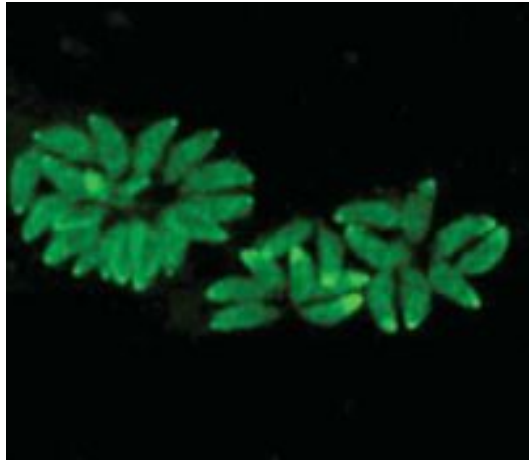
2. Immunofluorescenza Indiretta (IFI)

- Il vetrino con pozzetto per IFI, contenente il campione, viene fissato con acetone per 5'
- Si lascia asciugare
- Depositare 20 μ l di anticorpo monoclonale (Specifico per le proteine presenti sulla superficie dei tachizoiti) su ciascun pozzetto
- Incubare i vetrini per 30' a 37°C in camera umida
- Lavare il vetrino in PBS 7.2
- Lasciare asciugare
- Depositare 20 μ l di anticorpo coniugato anti IgG di topo

(diluito 1/10 in PBS 7,2) marcato con isotiocianato di fluoresceina su ciascun pozzetto

- Incubare i vetrini per 30' a 37°C in camera umida
- Lavare il vetrino in PBS 7.2
- Lasciare asciugare il vetrino, montare con glicerina tamponata ed osservare al microscopio a fluorescenza con obiettivo 40-100x

Se presenti i tachizoiti di *Toxoplasma* appariranno come corpiccioli di 4 a 8 μ e il diametro da 2 a 3 μ a mezzaluna, disposti spesso a due a due, colorati in verde brillante.



Toxoplasma gondii (IFI+)

Cryptosporidium spp.

Anche se rilevate sporadicamente, sono tipiche delle forme AIDS correlate, le localizzazioni secondarie di *Cryptosporidium* rilevate soprattutto a livello dell'albero respiratorio.

Sulla patogenesi di queste localizzazioni ci sono state numerose discussioni se si tratta di forme di contagio diretto per via aerogena o se, invece, si tratti di ricaduta accidentale delle oocisti nelle vie aeree dopo episodi di vomito a seguito della localizzazione primaria intestinale.

Nel 1992, in un paziente da noi osservato, ricoverato in un reparto AIDS dell'Ospedale, abbiamo, insolitamente, riscontrato la presenza delle oocisti di *Cryptosporidium* nel Bal e nell'espettorato indotto, prima della comparsa delle oocisti nelle feci.

Tale soggetto aveva mostrato dapprima dispnea e tosse, per cui la ricerca fu indirizzata verso gli agenti responsabili classicamente di patologia respiratoria.

Le indagini dirette verso la ricerca di *Pneumocystis* risultarono negative, mentre la colorazione del Bal con Ziehl-Neelsen evidenziò la presenza delle oocisti acido-alcool resistenti, che furono confermate anche in immunofluorescenza con l'impiego di anticorpo monoclonale.

Dopo 3 settimane il paziente accusò diarrea profusa e nelle feci furono identificate le oocisti di *Cryptosporidium*.

La dinamica della patologia, in questo paziente, fece supporre che il contagio potesse essere avvenuto per via aerogena tramite inspirazione di oocisti, e, solo in seguito sarebbe intervenuta la localizzazione intestinale.

Per il prelievo ed il trattamento dei campioni si segue l'iter descritto nella Raccolta campione di questo capitolo.

La diagnosi di laboratorio si fonda su metodi diretti, in prevalenza, sulla messa in evidenza del protozoo nell'adatto campione biologico.

I campioni idonei per la ricerca diretta sono:

- BAL (liquido di lavaggio broncoalveolare)
- Espettorato

Il BAL e l'espettorato vengono trattati come descritto all'inizio del capitolo, vengono allestiti per ciascun campione, 2 vetrini per le colorazioni e 1 vetrino con pozzetto per la fluorescenza.

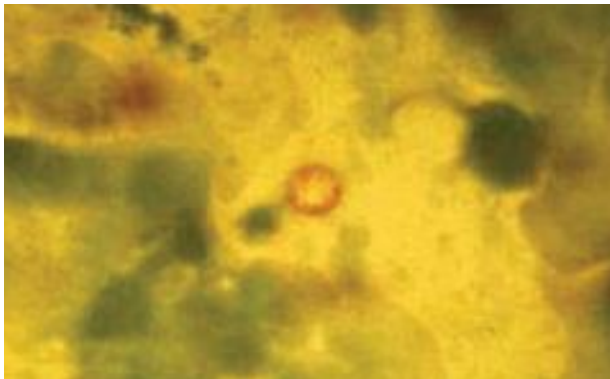
Metodi diretti

1. Colorazione Ziehl-Neelsen mod.
2. Immunofluorescenza

1. Colorazione Ziehl-Neelsen mod.

- La colorazione si fonda sul principio della acido-alcool resistenza
- Si preparano strisci del campione di espettorato o BAL su vetrino portaoggetto.
- Il preparato viene lasciato asciugare per 24 h.
- Fissazione in metanolo per 10'.
- Deposare sul preparato la carbolfucsina per 15'-20'.
- Lavare con acqua di fonte, quindi asciugare su carta assorbente.
- Aggiungere il decolorante (soluzione di acido acetico in alcool etilico) per 15"-30".
- Lavare con acqua di fonte e lasciar asciugare.
- Deposare il colorante di contrasto (sol. di verde malachite) per 2'-5'.
- Lavare con acqua di fonte e lasciar asciugare

Si osserva al microscopio ottico a 200-400x e si evidenzieranno, se presenti, le oocisti colorate in rosso più o meno intenso ed il fondo risulta verde



Oocisti di *Cryptosporidium* spp. 400x (Col. Ziehl-Neelsen mod.)

2. Immunofluorescenza Diretta (IFD)

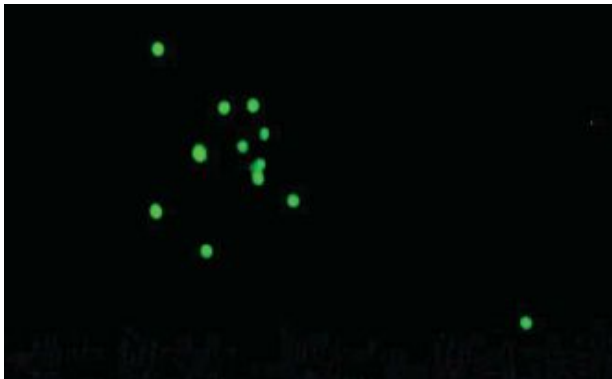
In commercio sono disponibili anticorpi monoclonali diretti agli antigeni di *Cryptosporidium*

La metodica utilizzata con l'impiego di questi monoclonali è descritta di seguito:

- Depositare 20 µl di una sospensione di espettorato o BAL sul pozzetto di un vetrino per IFA.
- Lasciar asciugare all'aria il preparato per 24 h.
- Fissare in acetone per 10'.
- Deposare 20 µl. di anticorpo monoclonale legato ad isotiocianato di fluoresceina sul pozzetto.
- Incubare in camera umida a 37°C per 30'.
- Lavare con acqua distillata delicatamente e lasciar asciugare.
- Depositare una goccia di glicerina tamponata sul pozzetto, coprire con coprioggetto.

Osservare con microscopio a fluorescenza l'intero preparato con obiettivo 20 e 40x.

I protozoi eventualmente presenti appariranno di color verde mela sul fondo nero-marrone



Oocisti di *Cryptosporidium* spp. 400x (IFD+)

Refertazione e registrazione dei risultati

Il risultato dell' esame parassitologico del campione biologico esaminato deve essere espresso con la massima chiarezza, ricorrendo il meno possibile a sigle ed abbreviazioni che possono lasciare dubbi interpretativi.

Sul referto deve essere riportato il nome e cognome del paziente, il materiale inviato, il giorno in cui è stato effettuato il prelievo, la metodica utilizzata per la ricerca e quindi il risultato della ricerca.

Se positiva, si descrive la forma del protozoo evidenziato e si segnala la carica osservata nel campione biologico che va espressa come: Rari, Alcuni, Diversi o Numerosi. Nelle note può essere utile segnalare al clinico la qualità del campione analizzato, utilizzando la classificazione di Bartlett.

L'archiviazione dei risultati ottenuti deve essere eseguita con adeguato sistema informatico; la registrazione informatizzata consente di ricavare statistiche sui parassiti identificati, sui materiali biologici esaminati, sui tempi di esecuzione degli esami, sui costi dei materiali utilizzati, ecc.

Capitolo IV

Generalità

Per i parassiti che si localizzano nei tessuti è spesso necessario ricorrere all'esame di campioni biotici, per lo più ottenuti nell'uomo da: cute, linfonodi, muscoli striati, cornea, intestino, fegato, polmone ed encefalo. Per i protozoi che si localizzano sulla superficie delle mucose è necessario esaminare campioni di essudato per lo più ottenuti, nell'uomo, da secreti vaginali ed uretrali.

Infatti, come riportato in tabella, nella cute è possibile riscontrare *Leishmania*, nei casi di leishmaniosi cutanee; nei linfonodi si possono localizzare i tripanosomi, le Leishmanie e *Toxoplasma gondii*; nei muscoli, tripanosomi, raramente, i microsporidi. Nella cornea o sulla congiuntiva *Encephalitozoon*, *Nosema* e *Acanthamoeba*.

Nel fegato *Entamoeba histolytica* e *Leishmania* spp. e *T. gondii*.

Nell'encefalo *Toxoplasma*, *Trypanosoma*, *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Balantidium* e i microsporidi.

Organo / tessuto ed essudato	Parassiti	Malattia
Cute	<i>Leishmania</i>	Leishmaniosi cutanea
Linfonodi	<i>Microsporidi</i> , <i>Trypanosoma</i> , <i>Leishmania</i> e <i>Toxoplasma</i>	Tripanosomiasi, Leishmaniosi, Toxoplasmosi
Muscoli	<i>Microsporidi</i> e <i>Trypanosoma</i>	Microsporidiosi e malattia di Chagas
Cornea, Congiuntiva	<i>Encephalitozoon</i> , <i>Nosema</i> , <i>Acanthamoeba</i>	Microsporidiosi, Acanthamoebiasi
Fegato	<i>E. histolytica</i> , <i>Leishmania</i> , <i>Toxoplasma</i>	Amebiasi, Leishmaniosi, Toxoplasmosi
Tratto gastroenterico	<i>Leishmania</i>	Leishmaniosi in HIV+
Encefalo	<i>Toxoplasma</i> , <i>Trypanosoma</i> <i>Naegleria</i> , <i>Acanthamoeba</i> , <i>Balantidium</i> , <i>Microsporidi</i>	Toxoplasmosi, Tripanosomiasi Naegleriasi, Acanthamoebiasi, Balantidiosi, Microsporidiosi
Tamponi vaginali ed uretrali	<i>Trichomonas vaginalis</i>	Trichomoniasi

Protozoi riscontrabili nei tessuti ed essudati vari

RACCOLTA DEL CAMPIONE

Le biopsie dei tessuti, devono essere inviate in laboratorio, in un contenitore sterile privo di qualunque fissativo o conservante.

È molto importante, che le biopsie siano inviate non fissate in formalina, altrimenti i trofozoiti o le forme mobili dei parassiti, non saranno più evidenziabili.

È anche indispensabile che non trascorra molto tempo, tra il prelievo e l'invio al laboratorio, sempre per favorire la possibilità di reperire, nel campione biologico, eventuali trofozoiti mobili.

Gli essudati vaginali profondi devono essere prelevati con un tampone sterile, gli essudati uretrali devono essere prelevati dopo un adeguato massaggio prostatico.

PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Quando si tratta di tessuti liquidi (es. il liquor), una volta prelevati, devono essere tenuti a temperatura ambiente, non devono essere refrigerati o diluiti e devono pervenire in laboratorio al massimo entro 24 ore.

Il Liquor viene centrifugato a basso numero di giri, 2000 giri per 10'.

Si elimina la maggior parte di liquido sovrannatante, si risospende il sedimento e si allestiscono dei vetrini, prima per l'esame a fresco, poi dei vetrini per le colorazioni permanenti e dei vetrini con pozzetto per l'immunofluorescenza.

Quando si tratta di tessuti poco solidi (es. gli aspirati linfonodali o aspirati duodenali, ecc.), è utile staccare una parte del campione per stemperarlo in una provetta con soluzione fisiologica sterile ed esaminarla a fresco, al microscopio ottico, con obiettivo 10-40x.

Quindi, si allestiscono, con la restante parte del campione, dei vetrini per le colorazioni permanenti e dei vetrini con pozzetto per l'immunofluorescenza.

Quando si tratta di tessuti abbastanza solidi si allestiscono dei vetrini "per impressione" cioè si schiaccia la superficie tagliata del tessuto su dei vetrini portaoggetto, si copre con un coprioggetto e si esamina al microscopio ottico con obiettivo 10-40x per l'esame a fresco.

Con la stessa tecnica, "per impressione", si allestiscono dei vetrini per le colorazioni permanenti e dei vetrini con pozzetto per l'immunofluorescenza.

Quando si tratta di essudati si stempera il tampone in una provetta con 3ml di soluzione fisiologica preriscaldata a 37°C. Contestualmente si stempera il tampone di essudato nell'adatto terreno per l'allestimento della coltura.

RICERCA ED IDENTIFICAZIONE DEI PROTOZOI

È questa la fase più importante e delicata dell'attività del parassitologo. Perchè la ricerca sia fatta con accuratezza, il parassitologo deve, necessariamente, conoscere il ciclo biologico dei possibili protozoi responsabili del processo patologico in quel distretto; eseguire il trattamento del campione biologico più indicato per evidenziare i protozoi, eventualmente presenti, e deve, necessariamente, conoscere la morfologia, la grandezza e le affinità tintoriali del parassita da ricercare, perchè la sua attività si fonda quasi esclusivamente sull'osservazione microscopica dei preparati, opportunamente trattati.

Il protozoo più importante da ricercare in materiali diversi, come aspirato linfonodale, liquor, biopsie epatiche e/o altri tessuti è *Toxoplasma gondii*.

Nella cute, nei linfonodi, negli aspirati gastroenterici o in altre biopsie il parassita di maggior riscontro, l'area vesuviana e le isole di Ischia e Procida presentano un'attiva epidemia, è *Leishmania infantum*.

Nella cornea, congiuntiva, nei soggetti immunodepressi, soprattutto in HIV+ si deve pensare alla possibile presenza dei microsporidi, molto rara, ma occasionalmente possibile e alla presenza di Amebe a vita libera.

Nel liquor, oltre ai microsporidi, bisogna ricercare i tripanosomi africani, i tachizoiti di *Toxoplasma gondii* e le Amebe a vita libera.

Nei muscoli oltre ai microsporidi, bisogna ricercare i tripanosomi americani che attraverso il torrente circolatorio raggiungono le fibre muscolari striate dei muscoli scheletrici e del cuore, e si trasformano di nuovo in amastigoti, caratterizzando la fase cronica della malattia.

La ricerca di *Trypanosoma* spp. è, dettagliatamente, trattata nel II capitolo

Nel fegato e nel liquor bisogna ricordare, le eventuali, localizzazioni secondarie di *Entamoeba histolytica* e le localizzazioni, nel liquor, nella cornea e nella congiuntiva, delle Amebe a vita libera.

Negli essudati vaginali e uretrali bisogna ricercare i trofozoiti di *Trichomonas vaginalis*.

Genere *Toxoplasma*

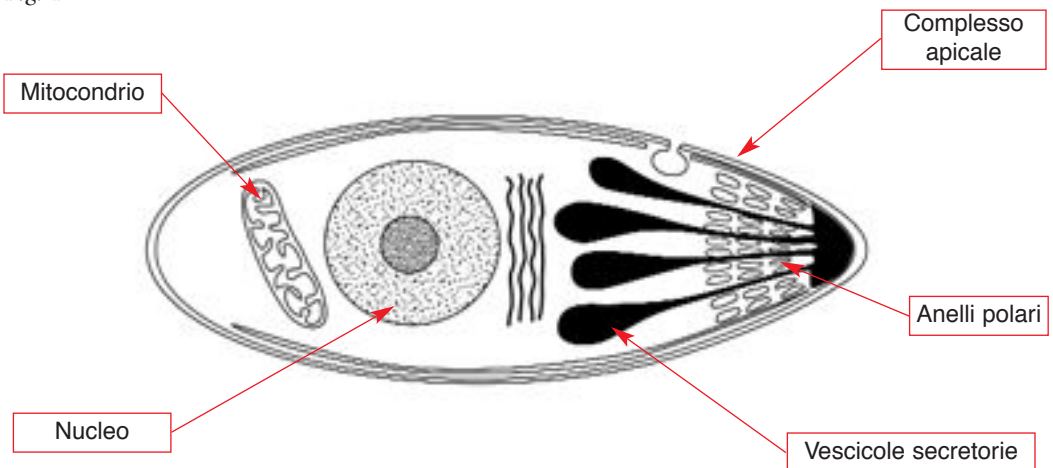
Toxoplasma gondii

Phylum	Apicomplexa					
Subphylum	Sporozoa					
Classe	Cocidiasina				Piroplasma	
Ordine	Eurococcidiaria					Piroplasmorida
Sottoclasse	Eimeriorina			Haemosporina		
Famiglia	Eimeriidae	Cryptosporidiidae	Sarcocystidae		Plasmodiidae	Babesiidae
Genere	<i>Ispora</i>	<i>Cyptosporidium</i>	<i>Sarcocystis</i>	<i>Toxoplasma</i>	<i>Plasmodium</i>	<i>Babesia</i>
Specie	<i>belli</i>	<i>parvum</i>	<i>hominis</i>	<i>gondii</i>	<i>falciparum</i>	<i>microti</i>
		<i>bayleyi</i>	<i>lindemanni</i>		<i>vivax</i>	
			<i>suihominis</i>		<i>ovale</i>	
					<i>malariae</i>	

Posizione tassonomica del *Toxoplasma*

Toxoplasma gondii è un protozoo caratterizzato, nel suo ciclo biologico, dall'alternanza di riproduzioni asessuate, schizogonia, a riproduzioni sessuate, gamogonia. Il corpo di questo protozoo, come tutti gli appartenenti al phylum degli Apicomplexa, è caratterizzato dalla presenza di un complicato apparato posto ad un polo del corpo, denominato complesso apicale, vedi fig. 1 da cui il nome del phylum.

Fig. 1



Struttura del complesso apicale

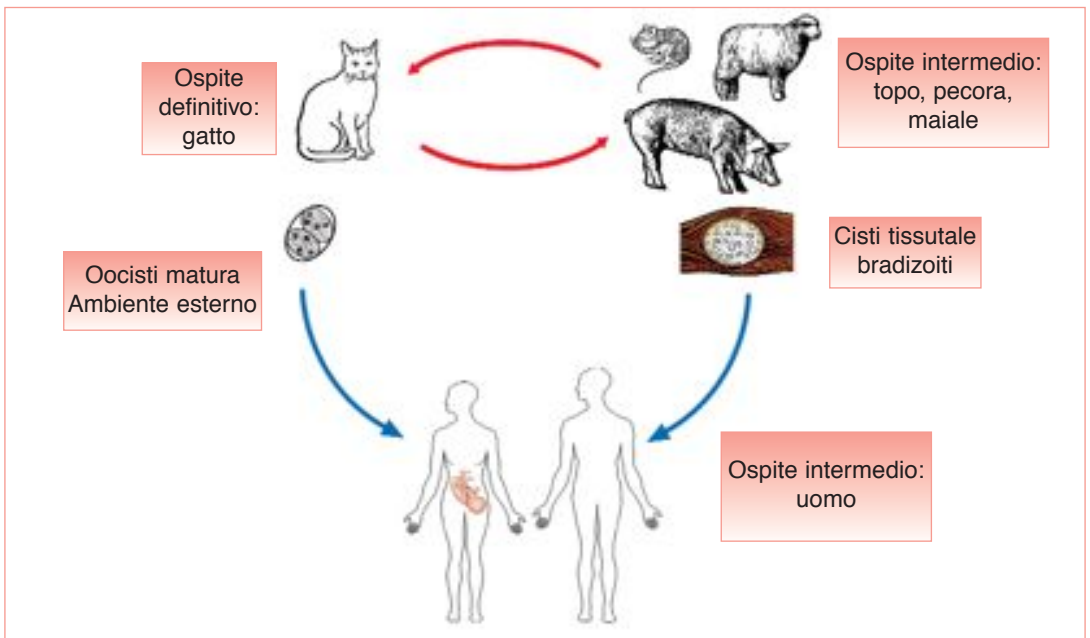
Il complesso apicale svolge un ruolo fondamentale nell'invasione della cellula ospite, il conoide si estroflette durante la penetrazione nell'ospite mentre i micronemi e rhoptrie secernono il proprio contenuto apicalmente.

Recentemente ricercatori dell'Imperial College di Londra e dell'Università di Ginevra hanno raccolto nuove informazioni sulla struttura atomica di una proteina chiave, chiamata TgMIC1, che viene rilasciata da queste vescicole apicali sulla superficie del protozoo un attimo prima che questo invada le cellule ospiti nel corpo umano. Questa proteina si lega ad alcuni zuccheri presenti sulla superficie della cellula ospite, e aiutano il protozoo ad inserirsi e a penetrare nelle cellule umane.

Il processo di invasione termina con la formazione di un vacuolo parassitoforo all'interno del quale il protozoo si moltiplica sessualmente.

Il genoma degli Apicomplexa, infine, è costituito da tre tipi di DNA: nucleare, mitocondriale ed extranucleare, contenuto in un organello, l'apicoplasto, situato vicino al nucleo.

Toxoplasma gondii: Ciclo biologico



Toxoplasma gondii, protozoo dixeno obbligato, è capace di parassitare ogni tipo di cellula degli animali a sangue caldo, il ciclo biologico è molto simile a quello dei coccidi dal quale si differenzia solo per essere svolto in due diversi ospiti: il gatto, ospite definitivo e l'uomo, altri animali a sangue caldo, ospiti intermedi.

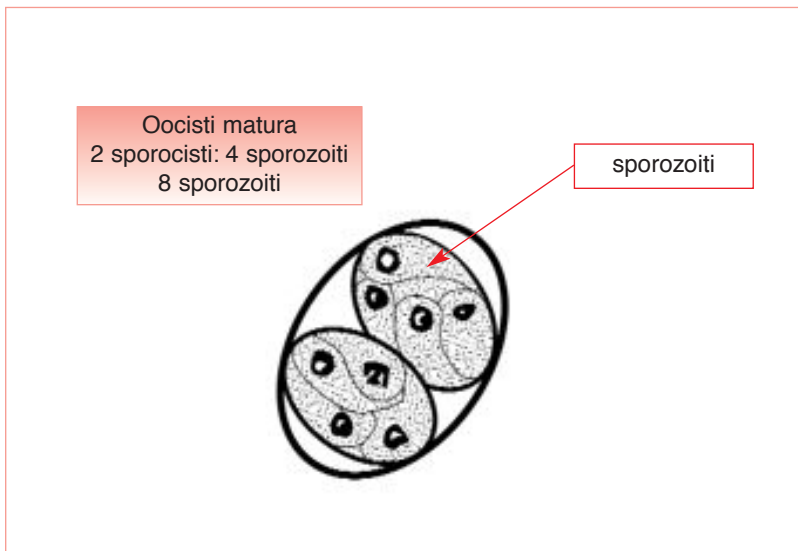
Il gatto, ospite definitivo, si infetta ingerendo carne di mammiferi o uccelli nel cui cervello o nei cui muscoli siano presenti le cisti del protozoo, contenenti bradizoiti, oppure attraverso l'ingestione di oocisti mature presenti nel terreno.

I bradizoiti o gli sporozoiti, giunti nell'intestino del gatto, si liberano nel tenue e penetrano nelle cellule dell'epitelio dei villi, qui, dopo una fase di accrescimento sotto forma di trofozoiti, avviene la moltiplicazione asessuata, schizogonia, che si conclude con la formazione di schizonti contenenti da 4 a 32 merozoiti che penetrano in altre cellule epiteliali e continuano il processo schizogonico.

Dopo alcune generazioni, i merozoiti danno origine a macrogametociti ovali, che si sviluppano in macrogameti e a microgameti. Dalla fecondazione del macrogamete origina lo zigote che passa, come oocisti immatura, nel lume dell'intestino e viene eliminata con le feci del gatto.

Nell'ambiente esterno ciascuna oocisti va incontro ad un processo di maturazione, sporulazione, che porta alla formazione, all'interno della parete cistica di 2 sporocisti ciascuna contenente 4 sporozoiti infettanti.

Le oocisti mature possono rimanere vive ed infettanti per più di un anno nell'ambiente esterno.



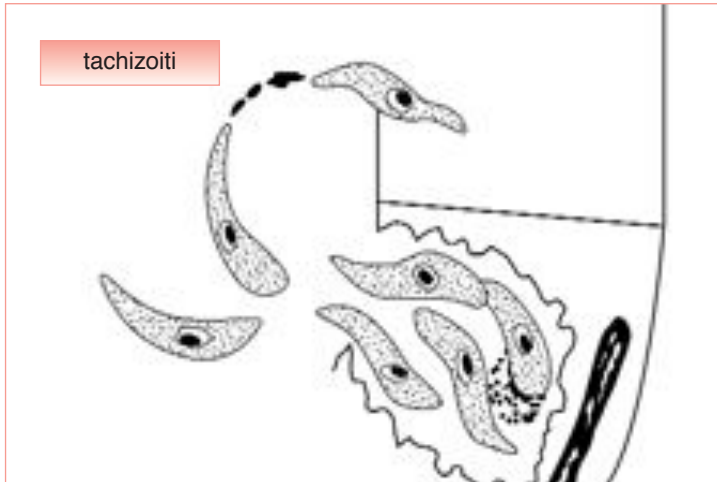
Struttura della Oocisti di Toxoplasma

Le oocisti mature, ingerite da un mammifero (ospite intermedio) giungono nell'intestino tenue dove liberano gli sporozoiti.

Gli sporozoiti penetrano nelle cellule del sistema reticolo-endoteliale, si differenziano in tachizoiti e possono disseminarsi in tutto l'organismo.

Il protozoo può così invadere cellule di tessuti diversi, e in questa fase si ha una forte risposta immunitaria sia umorale che cellulo mediata.

I parassiti in fase proliferativa, detti tachizoiti, hanno una forma a mezzaluna (4-8 μ x 2-3 μ).



Struttura dei tachizoiti di Toxoplasma

Dopo alcuni giorni (15 giorni), conseguentemente alla reazione immunitaria dell'ospite, inizia una fase di moltiplicazione più lenta con produzione di bradizoiti o cistozoiti (più piccoli e più lenti dei tachizoiti) che vengono inglobati da una membrana elastica che forma una cisti di 30-160 μ (contenente numerosi bradizoiti).

Se queste cisti vengono ingerite dal gatto il ciclo ricomincia.

Anche se i tessuti infetti vengono ingeriti da un carnivoro, uomo compreso, le cisti liberano nell'intestino i bradizoiti, i quali, come gli sporozoiti, invadono le cellule del sistema reticolo-endoteliale ed innescano la fase acuta dell'infezione.

Il ciclo di *Toxoplasma* nei vari stadi di sviluppo comprende, quindi, 4 diverse forme invasive:

Sporozoita;
Tachizoita;
Bradizoita;
Merozoita.

Tutte queste forme, attraverso il complesso apicale, sono in grado di invadere le cellule dell'ospite e replicarsi all'interno di un vacuolo parassitoforo.

L'uomo, uno dei numerosi ospiti intermedi, può essere infettato:

- 1) attraverso l'ingestione di carne cruda o poco cotta;
- 2) dalle oocisti disseminate con le feci del gatto;
- 3) attraverso la trasmissione di tachizoiti al feto, per via transplacentare, quando una donna gravida, priva di anticorpi, contrae l'infezione durante la gravidanza;
- 4) in misura molto inferiore, ma possibile, bisogna considerare anche una trasmissione per via trasfusione, con sangue infetto da tachizoiti o in seguito a trapianti di organi contenenti le cisti tissutali, ricche di bradizoiti.

La toxoplasmosi umana è cosmopolita, con incidenza molto diversa nei vari paesi, in relazione soprattutto alle abitudini alimentari e, in secondo ordine, in relazione ai rapporti con i gatti domestici, considerando che il gatto, dal primo contagio, elimina circa 100 milioni di oocisti con le feci per meno di due settimane, dopo di che il suo sistema immunitario bloccherà il protozoo e pertanto non sarà più infetto.

L'infezione contratta per ingestione di cisti o di oocisti passa il più delle volte inavvertita ed è rilevabile solo con metodi sierologici, la prevalenza di positività anticorpale anti-*Toxoplasma*, aumenta con l'età dei gruppi esaminati; è probabile che più di metà della popolazione mondiale contragga l'infezione prima di raggiungere l'età adulta.

La toxoplasmosi umana presenta quadri patologici molto diversi tra loro: essenzialmente si possono instaurare tre diverse forme cliniche della malattia:

toxoplasmosi acquisita;

congenita;

riattivazione.

Toxoplasmosi acquisita: è la patologia che un individuo, fino ad allora sieronegativo contro *Toxoplasma*, contrae in seguito all'ingestione di oocisti o pseudocisti tissutali. Il protozoo, in questa fase, prolifera invadendo tutti gli organi, nei soggetti immunocompetenti questa fase è spesso asintomatica, o può, talvolta, provocare una linfoadenopatia benigna, invece nei soggetti immunodepressi può provocare un'infezione acuta letale a carico del sistema nervoso centrale.

In questa fase, nei soggetti immunocompetenti, si ha una elevata risposta immunitaria che blocca la fase acuta dell'infezione e spesso avvia la fase cronica della toxoplasmosi, conseguente alla formazione delle pseudocisti tissutali dormienti poco immunogeniche.

Toxoplasmosi congenita: è la patologia che colpisce l'embrione quando una donna gravida sieronegativa acquisisce l'infezione.

I tachizoiti, in questa fase, dal circolo sanguigno materno attraversano la placenta e determinano quadri clinici molto gravi a carico del feto: calcificazioni intracraniche, idrocefalia e lesioni oculari.

Il bambino, alla nascita, può mostrare ritardi mentali, epilessia, cecità e alterazioni motorie.

Toxoplasmosi di riattivazione: questa forma è tipica dei soggetti immunodepressi ed è dovuta ai bradizoiti contenuti nelle pseudocisti tissutali che in assenza di un adeguato controllo immunologico si differenziano in tachizoiti e determinano quadri clinici molto gravi: polmoniti ed encefaliti spesso anche letali.

Con questo quadro clinico *Toxoplasma* viene considerato un importante opportunista.

La diagnosi di laboratorio più comune della toxoplasmosi si fonda:

Metodi indiretti

Ricerca degli anticorpi anti-*Toxoplasma* (IHA)

Ricerca degli anticorpi anti-*Toxoplasma* (ELISA)

Ricerca degli anticorpi anti-*Toxoplasma* (IFI)

Con questi dosaggi anticorpali, nel siero del paziente con toxoplasmosi, si osserva:

- Le IgM compaiono precocemente (5-14 giorni dopo l'infezione) raggiungono il massimo tra 2 e 4 settimane e possono scomparire dopo 3-16 settimane.
- Le IgG compaiono solo dopo 2 settimane e durano più a lungo.
- Le IgM non passano la barriera placentare.

Il limite del test

Il limite dei metodi sierologici è rappresentato dalla difficoltà di datare con precisione l'epoca del primo contagio a causa della lunga persistenza, nel siero del paziente, degli anticorpi della classe M.

Per superare questo problema si ricorre alla misurazione dell'avidità degli anticorpi della classe G anti-*Toxoplasma*, che aumenta gradualmente nel tempo.

Negli immunodepressi, invece, la diagnosi di infezione in atto, può essere fatta solo con metodi diretti, cioè con il riscontro del protozoo nell'adatto campione biologico. I campioni idonei per la ricerca con metodi diretti sono:

- BAL (liquido di lavaggio broncoalveolare) per le localizzazioni polmonari;
- Aspirato linfonodale per le localizzazioni linfoghiandolari;
- Liquor per le localizzazioni cerebrali.
- Sangue periferico per la ricerca con PCR

RACCOLTA DEL CAMPIONE DI BAL

Il liquido di lavaggio broncoalveolare si preleva, previa anestesia locale del paziente, con la introduzione del fibroscopio fino al bronco lobare medio.

Si iniettano aliquote di 20-50 ml di fisiologica sterile, preriscaldata a 37°C, attraverso il fibroscopio quindi si aspira delicatamente quanto iniettato, questa operazione è eseguita 2-3 volte.

La terza volta la quantità di fisiologica aspirata viene raccolta in un contenitore sterile ed inviata in laboratorio.

Preparazione del campione

Si raccomanda di lavorare sotto cappa a flusso laminare, muniti di mascherina e guanti monouso perché i campioni in esame sono molto contagiosi per la formazione di aerosol infetti.

L'operatore osserva la consistenza del campione, se molto mucoso occorrerà molto Sputasol (fluidificante), se fluido vengono messe nel campione poche gocce di fluidificante.

- Lo Sputasol soluzione di dithiotreitolo, si scioglie con 5 ml d'acqua distillata, si pongono 0.5/1 ml di sputasol diluito più 1 ml d'acqua per campione, quindi il campione così trattato viene lasciato per circa mezz'ora a temperatura ambiente.
- Dopo questo tempo si versa il campione in provetta da centrifuga e si centrifuga a 2000 giri per 10'.
- Si elimina il sovrnatante, si pongono 10ml d'acqua distillata e si ricentrifuga a 2000 giri per 10'.
- Si elimina il sovrnatante e dal sedimento, risospeso in poca acqua distillata, si prelevano 20µl per allestire:

- Vetrini con pozzetto per la fluorescenza,
- 2 vetrini sabbiati, con nome del paziente e data del prelievo, per le colorazioni

RACCOLTA DEL CAMPIONE DELL'ASPIRATO LINFONODALE

L'agoaspirato linfonodale ecoguidato, è il prelievo di un frammento di tessuto dei linfonodi con la tecnica dell'agoaspirazione (prelievo per aspirazione di un tessuto o di un liquido dell'organismo con una siringa), attraverso l'osservazione ecografica.

Le aspirazioni dei tessuti, devono essere inviate in laboratorio, in un contenitore sterile privo di qualunque fissativo o conservante.

È molto importante, che le biopsie siano inviate non fissate in formalina, altrimenti i tachizoiti, non saranno più evidenziabili.

È anche indispensabile che non trascorra molto tempo, tra il prelievo e l'invio al laboratorio, sempre per favorire la possibilità di reperire, nel campione biologico, eventuali protozoi integri.

Preparazione del campione

L'Aspirato linfonodale, giunto in laboratorio, è stemperato in una provetta con 2-5ml di soluzione fisiologica sterile, e si allestiscono:

- 2 vetrini sabbiati, con nome del paziente e data del prelievo, per le colorazioni;
- vetrini con pozzetto per l'immunofluorescenza.

RACCOLTA E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE DI LIQUOR

Il liquor, prelevato con la puntura intrarachidiale, deve essere tenuto a temperatura ambiente, non deve essere refrigerato o diluito e deve pervenire in laboratorio al massimo entro 24 ore.

In laboratorio, viene centrifugato a basso numero di giri, 200 giri per 10', per evitare di distruggere gli eventuali trofozoiti presenti.

Si elimina la maggior parte di liquido sovranatante, si risospende il sedimento e si prelevano 20µl per:

- allestire 2 vetrini con pozzetto per la fuorescenza
- 2 vetrini sabbiati, con nome del paziente e data del prelievo, per le colorazioni.

La diagnosi di laboratorio si fonda:

Metodi diretti

1. Colorazione di May-Grunwald-Geimsa (MGG)
2. Immunofluorescenza Indiretta (IFI)
3. Test molecolari

1. Colorazione di May-Grunwald-Geimsa (MGG), permette di associare la diagnosi parassitologica ad un esame del materiale cellulare presente nel campione, cellule ciliate, macrofagi, cellule alveolari, linfociti, polinucleati, eosinofili.

Consente, così, di stimare la qualità del campione in esame.

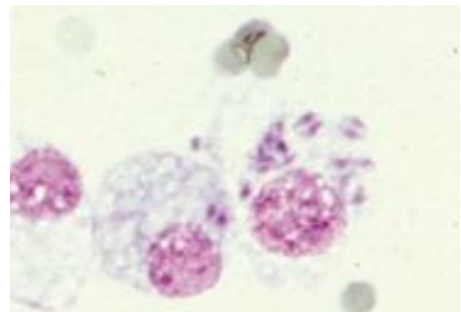
Si considera “idoneo” quel campione che, osservando a 100x, ha un numero di neutrofili per campo microscopico da 10 a 25.

Quando si osserva che la presenza di muco e di cellule epiteliali sono inferiori a 10 per campo microscopico si considera il campione non idoneo (**classificazione di Bartlett**).

Osservare al microscopio ottico con obiettivo 100x

I campioni di liquor, aspirato linfonodale, ed altro, trattato, come descritto sopra, vengono colorati e osservati al microscopio ottico a 1000x

In caso di positività si evidenzieranno i tachizoiti di *T. gondii* come corpi a mezzaluna di 4-8 μ azzuri , con nucleo centrale colorato in viola



Tachizoiti di *Toxoplasma gondii* 1000x (Col. MGG)

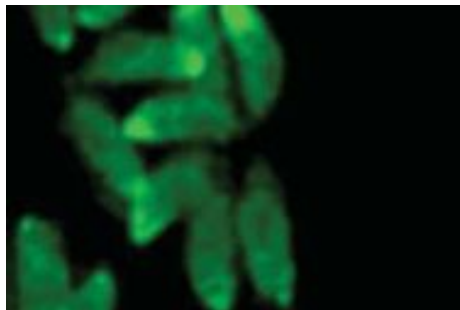
2. Immunofluorescenza Indiretta (IFI)

Il vetrino con pozzetto per IFI, contenente il campione da analizzare, viene fissato con acetone per 5'

- Si lascia asciugare
- Depositare 20 μ l di anticorpo monoclonale (specifico per le proteine presenti sulla superficie dei tachizoiti) su ciascun pozzetto.
- Incubare i vetrini per 30' a 37°C in camera umida
- Lavare il vetrino in PBS 7.2
- Lasciare asciugare
- Depositare 20 μ l di anticorpo coniugato anti IgG di topo (diluito 1/10 in PBS) marcato con isotiocianato di fluoresceina su ciascun pozzetto
- Incubare i vetrini per 30' a 37°C in camera umida
- Lavare il vetrino in PBS 7.2
- Lasciare asciugare il vetrino, montare con glicerina tamponata

Osservare al microscopio a fluorescenza con obiettivo 40 e 100x

Se presenti i tachizoiti di *Toxoplasma gondii*, appariranno come corpiccioli di 4 a 8 μ e il diametro da 2 a 3 μ a mezzaluna disposti spesso a due a due colorati in verde brillante.



Tachizoiti di *Toxoplasma gondii* (IFI +)

3. Test molecolari

Molte delle tecniche correntemente usate in un laboratorio di diagnostica si basano sull'amplificazione mediante PCR (Polymerase Chain Reaction) degli acidi nucleici, sia di specifici frammenti di DNA che di RNA dopo trascrizione in cDNA attraverso l'uso di una trascrittasi inversa.(RT-PCR).

Una volta amplificati questi frammenti possono essere analizzati in vari modi: dimensione dei frammenti, analisi delle sequenze, riamplicazione con una seconda coppia di primer o ibridizzazione con sonde marcate. L'analisi può essere sia qualitativa che quantitativa, attraverso i vari formati delle tecniche di Real-time PCR.

Toxoplasma gondii può essere ricercato con la tecnica di Real-time PCR attraverso l'utilizzo di due sonde specifiche di ibridazione, le sonde sono due diversi oligonucleotidi che si appaiono ad una sequenza del frammento amplificato durante la fase di annealing del ciclo di PCR. Una sonda è marcata all'estremità 5' con un fluorocromoforo, mentre l'estremità 3' è fosforilata, l'altra sonda è marcata all'estremità 3' con un fluorocromoforo.

Solo dopo l'appaiamento allo stampo di DNA che ricerchiamo le due sonde arrivano in stretta connessione e ciò si traduce in una marcata produzione di fluorescenza, misurando l'emissione di fluorescenza, con una apparecchiatura dedicata, si ottiene il risultato dell'esame.

Il DNA genomico di *Toxoplasma gondii* può essere purificato da diversi campioni biologici:

- sangue periferico,
- BAL (liquido di lavaggio broncoalveolare),
- sangue del cordone ombelicale,
- liquor,
- villi corionici,
- fluido amniotico.

Il campione biologico viene trattato con 200µl di acqua distillata ultrapura e 50 µl di tampone fosfato pH 7.2; accanto al campione da analizzare viene sempre testato un controllo positivo e un controllo negativo per saggiare la riuscita della reazione.

Leishmaniosi cutanee

Nell'uomo, l'evoluzione delle varie leishmaniosi è caratterizzata da una minore o maggiore tendenza dei parassiti a propagarsi dalla cute alle mucose o a colonizzare determinati organi, e dipende, molto probabilmente, dallo stato immunologico del paziente. *Leishmania* spp., pertanto, può determinare quadri clinici molto diversi tra loro ed essere considerata, in soggetti immunodepressi, addirittura, un opportunisto.

Alcuni autori (Badarò 1986 e Berenguer 1989) hanno segnalato casi di leishmaniosi in soggetti immunocompromessi; in alcuni di questi pazienti, sottoposti a terapia corticosteroidica per altre cause, la leishmaniosi si è sviluppata molti anni dopo che essi si erano allontanati dalle zone di endemia, e ciò farebbe pensare che *Leishmania* può sopravvivere per diverso tempo nell'organismo sano senza provocare alcuna manifestazione clinica per poi virulentarsi quando le difese immunitarie si abbassano.

Un altro dato che rafforza la tesi del comportamento opportunistico di *Leishmania* è uno studio condotto da Gradoni ed altri ricercatori dell'Istituto Superiore di Sanità che hanno dimostrato la presenza di reattività dermica anti-*Leishmania* in gran parte della popolazione sana delle zone endemiche studiate.

In tali zone la malattia causata da *Leishmania* è stimata intorno a 20-25 casi l'anno, negli adulti, ed altrettanti nei bambini; questo dato è frutto di un lavoro effettuato in AOC, pubblicato nel 2003 su "Journal of Antimicrobial Chemotherapy", che stimava l'incidenza delle Leishmaniosi giunte alla nostra osservazione; pertanto si evince che l'incontro Leishmania-Uomo non sempre si traduce in un processo patologico ma questo si può instaurare, anche a distanza di anni, quando le condizioni di proliferazione del protozoo diventano più favorevoli, a causa di una immunodepressione dell'ospite. I quadri patologici provocati da *Leishmania* possono essere, oltre alla Leishmaniosi Viscerale, descritta nel II capitolo che può, anch'essa essere più o meno grave, presentare tutti i sintomi classici della malattia o solo alcuni: la Leishmaniosi cutanea, la Leishmaniosi mucocutanea, la Leishmaniosi con localizzazione prevalente nei linfonodi, la Leishmaniosi con localizzazione gastrica e duodenale.

Le leishmaniosi cutanee "del vecchio mondo" sono diffuse in focolai discontinui in Asia, Medio Oriente, Africa settentrionale e nei paesi mediterranei; in Italia è localizzata, prevalentemente, sul versante orientale della penisola.

Sono causate da specie diverse di leishmanie con quadri clinici diversi. *Leishmania tropica* (l'agente eziologico del "bottone d'Oriente") è diffusa in Medio Oriente, Turchia e Grecia. *Leishmania major* è diffusa in Asia Centrale ed in Africa. *L. aethiopia* è presente sull'altipiano etiopico

L. infantum è presente nei paesi del bacino del Mediterraneo, quindi in Italia, qui i vettori presenti sono *Phlebotomus perniciosus*, *P. ariasi* e *P. perfiliewi*).

L'infezione è spesso asintomatica.

Il periodo d'incubazione della malattia varia da alcuni giorni ad alcuni mesi e dipende dall'entità della carica infettante. Compaiono una o più lesioni cutanee, nelle sedi delle punture dei flebotomi (viso, collo, braccia, gambe). All'inizio è un nodulo eritematoso, che cresce e si copre di una crosta, la quale poi può staccarsi e lasciare

un'ulcera a margini rilevati. Dopo un tempo variabile la lesione guarisce, lasciando una cicatrice, anche deturpante. La lesione è solitamente poco dolente: quando duole spesso è segno di una sovrinfezione batterica.

Possono aversi recidive in tarda età o in condizioni di immunodepressione o per reinfezione con diversi zimodemi.

Le lesioni cutanee di *L. major* tendono a essere rapidamente essudatizie e necrotiche e possono raggiungere dimensioni fino a 6 cm; evolvono in poche settimane e guariscono in 3-5 mesi.

Le lesioni da *L. tropica* sono meno gravi (dimensioni massime di 2 cm circa) e hanno un'evoluzione più lenta: l'incubazione è di 2-4 mesi e possono persistere anche per 2 anni.

Le lesioni da *L. aethiopica* interessano il viso: sono tante piccole papule che confluiscono in un'unica lesione nodulare o una placca, che può anche non ulcerarsi, ma guarisce molto lentamente (anche dopo 5 anni). Se la lesione interessa il confine muco-cutaneo del naso e delle labbra può estendersi alle mucose e provocare danni gravi deturpanti che caratterizzano le forme mucose americane.

L. infantum, responsabile di forme viscerali, in Italia, può dare forme cutanee: lesioni nodulari che, solitamente, non si ulcerano e decorrono molto lentamente.

I parassiti si localizzano nelle cellule reticolo-endoteliali del derma, ai margini delle lesioni (dove i parassiti vanno ricercati per la diagnosi microscopica), nei vasi e nei linfonodi vicini.



Leishmaniosi cutanea

La diagnosi di laboratorio, nei pazienti con manifestazioni cliniche localizzate in distretti anatomici limitati, così come nei pazienti immunodepressi, sia per cause patologiche che iatrogene, non può essere affidata alla ricerca degli anticorpi anti-*Leishmania*, che in questi casi ha scarsa o nulla significatività; infatti si è osservato, dal 1992 ad oggi una frequente negatività del test di immunofluorescenza per la ricerca degli anticorpi specifici nei soggetti immunodepressi, così come nelle forme cutanee o localizzate ai soli linfonodi, nonostante la ricerca diretta del protozoo fosse positiva e, si è osservato che anche quando, la ricerca sierologica era positiva, il titolo anticorpale risultava, comunque, molto basso.

La diagnosi di laboratorio si fonda, su metodi diretti ricercando il protozoo nel materiale biologico ottenuto per grattamento o per aspirazione dai bordi delle lesioni. Questo materiale viene in parte strisciato su dei vetrini portaoggetto, lasciato asciugare e colorato con May-Grunwald Giemsa, in parte posto in provette con EDTA, per la coltura.

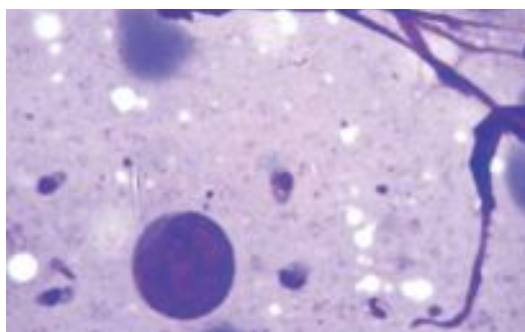
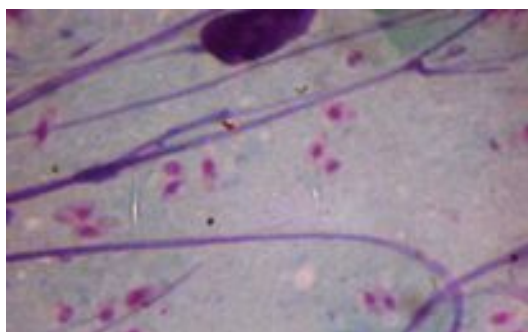
Metodi diretti

1. Colorazione May-Grunwald Giemsa
2. Coltura

1. Colorazione May-Grunwald Giemsa

I preparati, colorati, si osservano al microscopio ottico con obiettivo 100x.

In caso di positività, si evidenzieranno gli amastigoti di *Leishmania*, intra ed extracellulari, come corpiccioli rotondeggianti od ovoidali della grandezza di 1.5-4 μ con nucleo eccentrico, cinetoplasto bastoncellare affianco al nucleo, entrambi colorati in rosso violaceo e con citoplasma colorato in azzurro.



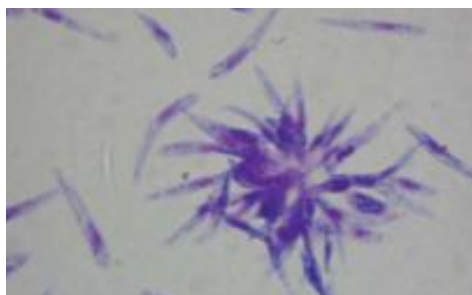
Amastigoti di *Leishmania*: Biopsia cutanea 1000x (Col. MGG)

2. Coltura

Il materiale raccolto in provetta con EDTA viene utilizzato per l'allestimento della coltura; come terreno utilizziamo quello di Tobie modificato da Evans (EMTM 1987)

Nel terreno completo vengono inoculate 3-5 gocce di biopsato e viene incubato a 23° C per al massimo 30 giorni; trascorsi i primi 10-15 giorni si effettua una prima osservazione microscopica per evidenziare la positività della coltura, in caso di negatività, si effettua una ulteriore semina, 2-3 gocce di fase liquida si inoculano in terreno di coltura fresco.

In caso di positività della coltura si evidenzieranno, al microscopio ottico, i promastigoti che appaiono come flagellati mobili lunghi 10-15 μ con nucleo centrale ed il cinetoplasto all'estremità anteriore del corpo del protozoo da cui si origina un unico flagello lungo fino a 15 μ .



Promastigoti di *Leishmania*:
Coltura in vitro 400x

Ricerca di *Leishmania*

L'aspirato linfonodale, se di consistenza poco solida, viene solo centrifugato a 2000 giri per 10'. Il sedimento ottenuto, viene risospeso in un piccolo volume di acqua distillata sterile, e 20 μ l di questa sospensione vengono posti su ciascun vetrino per le colorazioni e per la coltura.

Se, invece, è di consistenza solida, come un pezzo di tessuto, si preparano:

- “impressioni” su vetrino per le colorazioni,
- si stempera il pezzo di tessuto in una provetta sterile con fisiologia in modo da frammentare quanto più possibile il campione in pezzi più piccoli e,
- 5-7 gocce di questo preparato vanno insemenate nel terreno di coltura EMTM

La diagnosi di laboratorio si fonda:

Metodi diretti

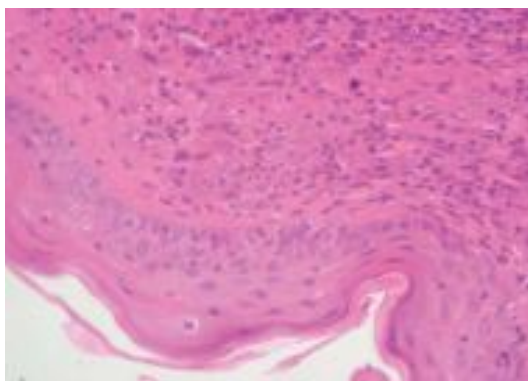
1. Colorazione May-Grunwald Giemsa (MGG)
2. Coltura

1. Colorazione di MayGrunwal-Giemsa (MGG)

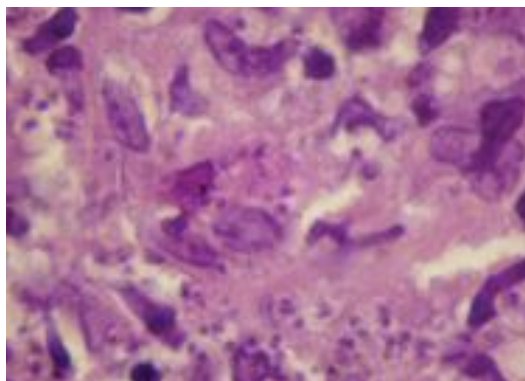
Il vetrino, colorato, viene osservato al microscopio ottico con obiettivo 100x.

L'osservazione del linfonodo è più difficile degli altri materiali biologici, in quanto il tessuto è più compatto e spesso il riconoscimento degli amastigoti risulta difficile.

Se positivo, si evidenzieranno gli amastigoti di *Leishmania*, intra ed extracellulari, come corpiccioli rotondeggianti od ovoidali della grandezza di 1.5-4 μ con nucleo eccentrico, cinetoplasto bastoncellare affianco al nucleo, entrambi colorati in rosso violaceo e con citoplasma colorato in azzurro.



Amastigoti di *Leishmania*: Aspirato linfonodale
200x (Col. MGG)



Amastigoti di *Leishmania*: Aspirato linfonodale
1000x (Col. MGG)

2. Coltura

Viene eseguita utilizzando la stessa metodica descritta per il biopsato cutaneo.

Ricerca di *Leishmania*

Nel paziente HIV + la localizzazione delle leishmanie è, atipicamente, nel tratto gastroenterico. In questi pazienti, la cui sierologia specifica, spesso, è negativa o, al massimo, positiva a bassi titoli, la diagnosi di leishmaniosi si fonda, quindi, sulla ricerca delle Leishmanie nell'adatto campione biologico.

Il materiale di elezione è l'aspirato duodenale o il biopsato duodenale.

L'aspirato duodenale, giunto, rapidamente, in laboratorio viene centrifugato a basso numero di giri, 2000 giri, per 10'.

Il sedimento ottenuto, viene risospeso in un piccolo volume di acqua distillata sterile,

- 20µl di questa sospensione vengono posti su ciascun vetrino per le colorazioni,
- 5-7 gocce vengono insemenate nel terreno per la coltura.

Se, invece, il **biopsato duodenale**, è di consistenza, solida, si preparano delle:

- "impressioni" su vetrino per le colorazioni e,
- si stempera il pezzo di tessuto in una provetta sterile con fisiologia in modo da frammentare quanto più possibile il campione in pezzi più piccoli e 5-7 gocce di questo preparato vanno insemenate nel terreno di coltura.

La diagnosi di laboratorio si fonda:

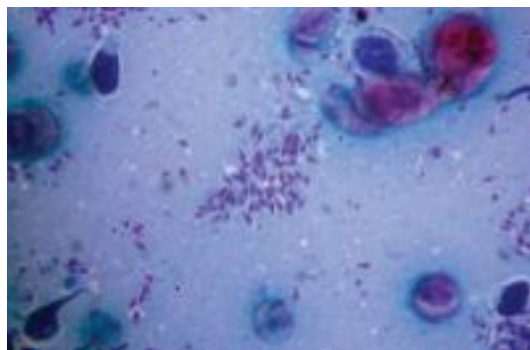
Metodi diretti

1. Colorazione May-Grunwald Giemsa (MGG)
2. Coltura

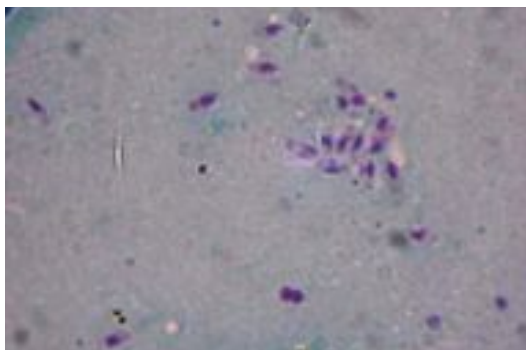
1. Colorazione è di MayGrunwal-Giemsa, la stessa utilizzata per gli altri tessuti.

Il vetrino, colorato, viene osservato al microscopio ottico con obiettivo 100x

Se positivo, si evidenzieranno gli amastigoti di *Leishmania*, intra ed extracellulari, come corpiccioli rotondeggianti od ovoidali della grandezza di 1.5-4µ con nucleo eccentrico, cinetoplasto bastoncellare affianco al nucleo, entrambi colorati in rosso violaceo e con citoplasma colorato in azzurro.



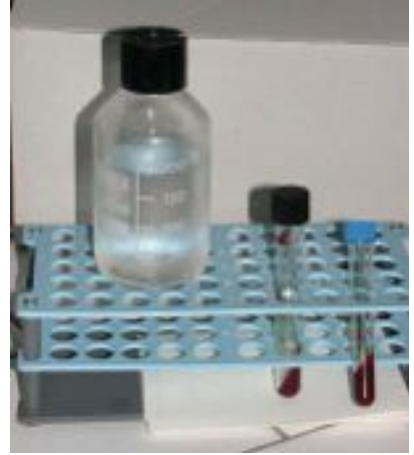
Amastigoti di *Leishmania*: Aspirato duodenale
400x (Col. MGG)



Amastigoti di *Leishmania*: Aspirato duodenale
1000x (Col. MGG)

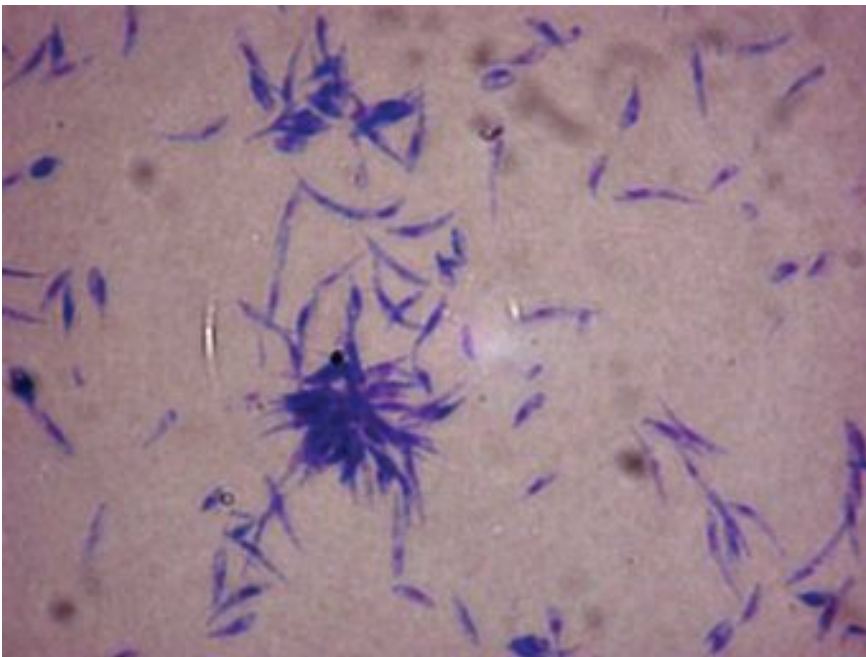
2. Coltura

Quando si allestiscono le colture, nel terreno selettivo EMTM, con biopsati o aspirati duodenali bisogna aggiungere, per favorire la crescita delle Leishmanie, maggiore quantità di gentamicina e 5-fluorocitosina nella fase liquida del terreno, perchè il succo duodenale non è un liquido sterile, ma anzi, ricco di batteri e funghi, quest'ultimi, se presenti nel campione crescerebbero più celermente delle leishmanie, rendendo impossibile, poi, la moltiplicazione dei protozoi che sono più a lenta crescita.



Costituente del terreno selettivo EMTM

In caso di positività si evidenzieranno, all'esame microscopico, i promastigoti di *Leishmania* come flagellati mobili di 10-15 μ con nucleo centrale e cinetoplasto all'estremità anteriore del corpo, da cui si origina un unico flagello lungo 10 μ .



Promastigoti di *Leishmania infantum*: Coltura in vitro

L'esame parassitologico della biopsia muscolare, viene eseguito, per la ricerca dei microsporidi, genere *Pleistofora* e *Trypanosoma cruzi*

Ricerca di microsporidi

Il prelievo di biopsia muscolare viene eseguito per agoaspirazione.

Il genere *Pleistofora* è stato assegnato al sottordine Pansporoblastina in quanto è caratterizzata da una spora racchiusa da una membrana pansporoblastica, molto spessa, amorfa che viene prodotta dal protozoo stesso e che viene detta vescicola sporofora;

La localizzazione elettiva è nelle cellule muscolari di pazienti HIV+, con miosite

La spora contiene un unico nucleo; la sporogonia produce diverse spore per sporonte.

Le spore misurano $2.8\mu \times 3.2\mu$.

Il tubulo polare è costituito da 8-12 spire.

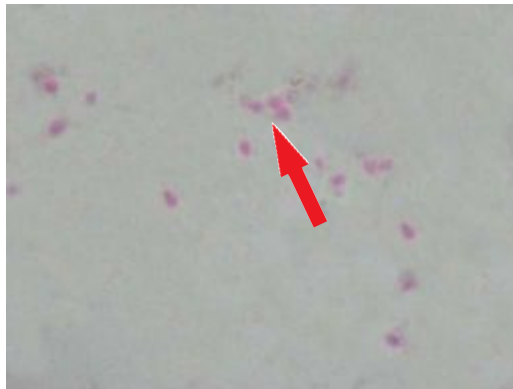
La sporogonia, avviene in vacuolo parassitoforo.

Per la ricerca dei microsporidi (*Pleistophora*) la biopsia muscolare prelevata con agoaspirazione viene posta su:

- vetrini sabbiati, con nome del paziente e data del prelievo, e vengono eseguiti strisci sottili, schiacciando il biopsato, con un altro vetrino, quanto più possibile sul vetrino portaoggetti.

Asciugati, i vetrini vengono colorati con la colorazione di Weber mod. (per l'esecuzione vedi cap. generalità).

Se positiva si osserveranno spore rosa-rosse, della grandezza di 2-3 μ contenenti un nucleo più scuro, talvolta nel citoplasma si osservano aree incolori



Spore di microsporidi: Biopsato muscolare 1000x (Col. di Weber)

Ricerca di *Trypanosoma Cruzi*

Nel biopsato muscolare si può ricercare anche *Trypanosoma cruzi*, la cui ricerca è dettagliatamente descritta nel II capitolo.

La diagnosi di laboratorio si fonda:

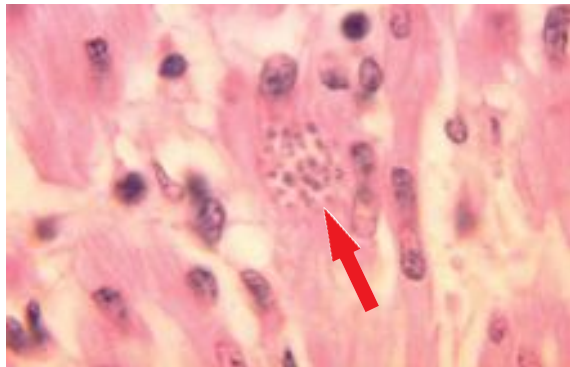
Metodi diretti

1. Colorazione May-Grunwald Giemsa (MGG)
2. Xenodiagnosi

1. Colorazione May-Grunwald Giemsa (MGG)

Particolare riguardo merita l'analisi del biopsato muscolare per le diagnosi di tripanosomiasi croniche, pertanto nella fase cronica, cardiopatia chagastica, i vetrini allestiti da questo materiale biologico vengono colorati con May-Grunwald Giemsa.

Se la ricerca risulterà positiva si evidenzieranno i tripanosomi come amastigoti raggruppati a nido d'ape all'interno della muscolatura.



Amastigoti di tripanosomi: Biopsia muscolare 1000x (Col. MGG)

L'esame microscopico del biopsato permette, però, di evidenziare i tripanosomi nelle prime fasi della malattia, ma con il passare del tempo questa ricerca tende a negativizzarsi perché gli organi che restano interessati sono il cuore, il grosso intestino e il sistema nervoso centrale, pertanto si ricorre nelle aree di elevata endemia alla xenodiagnosi.

2. Xenodiagnosi

Questo è un metodo molto semplice e sensibile per la diagnosi di tripanosomiasi; il paziente, con sospetto di tripanosomiasi, si fa pungere da cimici sicuramente prive di tripanosomi, si controllano le feci delle cimici dopo 20-30 giorni, periodo di incubazione, in caso di positività, si osserverà, quindi, la presenza di pro-ed epimastigoti nel campione fecale delle cimici.

Ricerca di Amebe a vita libera

Le Amebe a vita libera appartengono alla classe Lobosea genere *Naegleria* ed *Acanthamoeba*.

Phylum	Sarcomastigophora				
Subphylum	Sarcodina				
Superclasse	Rhizopodea				
Classe	Lobosea				
Ordine	Schizopyrenida	Amoebida			
Famiglia	Vahlkampfiidae	Acanthamoebidae	Endamoebidae		
Genere	<i>Naegleria</i>	<i>Acanthamoeba</i>	<i>Entamoeba</i>	<i>Iodamoeba</i>	<i>Endolimax</i>
Specie	<i>fowleri</i>	<i>astronyxis</i>	<i>istolytica</i>	<i>butschlii</i>	<i>nana</i>
		<i>culbertsoni</i>	<i>dispar</i>		
		<i>castellanii</i>	<i>hartmanni</i>		
			<i>coli</i>		
			<i>polecki</i>		
			<i>gingivalis</i>		

Posizione tassonomica delle Amebe a vita libera

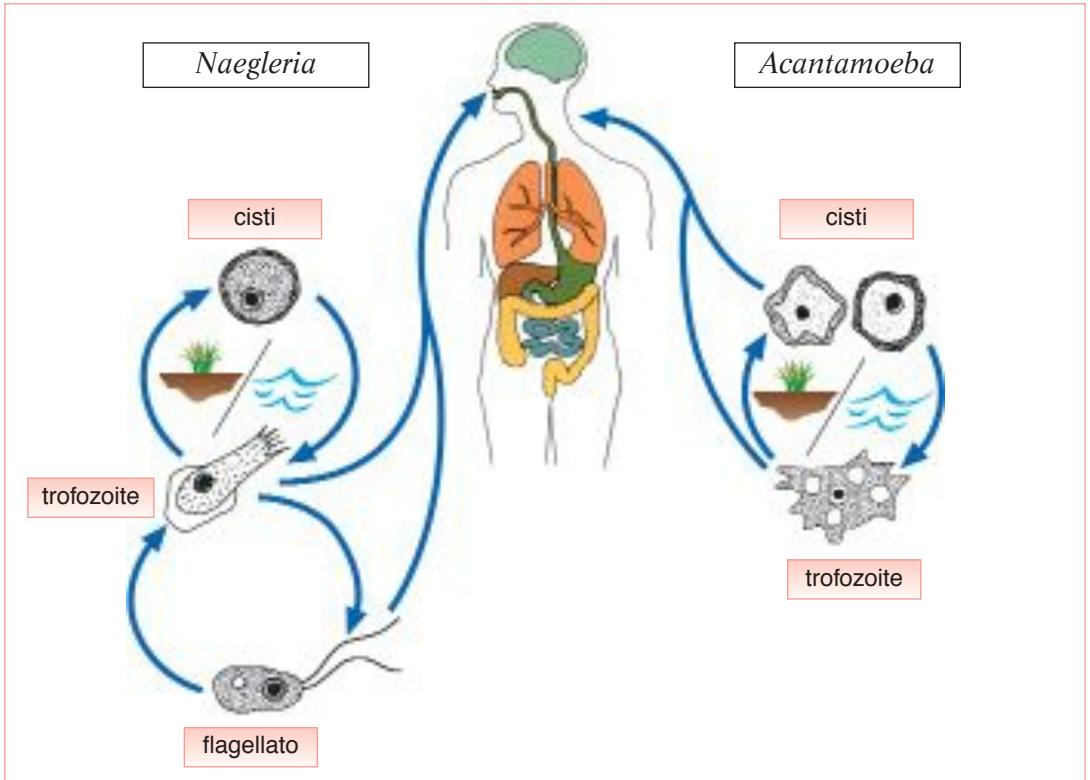
Queste amebe non svolgono il loro ciclo biologico nell'intestino dell'uomo, ma sono libere in natura.

Sono parassiti accidentali perché normalmente svolgono il proprio ciclo biologico nell'ambiente libero, ma capitati accidentalmente in un vivente, svolgono il loro ciclo vitale producendo danni all'ospite.

La loro ricerca, pertanto, non viene effettuata nei campioni di copros, ma in altri tessuti e/o organi in prevalenza cornea e liquido cefalorachidiano.

Le amebe a vita libera che possono essere causa, nell'uomo, di gravi infezioni sono *Naegleria fowleri* e *Acantamoeba* spp. che determinano la meningoencefalite amebica primaria, la encefalite granulomatosa amebica e la cheratite amebica.

Naegleria spp. e *Acantamoeba* spp.: Ciclo Biologico



La trasmissione all'uomo di questi protozoi può avvenire per via nasale nuotando nelle acque calde (30-40°C) di laghi stagni o piscine anche termali contaminati dalle cisti di questo protozoo, o per via aerea con localizzazioni nella cornea o nell'apparato respiratorio e nel sistema nervoso centrale.

Naegleria

In acqua dolce si presenta in fase flagellata (8-18 μ) con due flagelli polari anteriori, mentre in soluzioni isotoniche si presentano in una fase ameboide (10-25 μ). Le forme di resistenza (cisti) hanno un solo nucleo e servono per la disseminazione dei protozoi per via aerea. L'infezione può essere contratta per via nasale nuotando nell'acqua calde (30°-40°) di laghi, stagni o piscine, anche termali.

I trofozoiti penetrano attraverso la mucosa nasale e raggiungono il sistema nervoso centrale. La malattia, dopo una incubazione di 3-7 giorni, inizia bruscamente con cefalea, vomito, rigidità nucale e febbre. Dopo 2-3 giorni compaiono agitazione psicomotoria e convulsioni seguite da paralisi flaccide e stato comatoso. L'esito è spesso letale.

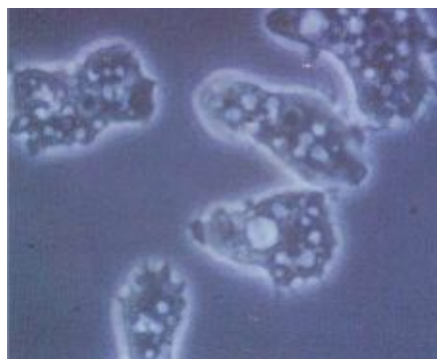
La diagnosi di laboratorio si fonda sull'esame del liquido cefalo-rachidiano, che appare torbido ed emorragico, con leucocitosi neutrofila, aumento delle proteine e diminuzione del glucosio.

Il liquor, una volta prelevato, deve essere tenuto a temperatura ambiente, non deve essere refrigerato o diluito e deve pervenire in laboratorio al massimo entro 24 ore.

In laboratorio, viene centrifugato a basso numero di giri, 200 giri per 10', per evitare di distruggere le eventuali amebe presenti.

Si elimina la maggior parte di liquido sovranatante, si risospende il sedimento e si allestiscono dei vetrini per l'esame a fresco e per le colorazioni specifiche.

All'esame microscopico a fresco si evidenziano i trofozoiti amebici di 15-30 μ attivamente mobili per emissione di pseudopodi ialini, provvisti, spesso, di eventuale vacuolo pulsante, polimorfi con voluminosi granuli intracitoplasmatici e soprattutto con nucleo caratterizzato da un voluminoso cariosoma centrale.



Trofozoite di *Naegleria* spp. 400x
(Campo oscuro)

Coltura

L'isolamento delle amebe dal liquor o da materiale biopsato si effettua utilizzando un terreno all'agar non nutritivo distribuito in piastre di Petri e ricoperto da una sospensione di batteri Gram negativi (es. *E.coli*) vivi o uccisi al calore.

Le colture incubate a 37°C vanno osservate per una decina di giorni: la positività sarà evidenziata dalla comparsa di placche di lisi nella patina batterica e da un fronte di trofozoiti che avanza in senso centrifugo. Prelevando con ansa questo fronte si può effettuare un esame microscopico per confermare la presenza, nel terreno di coltura, delle amebe.

Naegleria presenta inoltre la fase flagellata che manca in *Acanthamoeba* (v. sotto).

Questa caratteristica viene messa in evidenza quando nel terreno di coltura viene aggiunta acqua distillata, dopo 4-24h si evidenzia la tipica forma a sigaro allungata della fase flagellata.

***Acanthamoeba* spp.**

Comprende alcune specie (*A. astronixis*, *A. culbertsoni* e *A. castellanii*) le cui cisti possono infettare per via aerea la cornea e i trofozoiti che ne originano possono causare riniti e talora broncopolmoniti benigne. In ospiti immunodepressi ci può essere interessamento del sistema nervoso centrale, per disseminazione dei trofozoiti, per via ematica, da focolai localizzati in altri organi. In tali casi si hanno disturbi psichici con cefalea, convulsioni, deficit motori.

I trofozoiti sono privi di flagelli; le cisti hanno un solo nucleo.

La diagnosi di laboratorio si fonda sull'esame del liquor, dell'essudato corneale o epitelio corneale e del broncoaspirato, attraverso l'esame microscopico diretto e dopo colorazioni specifiche.

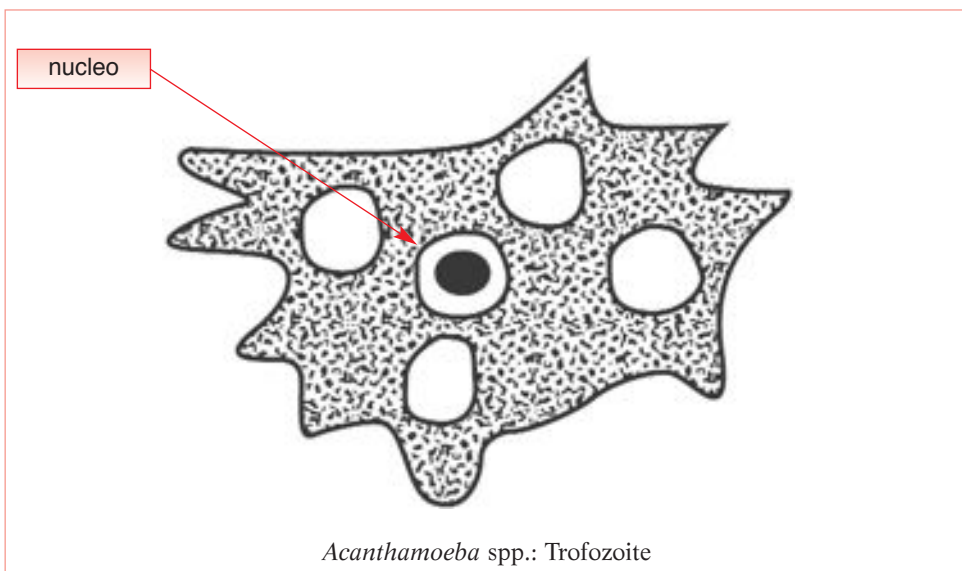
Il liquor, quasi sempre limpido, presenta aumento delle proteine, riduzione del glucosio, presenza di pleocitosi linfo-monocitaria.

Il riscontro delle amebe è assai raro, spesso la diagnosi di encefalite amebica si raggiunge solo con l'autopsia del tessuto cerebrale che mostra i trofozoiti di 20-40 μ .

I campioni di epitelio corneale, ottenuto con raschiamento dell'ulcera corneale sono inviati in laboratorio in un contenitore sterile contenente un poco di soluzione fisiologica.

Viene effettuato un esame microscopico a fresco e dopo colorazioni specifiche, di Giemsa e tricromica.

Lo scraping corneale risulterà positivo se all'osservazione microscopica diretta o dopo colorazioni si evidenzieranno i trofozoiti amebici di 20-40 μ con emissione di pseudopodi a macchia d'olio e presenza costante di propaggini filiformi (acantopodi) e cariosoma nucleare molto grosso.



Se il Parassitologo ha ancora dubbi circa la interpretazione dell'osservazione microscopica, può ricorrere all'ausilio delle colorazioni permanenti.

Colorazioni Permanenti

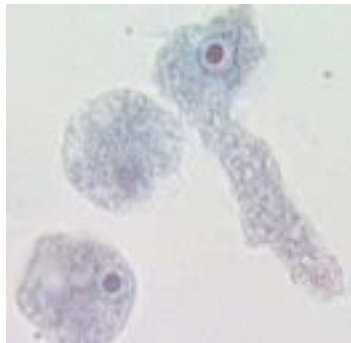
Le colorazioni che, più comunemente vengono impiegate per la ricerca delle amebe, nel campione biologico analizzato è:

LA COLORAZIONE TRICROMICA

Utile per la sicura identificazione, la cui procedura è illustrata dettagliatamente nel capitolo generalità.

Interpretazione

- Il citoplasma di cisti e trofozoiti appare blu-verde, con una pallida sfumatura.
- La cromatina nucleare, i micro e macronuclei, gli eritrociti ingeriti ed i batteri appaiono di color rosso o rosso-porpora.
- Il materiale di fondo si colora in verde chiaro.



Acanthamoeba spp. (Col. tricromica)

Coltura

L'isolamento delle amebe dal liquor o da altro materiale biologico (scraping corneale, BAL ecc) si effettua utilizzando il terreno all'agar non nutritivo, come descritto per *Neglaeria*. Le colture incubate a 37°C vanno osservate per una decina di giorni: la positività sarà evidenziata dalla comparsa di placche di lisi nella patina batterica e da un fronte di trofozoiti che avanza in senso centrifugo.

Prelevando con ansa questo fronte si può effettuare un esame microscopico per confermare la presenza, nel terreno di coltura, delle amebe.

La differenziazione tra i due generi di amebe si fonda sulle diverse dimensioni dei trofozoiti e delle cisti e sui movimenti degli pseudopodi. In *Acanthamoeba* manca inoltre la fase flagellata.

Trichomonas vaginalis

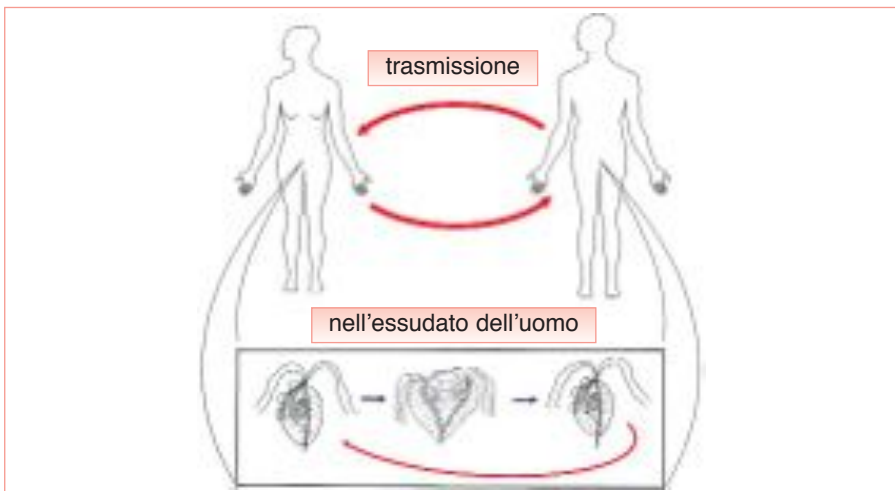
Alla classe Zoomastigoforea appartiene l'ordine dei Trichomonadida. In questo ordine è patogeno, per l'uomo, *Trichomonas vaginalis*.

phylum	Sarcomastigophora								
Subphylum	Mastigophora								
Classe	Zoomastigophora								
Ordine	Kinetoplastida		Diplomonadida		Retortamonadida		Trichomonadida		
Sottordine	Trypanosomatina								
Famiglia	Trypanosomatidae		Hexamitidae	Tetranitidae			Trichomonadidae		Monocercomonadide
Genere	<i>Leishmania</i>	<i>Trypanosoma</i>	<i>Giardia</i>	<i>Enteromonas</i>	<i>Retortamona</i>	<i>Chilomastix</i>	<i>Trichomonas</i>	<i>Trichomonas</i>	<i>Dientamoeba</i>
	<i>major</i>	<i>cruzi</i>	<i>intestinalis</i>	<i>hominis</i>	<i>intestinalis</i>	<i>mesnilis</i>	<i>hominis</i>	<i>vaginalis</i>	<i>fragilis</i>
	<i>aethiopica</i>	<i>rangeli</i>					<i>lenax</i>		
	<i>infantum</i>	<i>brucei gambiense</i>							
Specie	<i>tropica</i>	<i>brucei rhodiense</i>							
	<i>mexicana</i>	<i>brucei brucei</i>							
	<i>donovani</i>								
	<i>archibaldi</i>								

Posizione tassonomica di *T. vaginalis*

La tricomoniasi, causata da questo protozoo, è un'infezione che provoca lesioni più o meno gravi alla mucosa vaginale ed uretrale. Le infezioni spesso sono asintomatiche. Ha diffusione cosmopolita ed alta incidenza.

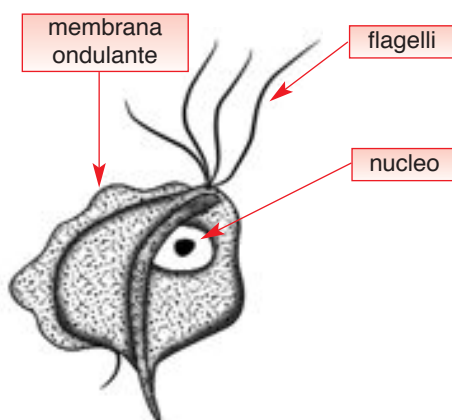
Trichomonas vaginalis: Ciclo Biologico



Viene acquisita con i rapporti sessuali; rara è la trasmissione ai neonati durante il parto e le infezioni contratte con l'uso in comune di biancheria intima contaminata.

Il pH vaginale è normalmente mantenuto dai lattobacilli sul valore fisiologico di 4,5, ciò inibisce la colonizzazione da parte di batteri estranei; in presenza del protozoo, che sottraendo il glicogeno alle cellule epiteliali, impedisce ai lattobacilli di trasformare il glicogeno in acido lattico, il pH si innalza fino a 5,5-6, ottimale per lo sviluppo sia del protozoo sia di vari batteri patogeni. *Candida albicans* (un lievito che cresce meglio in vagine a pH acido), non si moltiplica in vagine parassitate da *T. vaginalis*. In campioni di essudato vaginale, soprattutto nelle bambine, è anche possibile ritrovare uova di *Enterobius vermicularis* per passaggio della femmina dall'ano alla vagina.

***T. vaginalis* è un protozoo flagellato, piri-forme, con dimensioni di circa 10 x 12 µ; in alcuni casi può assumere forma rotondeggiante e dimensioni maggiori. Il protozoo, di cui è conosciuta la sola forma di trofozoite, presenta 5 flagelli, quattro dei quali situati al polo anteriore e uno rivolto all'indietro che partecipa alla formazione della membrana ondulante. Il nucleo, di forma ovale, è situato verso l'estremità anteriore del flagellato; all'altezza del nucleo prende origine l'assostilo che sporge dal polo posteriore della cellula.**



Trichomonas vaginalis: trofozoite

Raccolta dei campioni

Con un tampone sterile prelevare l'essudato vaginale profondo o uretrale. Nel caso di un maschio il prelievo va eseguito dopo un massaggio prostatico.

Mettere, immediatamente, il tampone in una provetta sterile contenente circa 3 ml di soluzione fisiologica sterile preriscaldata (37°C).

La diagnosi di laboratorio si basa essenzialmente sull'esame microscopico degli essudati vaginale e uretrale sia "a fresco" che dopo fissazione e colorazione.

Si possono anche utilizzare tecniche colturali con specifici terreni addizionati di siero animale e antibiotici.

Metodi diretti

1. Esame a fresco: si stempera 1-2 g di campione in soluzione fisiologica e si osserva il preparato al microscopio ottico con obiettivo 40x.
2. Colorazione di Giemsa
3. Coltura

1. Esame a fresco

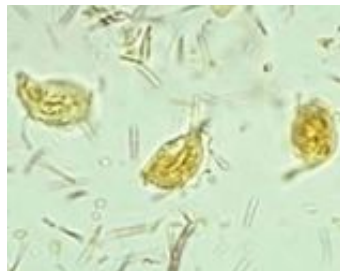
Si fonda sulla messa in evidenza dei trofozoiti vitali. È consigliabile eseguire la ricerca nel più breve tempo possibile dal momento della raccolta, perché il protozoo perde rapidamente la propria mobilità e diviene più difficilmente evidenziabile all'osservazione microscopica.

1. Rimuovere il tampone spremendolo sulla parete della provetta.
2. Centrifugare la provetta per 2 minuti a 1500 giri/minuto oppure lasciare sedimentare il materiale per 10 minuti.
3. Con una pipetta rimuovere il sovrnatante senza toccare il sedimento.
4. Prelevare una goccia di sedimento, porla su un vetrino portaoggetto e coprire con un coprioggetto.
5. Esaminare al microscopio a 100 e 400 ingrandimenti.

Nei preparati "a fresco" *T. vaginalis* può essere identificato per il tipico movimento energico e a scatti. Dal momento che questo flagellato è la sola specie di *Trichomonas* che alberga nell'apparato urogenitale umano, può essere sufficiente osservare la grandezza e la presenza di numerosi flagelli mobili.



Trofozoiti di *Trichomonas vaginalis* 400x

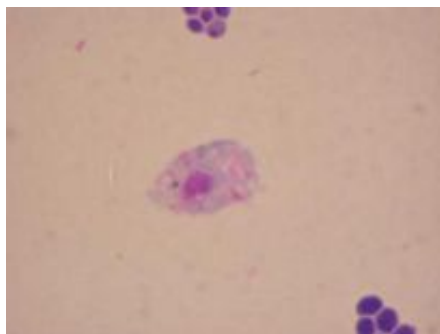


Trofozoiti di *Trichomonas vaginalis* 400x

2. Colorazione di Giemsa

Nel caso si vogliano allestire preparati permanenti, la colorazione indicata è quella di Giemsa al 3%.

Si prepara uno striscio del materiale sedimentato, ottenuto con una centrifugazione a 1.500 giri per 3 minuti, deponendo su un vetrino una goccia della sospensione coprologica che si striscia in modo da ottenere bande sottili alternate a bande spesse; una volta che lo striscio è ben asciugato si procede con la colorazione illustrata in dettaglio nel capitolo generalità.



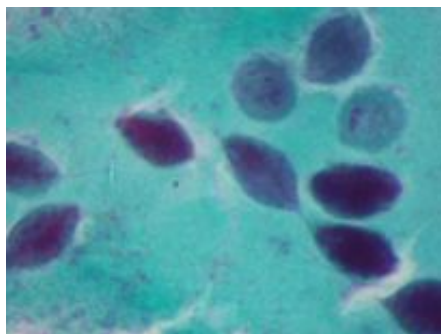
Trichomonas vaginalis 400x (Col. Giemsa)

3. Coltura

Per la coltura di *Trichomonas vaginalis* sono reperibili in commercio diversi terreni, sia in forma disidratata che già pronti in provetta.

1. Con un tampone sterile prelevare l'essudato vaginale o uretrale.
2. Mettere, immediatamente, il tampone in una provetta contenente il brodo di coltura, preriscaldato a 37°C.
3. Incubare a 37° C per 48 ore.
4. Prelevare una goccia di brodocoltura, allestire un preparato "a fresco" ed esaminare al microscopio per evidenziare la presenza di trofozoiti mobili.
5. In caso di negatività incubare fino a 4-5 giorni esaminando ogni 24 ore.

Se positiva la coltura si osserverà la presenza, al microscopio ottico, di forme del protozoo con nucleo grande posto anteriormente, munito di diversi flagelli, spesso è visibile la membrana ondulante.



Trichomonas vaginalis da coltura 400x (Col. di Giemsa)

Refertazione e registrazione dei risultati

Il risultato dell' esame parassitologico del campione biologico esaminato deve essere espresso con la massima chiarezza, ricorrendo il meno possibile a sigle ed abbreviazioni che possono lasciare dubbi interpretativi.

Sul referto deve essere riportato il nome e cognome del paziente, il materiale inviato, il giorno in cui è stato effettuato il prelievo, la metodica utilizzata per la ricerca e quindi il risultato della ricerca.

Se la ricerca è risultata positiva, per il riscontro del protozoo responsabile del processo patologico, si descrive la forma del protozoo evidenziato e si segnala la carica osservata nel campione biologico che va espressa come: Rari, Alcuni, Diversi o Numerosi.

Nelle note, può essere utile segnalare al clinico, la qualità del campione analizzato, se sono presenti numerose cellule e la qualità dell'infiltrato evidenziato, se linfociti, macrofagi, polinucleati e quant'altro può essere stato osservato.

I risultati devono essere controllati prima della refertazione e della consegna sia dall'esecutore dell'esame che dal responsabile dell'equipe.

L'archiviazione dei risultati ottenuti deve essere eseguita con adeguato sistema informatico; la registrazione informatizzata consente di ricavare statistiche sui parassiti identificati, sui materiali biologici esaminati, sui tempi di esecuzione degli esami, sui costi dei materiali utilizzati, ecc.

Bibliografia



- BERNIERI F., CROTTI D., GALLI D., RAGLIO A., *Manuale illustrato di diagnostica parassitologica*, (2001), Bio-Dev, Legnano;
- CANCENI G., *Parassitologia medica illustrata*, (1996), Ed. Lombardo, Roma;
- CANNING E.U., HOLLISTER W.S., “*Human infections with microsporidia*”, *Microbiology*, (1992), 3, pp. 35-42;
- COOK G.C., *Manson’s Tropical Diseases*, 20^a, (1996), Ed. WB Saunders Company Ltd, London.
- CRINGOLI G., *Manual HUMAN FLOTAC techniques*, (2009) Ed. G. Cringoli;
- DE CARNERI I., *Parassitologia generale e umana*, 13^a, (2004), Ed. Ambrosiana;
- DUBEY J.P., *Sarcocystis, Isospora e Cyclospora Topley & Wilson’s Microbiology and Microbiol Infections*, *Parassitology*, (1998), Ed. Arnold;
- ESPOSITO R., *Parassitologia Clinica e Medicina Tropicale*, (1985), Ed. Masson;
- FARTHING M.J.G., CEVALLOS A.M., KELLY P., *Intestinal Protozoa*, (2003), Ed. Manson’s Tropical Diseases;
- FRANK W., LIEDER J., *Atlante di Parassitologia*, (1987), Ed. Muzzio;
- FRENKEL J.K., “*Polmonite di Pneumocystis, una malattia immunodeficiency-dipendente (IDD): una descrizione storica critica.*” *Microbiologia* (1999), 46, pp.89-92, Ed. J. Euckaryot;
- FRENKEL J.K., “*Sp. di jiroveci N. di Pneumocystis dell’uomo: morfologia, fisiologia ed immunologia rispetto alla patologia.*”, *Monografia Nazionale*, (1976), 43, pp.13-30, Ed. Istituto del Cancer;
- FRENKEL J.K., *Toxoplasmosis*, *Protozoal Diseases*, (1999), Ed. Arnold;
- GARCIA L.S. et al., “*Fluorescence detection of Cryptosporidium oocysts in human fecal specimens by using monoclonal antibodies*”, *J. Clin. Microbiology* (1987), 25, pp.119-121;
- GILLES H.M., *Protozoal Diseases*, (1999), Ed. Arnold, London;
- GRADONI L., GRAMICCIA M., SCALONE A., *Visceral leishmaniasis treatment, Italy*, 9, (2003), *Emerg. Infect. Dis.*;
- HERWALD B.L., “*Leishmaniasis*”, *Lancet*, (1999), 354, pp.1191-1199;
- JENSEN J.B., *In vitro cultivation of protozoan parasites*, (1985), CRC Press, USA;
- KONEMAN E.W., *Testo atlante di Microbiologia diagnostica*, 2^a, (1984), Ed. Delfino;

LU J.J., BARTLETT M., SHAW M., QUEENER S., SMITH J., ORTIS-RIVERA M., et al., Typing of “*Pneumocystis carinii* strains that infect humans based on nucleotide sequence variations of internal transcribed spacers of rRNA genes.”, *J. Clin. Microbiol.*, (1994), 32, pp.2904-12;

LUMSDEN W.H.R., EVANS D.A., *Biology of the Kinetoplastida*, Academic Press, (1976), London;

MANDELL G., BENNETT J., DOLIN R., *Principles and practice of infectious diseases*, 6ª, (2005), Ed. Elsevier Churchill Livingstone;

NG. E., MARKELL E.K., FLEMING R.L., FRIED M., “*Demonstration of Isospora Belli by acid-fast stain in a patient with acquired immunodeficiency syndrome*”, *J. Clin. Microbiology* (1984), 20, pp. 384-386;

MOLYNEUX D.H., ASHFORD R.W., *The biology of Trypanosoma and Leishmania, parasites of man and domestic animals*, Taylor and Francis, (1983), London;

MORONI M., ESPOSITO R., DE LALLA F., *Malattie infettive*, 7ª, (2008), Ed. Masson;

ROMI R., BOCCOLINI D., MAJORI G., *Prevenzione e controllo della malaria d'importazione in Italia*, Rapporti Istituzionali, (2001), 01/29;

RONDANELLI E.G. et al., *AIDS Atlante di Clinica e Laboratorio*, (1989), Ed. Medico-Scientifiche;

RONDANELLI E.G., SCAGLIA M., *Atlas of human Protozoa*, (1992), Ed. Masson;

RONDANELLI E.G., SCAGLIA M., et al., *Appunti dal Corso di Formazione per Operatori Socio-Sanitari per la lotta all'infezione da HIV*, ISS, (1992) Grosseto;

SCAGLIA M., GATTI S., CHICHINOG. , BRUNO A., RONDANELLI E.G., “*Cryptosporidium: un patogeno emergente*” *Giornale di malattie infettive e Parassitarie* (1989), 12(41), pp. 1237-1243;

SCAGLIA M., GATTI S., RONDANELLI E.G., *Parassiti e Parassitosi Umane*, (2006), Selecta Medica;

TAYLOR A.E.R., BAKER J.R., *In vitro methods for parasite cultivation*, Academic Press, (1987), London;

WEBER R., BRYAN R.T., DAVID A. et coll., “*Human Microsporidial infections*”, *Clinical Microbiology Reviews*, (1994), vol 7, n° 4, pp.426-461;

WHO, *Manual of Basic Techniques for a Health Laboratory*, (1980), Geneva;

WHO Technical Report Series, *Control and surveillance of African trypanosomiasis*, (2000), 881;

Indice analitico

- A**
- Acanthamoeba* 86, 239-243
 amastigote (i) 168-169, 181-182, 24, 133, 169, 171, 181-182, 185, 219, 233-235, 238
 Amebe 28, 30, 35, 37, 47, 55, 59, 68, 71, 83, 86-88, 90, 92, 96-97, 100-101, 128, 219, 239-243
 amebe a vita libera 219, 239-243
 Anopheles 137
 apicomplexa 107, 135, 162, 220
 apicoplasto 221
 aspirato duodenale 125, 235
 aspirato linfonodale 219, 226-228, 234
 attrezzature 14-19
 attrezzature accessorie 14
 attrezzature accessorie necessarie 14
- B**
- Babesia* 107, 135, 162, 220
Babesia bovis 163
Babesia divergens 162-163, 166
Babesia microti 162-163, 166-167
Balantidium coli 12, 104-105
 Bartlett (classificazione di) 197, 214, 228, 252
 biopsia 7, 21-22, 178, 183, 185, 192, 201, 231, 233, 237-238
 biopsia corneale 239
 biopsia cutanea 7, 231-233
 biopsia duodenale 21, 235
 biopsia midollare 183, 185
 biopsia muscolare 237-238
 biopsia polmonare 192
 biopsia splenica 178
Blastocystis hominis 106
 bradizoiti (cistozoiti) 119, 221-225
 broncoaspirato (BAS) 9, 22, 32, 191, 242
 buffy-coat (esame del) 131, 174-175
- C**
- Calcofluor 125, 127
 calibrazione dell'oculare micrometrico 16
 cappa a flusso laminare 18
 carbolfucsina (colorazione con) 22, 51, 57, 109-111, 212
 cardiopatia chagastica 238
 centrifuga 18
 ceppi dermatropi 179
Chilomastix mesnili 13, 79
 chromotrope 2R 40
 ciclo biologico 11, 24-25, 72-73, 87, 104, 107-109, 115, 118, 121-122, 134, 137-140, 163, 168, 171, 173, 182, 197, 200, 208, 219-221, 239-240, 244
 ciclo sessuato (sporogonia) 137
 ciclo asessuato (schizogonia) 137
 Ciliofori 104
 cinetoplasto 169, 171, 175, 181-182, 185, 187, 233-236
 Coccidi 22, 39, 57-59, 68, 107, 109-110, 135, 221
 colorazione di May-Grünwald-Giemsa 45
 colorazione di Giemsa 45-46
 colorazione di Gram-Weigert 204
 colorazione di Ziehl-Neelsen mod. 39
 colorazione tricromica 37, 40, 42, 92-93, 101, 125-126, 243
 colorazione tricromica di Weber 40, 125-126
 coltura delle amebe 96
 coltura delle amebe a vita libera 241, 243
 coltura delle leishmanie 233-236
 coltura di *Trichomonas* 247
 commensalismo 10
 conoide 139, 221
 controllo di qualità esterno (VEQ) 24-26
 controllo di qualità interno 14
 copros 51-71
 cornea (infezioni alla) 9, 123-124, 217, 219, 239-240, 242
 corpi cromatoidi 87, 89, 98-99
 corpi parabasali 74
 cristalli di Charcot-Leyden 128
Cryptosporidium spp. 13, 107-108, 110, 196-197, 211-213
 cute 9, 217, 219, 231
Cyclospora 22, 37, 107, 117
Cyclospora cayetanensis 107, 117

- D**
 DDT 136
 Diarrea del viaggiatore 73, 117
Dientamoeba fragilis 83
 disco adesivo 74
 distribuzione geografica della *L. viscerale* 136
 distribuzione geografica dei plasmodi 170
 distribuzione geografica di Tripanosomi 179
- E**
E. coli 97-99
E. dispar 89
E. hartmanni 98
E. histolytica 86-97, 100, 217
 ectocommensalismo 10
 ectoparassiti 11
 ELISA (enzime-linked immunosorbent assay) 9, 19, 23, 33, 35-36, 78, 88, 94-95, 225
 emoagglutinazione (IHA) 23, 35
 emoflagellati 7, 168-169, 188
 encefalo (infezione dell') 217
Encephalitozoon 120, 122-123, 125, 217
 endocommensalismo 10
Endolimax nana 28, 103
 endoparassiti 11
 endospora 120
Enterocytozoon bieneusi 12, 122-123, 125
Enteromonas hominis 81
 Enterotest 22, 77, 114
 epimastigote 168-169
 esame del copros 14, 52, 54
 esame dopo concentrazione 59, 90, 92, 105
 esame macroscopico 23, 51, 54
 esame microscopico 23, 34, 51, 54, 74, 79, 82, 85, 149, 167, 176, 236, 238, 241-243, 245
 esame microscopico diretto 23, 54, 167, 242
 espettorato 7, 9, 19-22, 26, 32, 47, 88, 191-195, 201, 205, 208, 211-213
 espettorato indotto 9, 191-195, 201, 211
 estrusione (apparato di) 120-121
 essudati (esame del) 217, 244-247
 Evans modified Tobie medium (EMTM) 30, 186, 233, 236
- F**
 fissazione (tecniche di) 40, 54, 67, 111, 212, 245
 flagellati intestinali 72, 168
 flebotomi 178-179, 231
 flotac 14, 51, 53, 59, 64-71, 251
 flottazione 51, 59, 62-68, 70-71
 fluorocromi 34
 foresi 10
 formalina 53
 frigotermostato 19
- G**
 gametociti 133, 140-141, 146, 148, 154, 160, 164
 gentamicina 186, 236
Giardia duodenalis 13, 47, 72-73
 Giemsa (colorazione di) 45-46
 Glossina (mosca tsé tsé) 173
 goccia spessa (esame della) 131-132, 143-145, 161, 164-165, 174-175
 granuli di Jones 148, 158
 granuli di Maurer 148, 154
 granuli di pigmento (emoziona) 146, 148, 155, 160
 granuli di Schuffner 148, 156
 granuli di Ziemann 148, 160
- I-J-K**
 ICT 23, 34, 74, 78, 113-114, 144, 150
 Immunoblotting (western blotting) 36
 Immunocromatografia (test rapido) 78, 150
 immunofluorescenza diretta (IFD) 23, 34, 57, 74, 109, 112, 213
 immunofluorescenza indiretta (IFI) 34-35, 94, 144, 149, 152-153, 167, 176-177, 183-184, 201, 206-209, 228-229
 Infezione multipla 146

Iodamoeba butschlii 102
ipnozoiti 139, 154, 156, 158
isoenzimi 178, 187
isolamento 30, 241, 243
Isopora belli 13, 68, 107, 115-116, 251
Kinyoun 39, 110

L

Leishmania 7, 19, 21-22, 24-25, 30-32, 35, 46, 72, 133-134, 168-169, 171, 176, 178-179, 182-185, 187, 217, 219, 231-236, 244, 252
Leishmania infantum 183-185, 187, 219, 236
Leishmania tropica 179, 231
leishmaniosi 8, 13, 178-180, 183, 187-188, 217, 231-232, 235
leishmaniosi cutanea (LC) 217, 231-233
leishmaniosi viscerale 13, 178-180, 188, 231
linfonodi 9, 134, 179, 182, 217, 219, 227, 231-232
liquido di lavaggio broncoalveolare (BAL) 9, 32, 125, 191, 194-195, 208, 211, 226, 230
liquor (liquido cefalo rachidiano) 9, 21, 32, 125, 127, 174, 176-177, 218-219, 226-228, 230, 239, 241-243
Lugol (soluzione di) 51, 54-56, 61-63, 76, 91, 100, 102, 204

M

Malaria 8, 11, 132-136, 140-142, 144, 149-151, 153-154, 156, 158, 160, 165, 188, 252
malattia del sonno 170, 173-174
meningoencefalite amebica primaria 240
meronti 122
merozoiti 107, 118-119, 132, 139-141, 146, 148, 154, 156, 158, 160, 164-166, 222
microscopio 14-17
Microsporidi 120-127
MIF 53
miosite 124, 237
mosche tsé tsé (v. Glossina)

muscoli (infezione ai) 217, 219, 237-238
mutualismo 10

N

Naegleria 86, 217, 239-241
Naegleria fowleri 240
Nosema spp. 123-125

O

oculare micrometrico 16
oocisti 39-40, 47, 51, 57, 64, 107-110, 112, 114-119, 196-197, 211-213, 221-222, 224
opportunismo 191
ospite definitivo 11, 118-119, 137, 182, 221
ospite intermedio 11, 118, 137, 221-222

P

Parassitemia 144-145, 149, 151-152, 160, 165-166, 173, 188
parassiti accidentali 11
parassiti antichi 11
parassiti facoltativi 11-12
parassiti monoxeni 107
parassiti obbligati 11
parassiti recenti 11
parassitismo 3, 5, 10-11
PCR 23, 31-32, 151, 166, 226, 230
Phlebotomus perniciosus 179, 182, 231
Plasmodium 21-22, 107, 135, 162, 220
Plasmodium falciparum 145, 147, 154, 165
Plasmodium malariae 160
Plasmodium ovale 158
Plasmodium vivax 141, 147, 156
Pleistophora spp. 123-124
Pneumocystis jiroveci 192, 197, 198-207
polmoniti 125, 191, 198, 208, 225
promastigoti 169, 181-184, 187, 233, 236
protozoo (i) 12-13
PVA (Alcool polivinilico-cloruro mercurico) 25, 37, 42-43, 53, 59, 92

- R**
 Raccolta dei campioni di copros 113
 Real Time PCR 23, 31-32, 151, 166, 226, 230
Retortamonas intestinalis 82
 rizonema 181
 Robinson (terreno di) 30, 90
- S**
 SAF (Sodio acetato-acido acetico-formalina) 25, 42-43, 53, 59-60, 78, 113
 Sangue (esame del) 131-134
Sarcocystis 22, 107, 118-119, 135, 162, 220, 251
Schaudinn 43
 schizodemi 187
 schizonti 107, 133, 139-140, 146, 149-150, 158, 160, 164, 222
 scraping corneale 125, 127, 242-243
 sedimentazione 35, 51, 59-61
Septata intestinalis 123-125
 sistema reticolo endoteliale 131
 solfatazione (reagente di) 202
 soluzione di Dobell 54-57, 91, 100, 102
 soluzione tamponata di blu di metilene 56-57, 90-91
 soluzioni flottanti 59, 62, 67-69, 71
 Sputasol 195, 226
 striscio di sangue (esame del) 143, 155, 165
 125, 134-135, 178, 217-219, 223, 227, 235, 239
 tessuti abbastanza solidi 218
 tessuti liquidi 218
 tessuti poco solidi 218
 test immunocromatografico(i) (ICT) 23, 34, 74, 78, 113-114, 144, 150
 test immunoenzimatici (EIA) 35-36
 tetradi 165
Theileria spp. 162
Toxoplasma gondii 217, 219-230
 toxoplasmosi acquisita 224
 toxoplasmosi congenita 225
 toxoplasmosi di riattivazione 225
 triatomine 170
 tripomastigoti 168-169, 171, 173, 175
 trofozoite (i) 87-93, 98-105, 107, 109, 128, 133, 139-141, 154-161
Trychomonas hominis 84-85
Trychomonas vaginalis 22, 244-246
Trypanosoma brucei 169-170, 172-173, 175-176
Trypanosoma brucei gambiense 169, 172, 176
Trypanosoma brucei rhodesiense 169, 172-173
Trypanosoma cruzi 169-171, 175-176, 198, 237-238
Trypanosoma rangeli 175
 tubulo polare 120-121, 123-124, 237
- T**
 tabella prestazioni 22
 tabella richieste esami parassitologici 21
 tachizoite (i) 119, 196-197, 208-210, 219, 222-225, 228-229
 tampone uretrale 245
 tampone vaginale 21, 245
 tecniche di biologia molecolare (v. PCR) 23, 31-32
 tecniche di colorazione 9
 tecniche di concentrazione 59
 terminologia 10, 140
 tessuti 7, 9, 35, 86-88, 105, 118, 122-123,
- U**
 ulcere "a fiasco" 88
 urine (esame delle) 20-22, 26, 52, 122, 125, 131
- V-W**
 vacuolo parassitoforo 109, 122-125, 164, 221, 223, 237
 vari tessuti 245
 VEQ 24-26
 Weber (colorazione di) 22, 126

X-Y-Z

xenodiagnosi 238

zecche ixodidi 162

ZiehI-Neelsen mod. 22, 37, 39, 109-110,
116-117, 119, 212

zimodemi 187, 235

*Finito di stampare nel mese di aprile 2010
presso lo Stabilimento Lito-Tipografico Vigilante S.r.l. di Napoli.*

