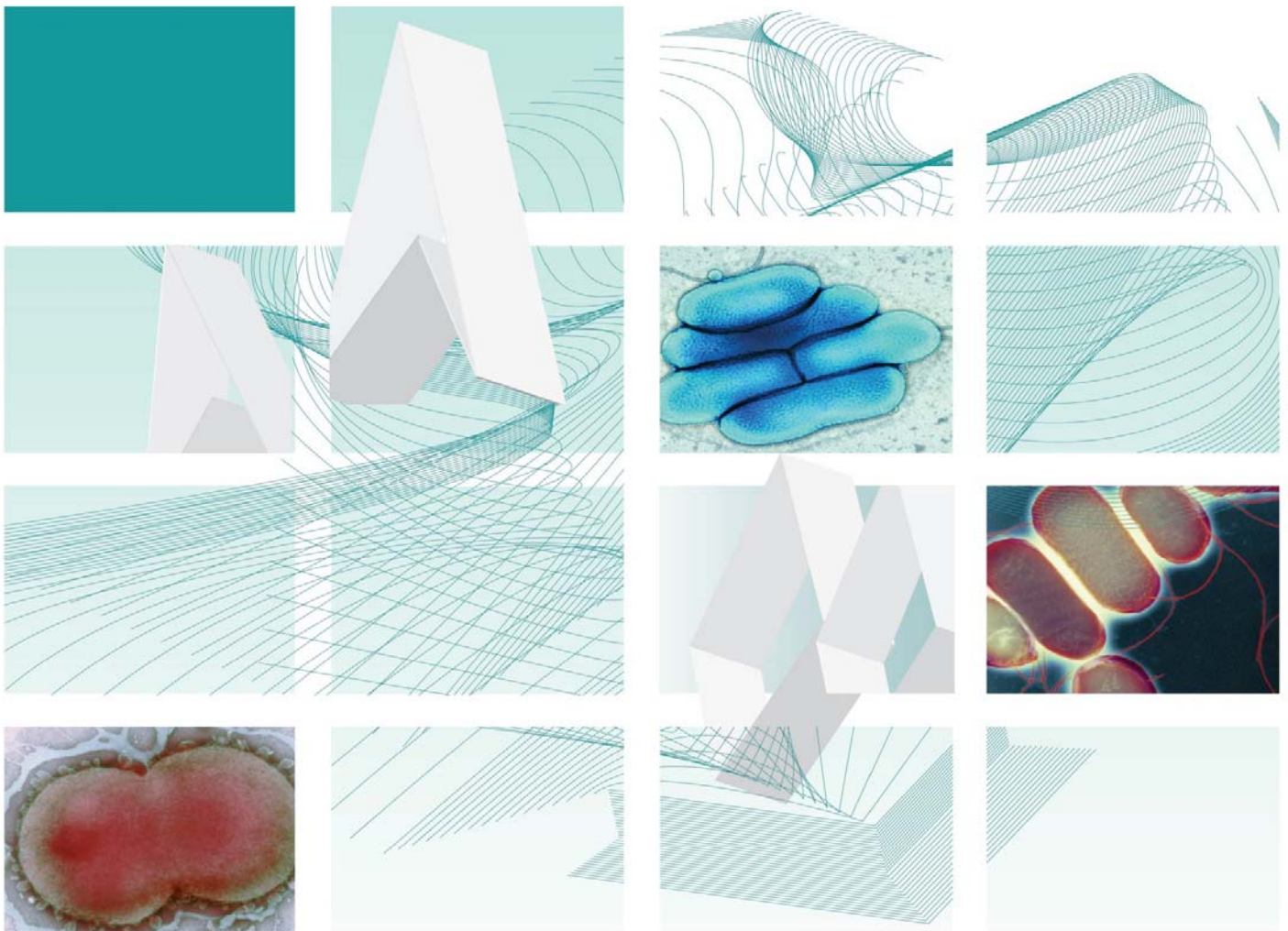




# Ricerche Microbiologiche Standard del Regno Unito

Procedure di Colorazione

# INDEVISIONE



## Ringraziamenti

Le Procedure Standard del Regno Unito per le Ricerche Microbiologiche (SMI - Standards for Microbiology Investigations) sono sviluppate sotto l'egida della Public Health England (PHE) in collaborazione con il Servizio Sanitario Nazionale (NHS - National Health Service), la Sanità Pubblica del Galles e con le organizzazioni professionali i cui loghi sono di seguito elencati sul sito web <http://www.hpa.org.uk/SMI/Partnerships>. Le SMI sono sviluppate, revisionate e controllate da diversi gruppi di lavoro che sono supervisionati da un comitato direttivo (consultare <http://www.hpa.org.uk/SMI/WorkingGroups>).

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

Per ulteriori informazioni contattare:

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

E-mail: [standards@phe.gov.uk](mailto:standards@phe.gov.uk)

Website: <http://www.hpa.org.uk/SMI>

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



Institute of  
Biomedical  
Science

**BIAMA**  
British Infection Association



Scottish Microbiology Forum



# Contenuti

RINGRAZIAMENTI.....	2
CONTENUTI.....	3
TABELLA MODIFICHE.....	5
RICERCHE MICROBIOLOGICHE; PROCEDURE STANDARD DEL REGNO UNITO: SITUAZIONE.....	6
SCOPO DEL DOCUMENTO .....	9
INTRODUZIONE .....	9
INFORMAZIONE TECNICA/LIMITAZIONI.....	9
1 COLORAZIONE ARANCIO DI ACRIDINA (PER <i>TRICHOMONAS VAGINALIS</i> ).....	10
2 COLORAZIONE AURAMINA-FENOLO - 1 (PER BACILLI ACIDO RESISTENTI).....	11
3 COLORAZIONE AURAMINA-FENOLO - 2 (PER SPECIE <i>CRYPTOSPORIDIUM</i> )' .....	12
4 COLORAZIONE CALCOFLUOR (PER MICROSPORIDI).....	13
5 COLORAZIONE DI FIELD (PER SPECIE <i>PLASMODIUM</i> ).....	14
6 COLORAZIONE GIEMSA (PER <i>DIENTAMOEBIA FRAGILIS</i> , <i>BLASTOCYSTIS</i> ).....	16
7 COLORAZIONE GIEMSA (PER SPECIE <i>PLASMODIUM</i> ) .....	17
8 COLORAZIONE GRAM.....	19
9 MODIFICAZIONE DI SANDIFORD DELLA COLORAZIONE GRAM.....	20
10 COLORAZIONE LUGOL (PER PARASSITI).....	21
11 COLORAZIONE TRICROMICA MODIFICATA (PER MICROSPORIDI) .....	22
12 COLORAZIONE ZIEHL-NEELSEN MODIFICATA A FREDDO (PER SPECIE ..... <i>CRYPTOSPORIDIUM</i> ) .....	23
13 PREPARAZIONE CON NIGROSINA (INCHIOSTRO DI CHINA) .....	24
14 COLORAZIONE RAPIDA DI FIELD (PER <i>DIENTAMOEBIA FRAGILIS</i> , ..... <i>BLASTOCYSTIS HOMINIS</i> E <i>PNEUMOCYSTIS JIROVECI</i> ).....	25
15 COLORAZIONE PER SPORE.....	26
16 COLORAZIONE DI VINCENT (PER BATTERI ORALI).....	27
17 COLORAZIONE ZIEHL NEELSEN (PER BACILLI ACIDO RESISTENTI).....	28
BIBLIOGRAFIA .....	30



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

Per ulteriori informazioni sul nostro accreditamento consultare: : [www.nice.org.uk/accreditation](http://www.nice.org.uk/accreditation)

**IN REVISIONE**

## Tabella delle Modifiche

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

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

Modifica No/Data.	2/17.03.14
Emissione eliminata. no	1.1
Emissione inserita no.	1.2
<b>Sezione(i) interessate.</b>	<b>Modifica.</b>
Intero documento	<p>Il documento è stato inserito in un nuovo formato che evidenzia il passaggio della Health Protection Agency alla Public Health England.</p> <p>Prima pagina ridisegnata.</p> <p>Rinominata la pagina di “Stato come Scopo” e Obiettivo ed aggiornata in modo appropriato.</p> <p>I loghi delle organizzazioni professionali sono stati revisionati ed aggiornati.</p> <p>Revisionati e aggiornati Standard di sicurezza e referenti delle denunce</p> <p>Il contenuto scientifico rimane invariato.</p>
Bibliografia	Bibliografia in parte aggiornata.

Modifica No/Data.	1/21.10.11
Emissione eliminata. no	1
Emissione inserita no.	1.1
<b>Sezione(i) interessate.</b>	<b>Modifica.</b>
Intero documento	Documento presentato in nuovo formato
Bibliografia	Bibliografia In parte aggiornata.

## **Ricerche Microbiologiche Standard del RU<sup>#</sup>: Situazione**

### **Utilizzatori delle SMI**

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

### **Informazioni di base per le SMI**

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

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

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

### **Coinvolgimento delle Organizzazioni Professionali**

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

L'elenco delle organizzazioni partecipanti può essere trovato su sito

<http://www.hpa.org.uk/SMI/Partnershipshttp>. L'inclusione del logo di un'organizzazione in una SMI implica il sostegno degli obiettivi e del processo di preparazione del documento. I rappresentanti delle organizzazioni professionali fanno parte del comitato direttivo e dei gruppi di lavoro che sviluppano le SMI, anche se le opinioni dei partecipanti non sono necessariamente quelle espresse da tutta l'organizzazione che essi rappresentano.

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

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

## Assicurazione di Qualità

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

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

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

## Coinvolgimento del Paziente e della Comunità

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

## Informazione della Gestione e dei Dati Sensibili

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

Lo sviluppo di metodi SMI è assoggetto agli obiettivi PHE di Uguaglianza [http://www.hpa.org.uk/webc/HPAwebFile/HPAweb\\_C/13171334703](http://www.hpa.org.uk/webc/HPAwebFile/HPAweb_C/13171334703). I Gruppi di Lavoro SMI sono impegnati a raggiungere gli obiettivi di parità di consultazione efficace con gli appartenenti al pubblico, i partner, le parti interessate ed i gruppi specialistici coinvolti.

## Dichiarazione Legale

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

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

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

## **Citazione Suggestita per questo Documento**

Public Health England. (2014). Staining Procedures. UK Standards for Microbiology Investigations. TP 39 Emissione 1.2. <http://www.hpa.org.uk/SMI/pdf>.

**IN REVISIONE**



## Scopo del Documento

---

Questa procedura comprende i metodi per le procedure di colorazione comunemente utilizzate nei Laboratori di microbiologia clinica per l'identificazione degli agenti patogeni.

## Introduzione

---

### Assicurazione della Qualità

Molte delle colorazioni che sono descritte in quest Standard for Microbiology Investigation (SMI) sono commercialmente disponibili. Gli utenti devono assicurarsi che le colorazioni commerciali pronte all'uso siano state sottoposte a severi controlli di qualità. Quando si utilizza colorazioni commerciali è importante predisporre la registrazione del numero di lotto dei ceppi di controllo e le date in cui sono stati utilizzati

I ceppi preparati o diluiti in laboratorio devono essere controllati per verificare che non vi sia contaminazione da micromicroorganismi ambientali.

Ogni volta che si esegue una procedura di colorazione, si devono utilizzare vetrini di controllo positivi e negativi, fatta eccezione per la colorazione di Gram nella quale i controlli positivi possono essere stati eseguiti in numero sufficiente, a meno che non utilizzo u prodotto appartenente a un nuovo lotto.. Se i vetrini di controllo non forniscono risultati soddisfacenti, la procedura di colorazione non è accettabile. I vetrini positivi e negativi possono essere preparati utilizzando ceppi noti o di riferimento.

## Informazioni Tecniche/Limitazioni

---

La durata di ogni stadio può variare a seconda della concentrazione e la formulazione della soluzione colorante e di altri reagenti. Quando possibile, seguire le indicazioni del produttore

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

## 1.1 Introduzione

Questa tecnica può essere utilizzata per la ricerca di *Trichomonas vaginalis* in strisci vaginali.

## 1.2 Considerazioni sulla sicurezza<sup>1-11</sup>

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

## 1.3 Assicurazione della Qualità<sup>12</sup>

Preparare uno striscio e asciugare all'aria (i vetrini devono essere processati entro 24 ore).

Colorare i vetrini con la soluzione di arancio di acridina per 5-10 s.

Allontanare il colorante con acqua, decolorare lo striscio con soluzione salina alcolica per 5-10 s.

Sciacquare lo striscio con soluzione fisiologica e porre il vetrino su un supporto per asciugarlo.

Aggiungere una goccia di fisiologica o acqua distillata e coprire lo striscio con coprioggetto di vetro.

Esaminare lo striscio al microscopio a fluorescenza con filtro di eccitazione BG 12 e filtri di sbarramento No. 44 e No 53.

## 1.4 Interpretazione

*Trichomonas vaginalis* di solito ha forma di pera, con dimensioni medie di circa 10 x 7µm<sup>13</sup>.

### Risultato positivo

Trofozoiti di *Trichomonas vaginalis* rosso mattone con nucleo verde di forma rotonda o a banana.

### Risultato negativo

I lieviti presentano colorazione rossa con nucleo verde brillante.

Le cellule epiteliali appaiono con fluorescenza verde chiaro con nucleo verde brillante e i nuclei dei leucociti assumono fluorescenza verde brillante.

## 1.5 Microrganismi per Controllo Qualità

### Controllo Positivo

*Trichomonas vaginalis*.

### Controllo Negativo

Può essere utilizzato come controllo uno striscio di provata negatività

## 1.6 Informazione Tecnica<sup>14</sup>

Quando si ricerca *Trichomonas vaginalis*, la colorazione con arancio acridina ha dimostrato di essere più sensibile dell'accertamento con vetrino umido<sup>15</sup>.

## 2 Colorazione Auramina-fenolo – 1 (per Bacilli Acido Resistenti)

### 2.1 Introduzione

Questa tecnica di colorazione è usata per dimostrare la presenza di bacilli acido resistenti (specie *Mycobacterium*). Questi microrganismi hanno involucri che li rendono difficili da decolorare. La colorazione fluorescente usata in questo metodo è più sensibile rispetto al metodo di Ziehl-Neelsen.

### 2.2 Considerazioni sulla sicurezza<sup>1-11</sup>

Tutte le specie *Mycobacterium* sospette devono essere processate in cabine di classe 1 con scarico protetto in ambiente di Contenimento di Livello 3.

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

Calzare guanti monouso.

Non sono raccomandate punte di diamante, sono raccomandati vetrini smerigliati, contrassegnati con una matita.

Il materiale strisciato da colorare deve essere fissato ponendo i vetrini su una piastra elettrica riscaldata prima della colorazione (65-75° C). Questa procedura deve essere eseguita in cabina di Classe 1 con protezione dello scarico fino a quando il materiale strisciato è essiccato e fissato al vetrino. Questi devono poi essere collocati su un porta vetrini o su supporto idoneo.

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

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

### 2.3 Metodo<sup>16</sup>

- Preparare uno striscio e scaldarlo per fissare.
- Coprire il vetrino con auramina-fenolo (1:10 v / v) e lasciar per 10 minuti.
- Lavare delicatamente con acqua di rubinetto (verificare che sia priva di batteri alcool acido resistenti o utilizzare acqua filtrata).
- Decolorare con alcool-acido 1% per 3-5 min.
- Lavare delicatamente con acqua di rubinetto come sopra.
- Ripetere il passaggio in alcool-acido fino a quando non diffonde altro colore dallo striscio.
- Colorazione di contrasto con permanganato di potassio 0,1% o rosso tiazina per 15 s (questo produce uno sfondo scuro per i AAFB fluorescenti facilitando la loro osservazione). Il KMnO<sub>4</sub> colora tutte le cellule epiteliali ecc. rendendo più difficile la ricerca degli AAFB.
- Lavare delicatamente con acqua di rubinetto come in precedenza e lasciare asciugare all'aria. Non asciugare.
- Esaminare i vetrini microscopio a epi-fluorescenza con luce ultravioletti e ingrandimento 25x o 40x (l'uso di un ingrandimento 40x con obiettivo senza copri-oggetti farà evitare la necessità di applicare un coprioggetti).

**Nota:** Seguire la procedura del produttore se si utilizzano confezioni commerciali..

## 2.4 Interpretazione

### Risultato positivo

I bacilli acido resistenti variano 0,5-10 micron in lunghezza e colorazione giallo-verde con fondo scuro<sup>16</sup>.

### Risultato negativo

Nessuna fluorescenza osservato.

## 2.5 Microrganismi per Controllo Qualità

### Controllo positivo

Specie *Mycobacterium*.

### Controllo Negativo

Può essere utilizzato come controllo uno striscio di provata negatività

## 2.6 Informazione Tecnica

E' importante garantire che l'acqua di risciacquo e l'acqua che è utilizzata per preparare la colorazione non sia contaminata da batteri ambientali alcol acido resistenti. Questi si trovano di frequente nell'acqua di rubinetto e con l'uso di tubi in gomma. Se necessario, utilizzare acqua distillata.

# 3 Colorazione Auramina-fenolo – 2 (per specie *Cryptosporidium*)

## 3.1 Introduzione

Questa tecnica di colorazione fluorescente è usata per la ricerca delle oocisti di specie *Cryptosporidium* nelle feci.

## 3.2 Considerazioni sulla sicurezza<sup>1-11</sup>

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

## 3.3 Metodo<sup>17</sup>

(

- Preparare uno striscio e asciugarlo all'aria (gli strisci devono essere di spessore intermedio).
- Fissare in metanolo per 3 min.
- Coprire il vetrino con soluzione auramina-fenolo\* e lasciar riposare per 10 minuti.
- Sciacquare con acqua di rubinetto.
- Decolorare il vetrino con metanolo acido 3% e lasciar riposare per 5 minuti.
- Sciacquare con acqua di rubinetto.
- Colorazione di contrasto del vetrino con permanganato di potassio 0,1%, lasciare agire per 30 s.
- Sciacquare con acqua corrente, scolare e asciugare all'aria. Non assorbire, perché alcuni materiali assorbenti possono essere fluorescenti.
- Esaminare con microscopio a fluorescenza a luce incidente con obiettivi 20x e oculari 10x. I

filtri devono essere blu o FITC con lunghezza d'onda di eccitazione (690 nm) e con emissione (510 nm). Esaminare come minimo di 50 campi.

\*Auramina 0,3 g, 3.0 g di fenolo, acqua distillata/deionizzata 97 ml. Sciogliere il fenolo in acqua con calore moderato. Aggiungere gradualmente auramina e agitare vigorosamente fino a completa solubilizzazione. Filtrare e conservare la bottiglia chiusa al buio<sup>18</sup>.

### 3.4 Interpretazione

#### Risultato positivo

Le oocisti di *Cryptosporidium* (4-6 micron di diametro) sono fluorescenti verde-giallo e di forma ad anello o di ciambella (a seconda delle lunghezze d'onda del filtro), su sfondo scuro. Le presunte oocisti possono essere misurate aumentando l'intensità della luce e misurando le oocisti con un oculare con reticolo calibrato.

#### Risultato negativo

Nessuna fluorescenza osservata.

### 3.5 Microrganismi per Controllo Qualità

#### Controllo positivo

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

#### Controllo Negativo

Può essere utilizzato come controllo uno striscio di provata negatività

### 3.6 Informazione Tecnica

La conferma dei risultati deve essere eseguita su nuovo striscio usando la colorazione di Ziehl-Neelsen modificata.

## 4 Colorazione Calcofluor (per Microsporidi)

### 4.1 Introduzione

Il colorante calcofluor si lega allo strato chitinoso della parete delle endospore dei microsporidi a cui conferisce un aspetto brillante blu-bianco. Questa tecnica di colorazione è utilizzata per la dimostrazione dei microsporidi nelle feci.

### 4.2 Considerazioni sulla sicurezza<sup>1-11</sup>

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

### 4.3 Metodo<sup>19</sup>

- Preparare uno striscio molto sottile e asciugare all'aria.
- Fissare lo striscio in metanolo per 5 minuti.
- Colorare lo striscio con 1-2 gocce di soluzione di Calcofluor (0,5% p / v) e lasciar riposare per 2-3 minuti.
- Sciacquare con acqua corrente a lento scorrimento.
- Colorazione di contrasto con la soluzione di blu Evans (0,1%) per 1 min.

- Sciacquare con acqua a lento scorrimento.
- Asciugare all'aria.
- Deporre 1 o 2 gocce di liquido di montaggio sul vetrino e montare con un coprioggetti.
- Esaminare al microscopio a fluorescenza (395-415 nm).

#### 4.4 Interpretazione

##### Risultato positivo

Le spore di microsporidi sono tipicamente ovoidali o piriformi con fluorescenza brillante blu-bianco. Le dimensioni delle spore variano secondo le diverse specie da 1 a 20  $\mu\text{m}$ <sup>20</sup>.

##### Risultato negativo

Nessuna fluorescenza osservata

#### 4.5 Microrganismi per Controllo Qualità

##### Controllo Positivo

Specie Microsporidi.

##### Controllo Negativo

Può essere utilizzato come controllo uno striscio di provata negatività

#### 4.6 Informazione Tecnica

Le spore fungine possono contenere chitina, ed è richiesta esperienza per differenziare le spore di microsporidi da quelli di funghi.

## 5 Colorazione di Field (per specie *Plasmodium*)

### 5.1 Introduzione

Questa tecnica è utilizzata per la dimostrazione delle specie di *Plasmodium* nel sangue in strisci sottili e spessi<sup>21</sup>.

### 5.2 Considerazioni sulla sicurezza<sup>1-11</sup>

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

### 5.3 Assicurazione della Qualità<sup>22</sup>

#### 5.3.1 Colorazione di Field per strisci sottili

- Preparare uno striscio sottile.
- lasciare asciugare lo striscio.
- Fissare in metanolo per 1 min.
- Coprire il vetrino con 1 ml di B colorante diluito di Field B (1 in 4 in acqua pH tamponato 7.2).
- Aggiungere immediatamente un volume uguale di colorante A di Field e mescolare.
- Lasciare colorare per 1 min.
- Lavare il vetrino con acqua pulita, scolare e asciugare.

### 5.3.2 Colorazione di Field per strisci spessi

Attenzione: gli strisci di sangue spessi non sono fissati e i coloranti non uccidono parassiti, virus o altri patogeni che possono essere presenti nel sangue.

- Mantenere il vetrino con lo striscio essiccato spesso rivolto verso il basso.
- Immergere il vetrino nel colorante A di Field per 3 s.
- Scaricare il colorante in eccesso toccando un angolo del vetrino contro un lato del contenitore.
- Lavare delicatamente per circa 3 s in acqua pulita e agitare delicatamente.
- Scaricare l'acqua in eccesso.
- Immergere il vetrino nel colorante di Field B per 3 s.
- Scaricare l'eccesso del colorante.
- Lavare delicatamente in acqua pulita.
- Pulire il retro del vetrino e metterlo in posizione verticale su un supporto di drenaggio per asciugarlo all'aria.

**Nota:** Se dopo la colorazione, lo striscio appare di colore giallo-marrone (segno che è stato utilizzato); troppo blu o troppo rosa, non esaminare il preparato. Colorare di nuovo immergendo il vetrino nel colorante A di Field 1 s, eseguire poi un lavaggio moderato in acqua pulita, immergere nel colorante B di Field per 1 s, e lavare infine delicatamente con acqua pulita.

## 5.4 Interpretazione

---

### 5.4.1 Colorazione di Field per strisci sottili

#### Risultato positivo

Cromatina di parassita	Rosso scuro
Citoplasma di parassita	Blu
Punti di Schüffner /puntini di James Rossi	
Punti di Maurer (fenditure)	Rosso malva
Pigmento malaria nei globuli bianchi	Marrone-nero

#### Risultato negativo

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

### 5.4.2 Colorazione di Field per strisci spessi

#### Risultato positivo

Cromatina di parassita	Rosso scuro
Citoplasma di parassita	Blu-malva

Puntini di Schüffner	Rosso pallido
<b>Risultato negativo</b>	
Parassiti <i>Plasmodium vivax</i> e <i>Plasmodium ovale</i>	
Pigmento Malaria	Giallo marrone o giallo nero
Nuclei dei piccoli linfociti	Viola scuro
Nuclei dei neutrofili	Viola scuro
Granuli di eosinofili	Rossi
Citoplasma delle cellule mononucleate	Blu-grigio
Reticolo dei reticolociti	Blu-grigio

## 5.5 Microrganismi per Controllo Qualità

### Controllo positivo

Specie *Plasmodium*.

### Controllo Negativo

Può essere utilizzato come controllo uno striscio di provata negatività.

## 5.6 Informazione e Tecnica

Si tratta di un metodo utile d'identificazione presuntiva rapida di specie di parassiti della malaria. Questo metodo mostra una colorazione adeguata di tutte le fasi, compresa la punteggiatura. Tuttavia, la colorazione con Giemsa è considerata ancora il metodo di scelta per la definitiva differenziazione della specie.

Con preparati spessi, deve essere osservata la parte terminale, dove lo striscio si esaurisce. I bordi del preparato sono migliori rispetto al centro dove lo striscio potrebbe essere troppo spesso o incrinato.

# 6 Colorazione di Giemsa (per *Dientamoeba fragilis*, *blastocystis*)

## 6.1 Introduzione

La colorazione di Giemsa è utilizzata per dimostrare la presenza di *Dientamoeba fragilis* e *Blastocystis hominis* nelle feci e della *Pneumocystis jirovecii* nel lavaggio broncoalveolare.

## 6.2 Considerazioni sulla sicurezza<sup>1-11</sup>

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

## 6.3 Metodo

- Preparare una diluizione 1 a 10 di del colorante di Giemsa in acqua tamponata. Questa dovrebbe essere di preparazione recente.
- Preparare uno striscio fecale e lasciare asciugare all'aria.
- Fissare in metanolo per 60 s.
- Versare il metanolo.



- Ricoprire il vetrino con soluzione colorante diluita di Giemsa e lasciare agire per 20-25 minuti.
- Lavare il vetrino con acqua di rubinetto per allontanare il colorante e prevenire la sua precipitazione sullo striscio.
- Lasciare asciugare all'aria.

## 6.4 Interpretazione

### Risultato positivo

Nuclei del parassita e cromatina colorati in rosso.

### Risultato negativo

Nuclei dei leucociti colorazione viola, colorazione citoplasma blu-grigio, batteri e lieviti colorazione blu scuro.

**Nota:** La colorazione di Giemsa non colora le pareti cistiche di *Pneumocystis*, non consentendo l'osservazione delle forme trofiche.

## 6.5 Microrganismi per Controllo Qualità

### Controllo positivo

*Dientamoeba fragilis* e *Blastocystis hominis*.

### Controllo Negativo<sup>4</sup>

Può essere utilizzato come controllo uno striscio di provata negatività

## 6.6 Informazione Tecnica

Non è possibile osservare i nuclei tipicamente frammentati perché con questo metodo il materiale nucleare contenuto spesso tende a coagulare<sup>23</sup>.

La colorazione per *Pneumocystis jirovecii* è più frequentemente eseguita con immunofluorescenza e anticorpi specifici, o con impregnazione argentea. Sono sempre più utilizzati metodi alternativi di diagnosi, come la PCR.

# 7 Colorazione di Giemsa (per specie *Plasmodium*)

## 7.1 Introduzione<sup>21</sup>

La colorazione di Giemsa è utilizzata per rilevare la presenza di specie *Plasmodium* in strisci di sangue sottili e spessi. Lo striscio spesso è circa 30 volte più sensibile di quello sottile, rilevando circa 20 parassiti per microlitro. Gli strisci spessi sono dunque il metodo più idoneo per una rapida individuazione del parassita. Lo striscio sottile è necessario per confermare le specie di *Plasmodium*, quando questa non è chiarita con lo striscio di spessore consistente. Gli strisci sottili sono anche utili per valutare se un paziente affetto da malaria dovuta al *Plasmodium falciparum* risponde al trattamento in aree in cui si sospetta resistenza ai farmaci.

## 7.2 Considerazioni sulla sicurezza<sup>1-11</sup>

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

## 7.3 Metodo<sup>21,24</sup>

### Strisci sottili di sangue o midollo

- Fissare in metanolo per 5 minuti.
- Mettere in una vaschetta di Coplin contenente colorante Giemsa diluito 1:10 per 20 min.
- Sciacquare con acqua distillata.
- Scolare e asciugare a temperatura ambiente.
- Montare in DPX, altrimenti utilizzare l'immersione in olio.

### Strisci spessi per parassiti della malaria

- Far asciugare i vetrini.
- Inserire in una vaschetta di Coplin contenente colorante Giemsa diluito 1:50 a pH 7,2 per 1 ora.
- Lavare con acqua distillata (allontanare il colorante dai vetrini e dal contenitore di colorazione per evitare che lo striscio sia ricoperto da un sottile deposito di colorante).
- Differenziare con acido acetico 1:1.500 (controllo a intervalli con visualizzazione al microscopio. Le sezioni devono avere un colore generale rosa, con nuclei blu e granuli degli eosinofili rossi).
- Sciacquare rapidamente in acqua distillata.
- Asciugare all'aria.

## 7.4 Interpretazione

### Risultato positivo

Cromatina del parassita	Rosso scuro
Citoplasma del parassita	Blu
Puntini di Schüffner	Rossi
Punti di Maurer (fessure)	Rosso-malva

### Risultato negativo

Globuli rossi		Grigio malva pallido
Reticolociti		Grigio blu
Nuclei dei neutrofili	V	Viola scuro
Granuli dei neutrofili		Malva viola
Granuli degli eosinofili		Rossi
Citoplasma delle cellule mononucleate		Bu-grigio

## 7.5 Microrganismi per Controllo Qualità

### Controllo positivo

Specie *Plasmodium*.

## Controllo negativo

Può essere utilizzato come controllo uno striscio di provata negatività

## 7.6 Informazione Tecnica

I test di diagnosi rapida (RTD – Rapid Diagnostic Tests) sono disponibili come saggi alternativi alla microscopia. Questi test rilevano tre gruppi principali di antigeni che comprendono: la Proteina 2 ricca di istidina (HRP2) specifica per *P. falciparum*, plasmodio lattato deidrogenasi i (pLDH), e aldolasi. Questi prodotti sono disponibili sotto forma di confezioni di plastica, cartucce, strisce a immersione, e confezioni ibride. Quando si deve scegliere fra microscopia, RPD o metodo di identificazione, si devono considerare fattori diversi quali: prevalenza del parassita, disponibilità di personale qualificato e di risorse, capacità di mantenere la qualità garantita della microscopia e dei RDT, richiesta di determinazione quantitativa<sup>25</sup>.

## 8 Colorazione Gram

### 8.1 Introduzione

I microrganismi sono classificati secondo la loro reazione alla colorazione di Gram. Nelle loro pareti cellulari i batteri Gram positivi sono dotati di strati di peptidoglicano più spessi e più densi. Durante la decolorazione lo iodio penetra attraverso la parete cellulare di questi batteri e modifica il colorante blu, inibendone la sua diffusione attraverso la parete stessa. La positività della colorazione al Gram richiede una parete cellulare intatta. Le cellule Gram-negative non trattengono il metil /cristal violetto e assumono il colorante di contrasto<sup>26</sup>. A tal fine si possono usare rosso neutro, safranina o carbol fucsina<sup>26</sup>.

### 8.2 Considerazioni sulla sicurezza<sup>1-11</sup>

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

### 8.3 Metodo di Gram per esame di vetrini<sup>26,27</sup>

- Preparare uno striscio e scaldare delicatamente per fissare.
- Ricoprire il vetrino con lo 0,5% di metil/cristal violetto e lasciare agire per 30 s.
- Inclinare il vetrino, versare sufficiente Lugol (1%) per allontanare il colorante, ricoprire con iodio di preparazione recente e lasciare agire per 30 s.
- Inclinare il vetrino e allontanare lo iodio con etanolo o acetone 95 - 100% fino a quando il vetrino non rilascia più colorante dallo striscio.
- Sciacquare con acqua.
- Versare 0.11% di colorante di contrasto (rosso neutro, safranina o carbolfucsina) e lasciare agire per circa 2 min.
- Lavare con acqua e asciugare.

### 8.4 Interpretazione

#### Risultato positivo

Microrganismi Gram positivi colorazione blu / viola.

#### Risultato negativo

Gram-negativi colorazione rosa / rosso.

## 8.5 Microrganismi per Controllo Qualità

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

## 8.6 Informazione Tecnica

Alcuni batteri Gram positivi appaiono regolarmente Gram negativi, in tutto o in parte, ad esempio specie *Streptococcus* a rapida crescita, forme in degenerazione di *Streptococcus pneumoniae* e alcuni ceppi di specie *Bacillus*.

Alcuni batteri Gram negativi sottili, come *Haemophilus* spp, potrebbero facilmente non essere osservati se colorati con il metodo di Gram (consultare modifica di Sandiford).

Quando il materiale clinico è chiaramente sospettato di contenere batteri, ma questi non sono visibili con la colorazione di Gram, usarne una alternativa, (quale quella Sandiford o di Giemsa), colorazioni negative come inchiostro di china, o, se utile, preparazioni umide.

# 9 Modificazione di Sandiford della colorazione di Gram

## 9.1 Introduzione

La modificazione di Sandiford della colorazione di Gram di Sandiford è stata originariamente utilizzata per dimostrare la presenza di diplococchi intracellulari Gram-negativi<sup>28</sup>. Il colorante di contrasto migliora anche l'osservazione dei microrganismi Gram-negativi e Gram variabili.

## 9.2 Considerazioni sulla sicurezza<sup>1-11</sup>

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

## 9.3 Metodo<sup>29</sup>

- Diffondere un'ansata di campione clinico in strato sottile su vetrino sgrassato. Asciugare all'aria
- Colorare con cristal violetto per 2 min.
- Sciacquare con acqua di rubinetto.
- Colorazione di contrasto con soluzione iodica per 2 min.
- Sciacquare con acqua di rubinetto.
  
- Asciugare tamponando.
- Differenziare in acetone-alcol per 10-15 s.
- Lavare in acqua corrente.
- Asciugare tamponando.
- Colorazione di contrasto con verde malachite di Sandiford (miscela di pironina Y e verde malachite) e lasciar agire per 3 minuti.
- Coprire il vetrino con acqua (non lavare).
- Asciugare all'aria.

## 9.4 Interpretazione

### Risultato positivo

Microrganismi Gram positivi colorazione blu / viola.

### Risultato negativo

Microrganismi Gram-negativi o variabili assumono colore rosa su sfondo blu verde.

## 9.5 Microrganismi per Controllo Qualità

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

## 9.6 Informazione Tecnica

N / D

# 10 Soluzione iodica di Lugol (per parassiti)

---

## 10.1 Introduzione

La soluzione iodica di Lugol diluita all'1%, è utilizzata per colorare le uova e le cisti dei protozoi nei preparati a fresco. Questo metodo migliora la valutazione delle loro strutture interne.

## 10.2 Considerazioni sulla Sicurezza<sup>1-11</sup>

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

## 10.3 Metodo<sup>30</sup>

- Miscelare una piccola quantità di feci con 1 goccia di NaCl 0,85% sul lato sinistro del vetrino e con una goccia di soluzione iodica posta sul lato destro.
- Coprire con coprioggetto ed esaminare.

## 10.4 Interpretazione

### Risultato positivo

Nei nuclei dei protozoi penetra lo iodio che conferisce loro una colorazione marrone chiara, mentre il citoplasma rimane incolore.

### Risultato negativo

N / D

## 10.5 Microrganismi per Controllo Qualità

### controllo positivo

Può essere utilizzato come controllo uno striscio di provata positività.

### Controllo Negativo

Può essere utilizzato come controllo uno striscio di provata negatività.

## 10.6 Informazione Tecnica

Alcuni operatori preferiscono preparare vetrini separati con fisiologica e soluzione iodica. Si verificano così minori possibilità di spargere liquidi sul tavolino porta preparati del microscopio.

Ridurre l'intensità della luce per osservazioni a basso ingrandimento perché la maggior parte dei microrganismi può sfuggire all'osservazione se ricercati con luce intensa. L'illuminazione deve essere regolata in modo che alcuni elementi cellulari presenti nelle feci mostrino rifrazione. In queste condizioni la maggior parte delle forme cistiche protozoarie rifrange la luce.

Per lavorare in modo idoneo la soluzione iodica di Lugol 1% dovrebbe essere di preparazione recente (10-14 giorni).

## 11 Colorazione Tricromia Modificata (per Microsporidi)

### 11.1 Introduzione

Questa tecnica è utilizzata per la dimostrazione dei microsporidi nelle feci.

### 11.2 Considerazioni sulla sicurezza<sup>1-11</sup>

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

### 11.3 Metodo<sup>31</sup>

- Preparare uno striscio sottile di una sospensione non concentrata di feci liquide in 10% di formalina (rapporto 1:3) e lasciare asciugare all'aria.
- Fissare lo striscio in metanolo per 5 minuti.
- Ricoprire il vetrino con colorante cromogeno\* e lasciare per 90 minuti.
- Sciacquare con l'acqua corrente per 1 minuto per rimuovere l'eccesso di colorante.
- Lavare in alcool acido (0,45% di acido acetico glaciale in alcool etilico) per 10 s.
- Sciacquare brevemente in alcol 95%.
- Immergere il vetrino in alcol 95% per 5 min.
- Immergere il vetrino in alcol 100% per 10 min.
- Immergere il vetrino in Hemo-De (sostituto dello xilene) per 10 min.
- Lasciare asciugare all'aria ed esaminare utilizzando un obiettivo ad elevato ingrandimento.

\* Chromotrope 2R 6 g, verde rapido 0,15 g, acido fosforico 0,7 g, lasciare in 3 mL di acido acetico glaciale per 30 minuti, quindi mescolare con 100 ml di acqua distillata.

### 11.4 Interpretazione

#### Positivo:

Le spore delle specie microsporidi che infettano i mammiferi, inclusi gli esseri umani, tendono ad essere di piccole dimensioni, che variano da 1,0-3,0 micron X 1,5-4,0  $\mu\text{m}$ <sup>32</sup>. Sono di forma ovoidale e rifrangenti. Le pareti delle spore presentano colorazione brillante rosso-rosa. Occasionalmente le spore si colorano con una "fascia" rossa che attraversa il loro centro.

#### Negativo:

Non osservate spore

## 11.5 Microrganismi per Controllo Qualità

### Controllo positivo

Specie Microsporidi.

### Controllo Negativo

Può essere utilizzato come controllo uno striscio di provata negatività.

## 11.6 Informazione Tecnica

Per definire la diagnosi si raccomanda di esaminare 100 campi con obiettivo 100x ad immersione in olio, con media di lettura di 10 min per vetrino. La lettura di un numero inferiore di campi potrebbe determinare un risultato falso negativo nei pazienti che secernono un numero ridotto di spore<sup>31</sup>.

## 12 Colorazione Ziehl Neelsen Modificata a Freddo (per specie *Cryptosporidium*)

### 12.1 Introduzione

Questa tecnica è utilizzata per la dimostrazione delle oocisti di specie *Cryptosporidium* nelle feci. In alternativa, può essere utilizzata la colorazione modificata auramina-fenolo (consultare punto 3).

### 12.2 Considerazioni sulla sicurezza<sup>1-11</sup>

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

### 12.3 Metodo<sup>33</sup>

- Preparare uno striscio di medio spessore e lasciare asciugare all'aria.
- Fissare in metanolo per 3 min e asciugare all'aria
- Ricoprire il vetrino con colorante di Kinyoun modificato per colorazione di acido resistenti (3% carbol-fucsina) e lasciar agire per circa 15 min.
- Sciacquare con acqua di rubinetto.
- Ricoprire il vetrino con metanolo acido 1% per decolorare e lasciare agire per circa 15-20 s.
- Sciacquare con acqua di rubinetto.
- Colorazione di contrasto con verde malachite 0,4% o prodotti alternativi e lasciare per 30 s.
- Risciacquare con acqua corrente e lasciare asciugare all'aria.
- Esaminare con obiettivi 40x o 50x e lenti oculari 10x. La morfologia può essere osservata a maggiore ingrandimento con obiettivo più potente.

### 12.4 Interpretazione

#### Risultato positivo

Le specie *Cryptosporidium* sono di forma sferica di 4-6 µm. La colorazione delle oocisti è variabile, e alcune possono apparire non colorate. Le strutture interne possono presentare varie gradazioni di colorazione. A volte la forma a falce degli sporozoitii può essere osservata solo a elevato

ingrandimento. Le specie *Isospora* si colorano in rosso, misurano 32 x 16 µm e presentano corpi ovali affusolati a entrambe le estremità, contenenti uno zigote granulare o due sporoblasti.

Le oocisti delle specie *Cyclospora* assumono colore rosso rosato, sono sferiche 8-10 µm e contengono una morula centrale. La colorazione è variabile e alcune oocisti possono apparire prive di colore. Le oocisti osservate nelle feci sono solitamente non sporulate. Possono colorarsi anche lieviti, altri esseri viventi e detriti fecale.

### Risultato negativo

Parassita non rilevato.

## 12.5 Microrganismi per Controllo Qualità

### Controllo positivo

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

### Controllo Negativo

Può essere utilizzato come controllo uno striscio di provata negatività.

## 12.6 Informazione Tecnica

Si deve prestare attenzione perché le spore e gli artefatti possono assumere il colorante di Ziehl-Neelsen e apparire positivi a osservatori inesperti.

# 13 Preparazione con Nigrosina (inchiostro di china)

## 13.1 Introduzione

La colorazione con nigrosina è una tecnica negativa perché lo sfondo è colorato mentre i microrganismi rimangono privi di colore. Le capsule spostano il colorante e si presentano come aloni circondanti il microrganismo<sup>26</sup>. Questa tecnica è particolarmente indicata per la dimostrazione della capsula del *Cryptococcus neoformans* e può essere usata anche per dimostrare la presenza di capsule batteriche e dei lieviti.

## 13.2 Considerazioni sulla sicurezza<sup>1-11</sup>

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

## 13.3 Metodo<sup>26</sup>

- Porre una goccia d'inchiostro di china su un vetrino pulito.
- Aggiungere 1 goccia di campione, o di coltura liquida, o strisciare un granulo di materiale sulla superficie del vetrino accanto alla goccia d'inchiostro prima di mescolarli.
- Coprire con un vetrino, premerlo fra un foglio di carta assorbente in modo che lo striscio diventi molto sottile e di colore pallido, ed esaminare.

## 13.4 Interpretazione

### Risultato positivo

I microrganismi che possiedono una capsula appaiono molto rifrangenti, circondati da una zona chiara rispetto al fondo scuro.



### Risultato negativo

Non si osserva nessuna zona chiara intorno al microrganismo.

## 13.5 Microrganismi per Controllo Qualità

### Controllo Positivo

*Cryptococcus neoformans*, o altri microrganismi capsulati.

### Controllo Negativo

Può essere utilizzato come controllo uno striscio di provata negatività.

## 13.6 Informazione Tecnica

La corretta concentrazione dell'inchiostro di china è determinante per evidenziare la zona capsulare.

# 14 Colorazione Rapida di Field (per *Dientamoeba fragilis*, e *Pneumocystis jirovecii*)

## 14.1 Introduzione

Si tratta di una tecnica di colorazione per dimostrare la presenza di *Dientamoeba fragilis* e *Blastocystis hominis* nelle feci, e la *Pneumocystis jirovecii* nel lavaggio broncoalveolare.

## 14.2 Considerazioni sulla sicurezza<sup>1-11</sup>

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

## 14.3 Metodo

- Preparare uno striscio e lasciare asciugare all'aria.
- Fissare in metanolo per 60 s.
- Ricoprire il vetrino con colorante B di Field (diluito 1 a 4 con acqua tamponata a pH 6.8).
- Aggiungere immediatamente un ugual volume di colorante A di Field (indiluito), mescolare e attendere per 60 s.
- Sciacquare con acqua corrente, scolare e asciugare all'aria.

## 14.4 Interpretazione

### Risultato positivo

I nuclei del parassita e le strutture cromatiniche assumono colorazione rossa. Le pareti delle cisti di *P. jirovecii* non saranno colorate diversamente dalle forme trofiche che si colorano.

### Risultato negativo

Batteri e lieviti assumono colorazione blu scuro. I nuclei dei leucociti assumono colorazione viola e il loro citoplasma colorazione grigio-azzurro.

## 14.5 Microrganismi per Controllo Qualità

### Controllo Positivo

*Dientamoeba fragilis*, *Blastocystis hominis* e *Pneumocystis jirovecii*.

## Controllo Negativo

Può essere utilizzato come controllo uno striscio di provata negatività.

## 14.6 Informazione Tecnica

Quando si utilizza questo metodo, non è possibile osservare la tipica frammentazione dei nuclei perché il contenuto nucleare spesso agglutina<sup>23</sup>.

La colorazione per *Pneumocystis jirovecii* è più comunemente eseguita con immunofluorescenza specifica con anticorpi o con impregnazione argentea. Sono sempre più utilizzati metodi di diagnosi alternativi, come la PCR.

## 15 Colorazione delle spore

### 15.1 Introduzione

I metodi seguenti possono essere utilizzati per la dimostrazione delle spore nei bacilli Gram positivi.

### 15.2 Considerazioni sulla Sicurezza<sup>1-11</sup>

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

### 15.3 Metodi

#### 15.3.1 Metodo di Schaeffer e Fulton (modificato da Ashby)<sup>34</sup>

- Preparare uno striscio e scaldare delicatamente per fissare.
- Mettere il vetrino sopra un bicchiere di acqua bollente, appoggiandolo sul bordo con lo striscio batterico rivolto verso l'alto.
- Quando sulla parte sottostante si formano gocce di grandi dimensioni ricoprire il vetrino con la soluzione di verde malachite e lasciare agitare per 1 minuto. mentre l'acqua è ancora in ebollizione
- Lavare con acqua fredda.
- Trattare con safranina o con fucsina basica per 30 s.
- Lavare e asciugare.

#### 15.3.2 Metodo di Wirtz-Conklin<sup>35</sup>

- Ricoprire il vetrino con soluzione di verde malachite.
- Vapore per 3-6 minuti.
- Sciacquare con acqua di rubinetto.
- Colorazione di contrasto con safranina per 30 s.
- Lavare e asciugare.

### 15.4 Interpretazione

#### Risultato positivo

Spore batteriche colorazione verde.

**Risultato Negativo**

Cellule batteriche colorazione rossa.

**15.5 Microrganismi per Controllo Qualità****Controllo positivo**

Specie *Bacillus*.

**Controllo Negativo**

Non microrganismi formanti spore, per esempio *E. coli*.

**15.6 Informazione Tecnica**

N / D

**16 Colorazione di Vincent (per batteri orali)****16.1 Introduzione**

Questa tecnica è utilizzata per colorare la *Borrelia vincentii* (spirocheta che causa l'angina di Vincent) in campioni prelevati con tamponi orali o faringei. La presenza di numerose *Borrelia vincentii* associate a bacilli fusiformi e a bastoncini Gram negativi e a leucociti polimorfonucleati è compatibile con questa infezione.

**16.2 Considerazioni sulla sicurezza<sup>1-11</sup>**

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

**16.3 Metodo**

La procedura per la colorazione di Vincent è simile a quella di Gram, tranne la colorazione di contrasto (1% carbol fucsina), che è applicata per 30 s.

**16.4 Interpretazione****Risultato positivo**

La *Borrelia vincentii* presenta colorazione rosa pallido con spirali fusiformi rosa e a forma di sigaro.

**Nota:** E' necessaria la presenza di entrambe le forme per definire la diagnosi di malattia di Vincent

**Risultato Negativo**

N / D

**16.5 Microrganismi per Controllo Qualità**

*Borrelia vincentii* appare come una spirocheta di grande dimensione che varia tra 10-30 micron di lunghezza<sup>35</sup>.

**Risultato positivo**

*Borrelia vincentii*.

**Risultato Negativo**

Può essere utilizzato come controllo uno striscio di provata negatività.

## 16.6 Informazione Tecnica

L'appropriata concentrazione del colorante è una condizione critica per ottenere risultati accurati.

# 17 Colorazione di Ziehl-Neelsen(per bacilli acido resistenti)

## 17.1 Introduzione

Questa tecnica di colorazione è usata per dimostrare la presenza di bacilli acido e alcol resistenti (AAFB) che hanno involucri cerosi che li rendono difficili da colorare e decolorare.

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

## 17.2 Considerazioni sulla sicurezza<sup>1-11</sup>

- Tutte le specie *Mycobacterium* sospetti devono essere processate in cabine microbiologiche di classe 1 con scarico protetto in ambiente di Contenimento di Livello 3.
- Seguire le valutazioni locali COSHH e del rischio durante l'esecuzione di tutte le procedure di colorazione.
- Devono essere indossati guanti monouso.
- Le punte di diamante non sono raccomandate e si consigliano vetrini smerigliati contrassegnati con una matita.
- Il materiale deve essere fissato ponendo i vetrini su una piastra elettrica calda prima della colorazione (65-75° C). Questa procedura deve essere eseguita in una cabina di Classe 1 con scarico protetto fino a quando il materiale strisciato non è essiccato e fissato sul vetrino. Questi devono essere collocati su un appropriato supporto.

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

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

## 17.3 Metodo<sup>16</sup>

- Ricoprire il vetrino con carbol fucsina concentrata.
- Riscaldare moderatamente, e una volta che il vetrino inizia a produrre vapore" lasciare per 3-5 min.
- Sciacquare bene con acqua.
- Decolorare per 2-3 minuti con un (3% v / v) di soluzione acido-alcool, lavare con acqua, quindi sostituire con acido-alcol nuovo e continuare per 3-4 minuti fino a quando il vetrino rimane di colore rosa tenue.
- Sciacquare in modo appropriato con acqua.
- Colorazione di contrasto con blu di metilene (1% p / v), o verde malachite per 30 s.
- Risciacquare con acqua e lasciare asciugare.
- Applicare olio di immersione e leggere con un microscopio a luce trasmessa.

**Nota:** Seguire la procedura consigliata dal produttore se si utilizza una confezione commerciale.

## 17.4 Interpretazione

### Risultato positivo

i bacilli acido resistenti variano in lunghezza fra 0,5-10  $\mu\text{m}$  e appaiono di colore rosso. Alcuni assumono aspetto perlato<sup>16</sup>.

### Risultato negativo

Tutti gli altri microrganismi e i materiali di sottofondo assumono il colore di contrasto verde, se si usa verde malachite, oppure blu nel caso di utilizzo del blu di metilene.

## 17.5 Microrganismi per Controllo Qualità

### Controllo positivo

Specie *Mycobacterium*.

### Controllo Negativo

Può essere utilizzato come controllo uno striscio di provata negatività.

## 17.6 Informazione Tecnica<sup>36</sup>

La colorazione Ziehl-Neelsen è meno sensibile di quella con auramina-fenolo. Questo metodo fornisce dettagli morfologici ed è più utile per confermare la presenza di AAFB da colture positive, ma non deve essere utilizzata per “confermare” i risultati da campioni clinici, che sono positivi alla colorazione auramina-fenolo.

## Bibliografia

---

1. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. The Approved List of Biological Agents. Her Majesty's Stationery Office. Norwich. 2004. p. 1-21
2. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Infections at work: Controlling the risks. Her Majesty's Stationery Office. 2003.
3. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Biological agents: Managing the risks in laboratories and healthcare premises. Health and Safety Executive. 2005.
4. Health and Safety Executive. Control of Substances Hazardous to Health Regulations. The Control of Substances Hazardous to Health Regulations 2002. 5th ed. HSE Books; 2002.
5. Health and Safety Executive. Five Steps to Risk Assessment: A Step by Step Guide to a Safer and Healthier Workplace. HSE Books. 2002.
6. Health and Safety Executive. A Guide to Risk Assessment Requirements: Common Provisions in Health and Safety Law. HSE Books. 2002.
7. British Standards Institution (BSI). BS EN12469 - Biotechnology - performance criteria for microbiological safety cabinets. 2000.
8. British Standards Institution (BSI). Part 2: Recommendations for information to be exchanged between purchaser, vendor and installer and recommendations for installation. BS 5726 - Microbiological safety cabinets. 1992.
9. British Standards Institution (BSI). Part 4: Recommendations for the selection, use and maintenance. BS 5726 - Microbiological safety cabinets. 1992.
10. Health Services Advisory Committee. Safe Working and the Prevention of Infection in Clinical Laboratories and Similar Facilities. HSE Books. 2003.
11. Department for transport. Transport of Infectious Substances, 2011 Revision 5. 2011.
12. Cheesbrough M, editor. Medical Laboratory Manual for Tropical Countries. Vol II. 2000. p. 45
13. Rein MF. Trichomonas Vaginalis. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 5th ed. Vol 2. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2000. p. 2894-8.
14. Levett PN. A comparison of five methods for the detection of Trichomonas vaginalis in clinical specimens. Med Lab Sci 1980;37:85-8.
15. Greenwood JR, Kirk-Hillaire K. Evaluation of acridine orange stain for detection of Trichomonas vaginalis in vaginal specimens. J Clin Microbiol 1981;14:699.
16. Watt B, Rayner A, Harris G. Mycobacterium. In: Collee JG, Fraser AG, Marmion BP, Simmons A, editors. Mackie & McCartney Practical Medical Microbiology. 14th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1996. p. 329-41.
17. Nichols G, Thom BT. Screening for Cryptosporidium in stools. Lancet 1984;1:734-5.
18. Cruickshank R, editor. Medical Microbiology A guide to laboratory diagnosis and control of infection. Edinburgh and London: E & S Livingstone Limited; 1965. p. 632-3

19. Didier ES, Orenstein JM, Aldras A, Bertucci D, Rogers LB, Janney FA. Comparison of three staining methods for detecting microsporidia in fluids. *J Clin Microbiol* 1995;33:3138-45.
20. Davis LJ, Soave R. Cryptosporidium, Isospora, Cyclospora, Microsporidia and Dientamoeba. In: Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR, editors. *Infectious Diseases*. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 1998. p. 2442-55.
21. Parasitological Tests. In: Cheesbrough M, editor. *District Laboratory Practice in Tropical Countries*. Cambridge: Cambridge University Press; 1999. p. 178-309.
22. Moody AH, Fleck SL. Versatile Field's stain. *J Clin Pathol* 1985;38:842-3.
23. Johnson EH, Windsor JJ, Clark CG. Emerging from obscurity: biological, clinical, and diagnostic aspects of *Dientamoeba fragilis*. *Clin Microbiol Rev* 2004;17:553-70, table.
24. University of Bristol. *Staining Procedures*. 2006.
25. World Health Organization. Interim notes on selection of type of malaria rapid diagnostic test in relation to the occurrence of different parasite species: guidance for national malaria control programmes. 2005. p. 1-13.
26. Duguid JP. Staining Methods. In: Collee JG, Fraser AG, Marmion BP, Simmons A, editors. *Mackie & McCartney Practical Medical Microbiology*. 14th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1996. p. 793-812.
27. Barrow GI, Feltham RKA, editors. *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria*. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press; 1993. p. 214-8
28. Microscopic Examination and Staining of Microorganisms and Appendix 3: Preparation of stains and reagents. In: Baker FJ, Breach MR, editors. *Medical Microbiological Techniques*. Butterworth Heinemann; 1980. p. 14-509.
29. Dhiraputra C, Chavalittamrong B, Ratanarapee S. Advantage of Sandiford's counterstain in detection of Gram negative bacteria in clinical specimens. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1980;11:267-8.
30. Microscopic Examination of Fecal Specimens: Direct Smears. In: Isenberg HD, editor. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. Vol 1. Washington DC: American Society for Microbiology; 1992. p. 7.3.3.1-7.3.3.3.
31. Weber R, Bryan RT, Owen RL, Wilcox CM, Gorelkin L, Visvesvara GS. Improved light-microscopical detection of microsporidia spores in stool and duodenal aspirates. The Enteric Opportunistic Infections Working Group. *N Engl J Med* 1992;326:161-6.
32. Weber R, Bryan RT, Schwartz DA. Microsporidia. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 5th ed. Vol 2. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2000. p. 2920-33.
33. Current WL. Techniques and laboratory maintenance of *Cryptosporidium*. In: Dubey JP, Speer CA, Fayer R, editors. *Cryptosporidiosis of man and animals*. CRC Press; 1990. p. 31-51.
34. Ashby GK. Simplified Schaeffer spore stain. *Science* 1938;87:443.
35. Hendrickson DA, Krenz MM. Reagents and Stains. In: Balows A, Hausler WJJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 5th ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1991. p. 1289-314.
36. Murray SJ, Barrett A, Magee JG, Freeman R. Optimisation of acid fast smears for the direct detection of mycobacteria in clinical samples. *J Clin Pathol* 2003;56:613-5.