PERCORSO DIAGNOSTICO
DELLE
PARASSITOSI INTESTINALI

A cura del Comitato di Studio per la Parassitologia dell'Associazione Microbiologi Clinici Italiani (AMCLI-CoSP):
Annibale Raglio (*Coordinatore*), *Francesco Bernieri*, *Valeria Besutti*, *Serena Cavallari*, *Daniele Crotti*, *Luigi Di Matteo*, *Raffaele Gargiulo*, *Luciana Petrullo*, *Stefania Varani.*

Con la collaborazione di:

Simone Cacciò, *Maria Angeles Gomez Morales*, *Fabio Tosini*, *Adriano Casulli*. (Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento di Malattie Infettive. Laboratorio Europeo di Riferimento per i Parassiti; Centro di Collaborazione dell'OMS per l'Epidemiologia, Diagnosi e Controllo dell'Echinococcosi Cistica ed Alveolare ITA-107, Roma).

Fabrizio Bruschi[1], *Valentina Mangano*[2]. (Direttore del programma "Monitoraggio delle parassitosi e formulazione di algoritmi diagnostici"[1], Dipartimento di Ricerca Traslazionale e delle Nuove Tecnologie in Medicina e Chirurgia, Università di Pisa; Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera Universitaria Pisana[1, 2]).

Laura Rinaldi. (Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali, Centro Collaboratore OMS ITA-116, Università degli Studi di Napoli Federico II).

Simonetta Mattiucci (Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive, UOS Parassitologia, Azienda Ospedaliero-Universitaria Policlinico Umberto I, Sapienza Università di Roma).

Con il patrocinio della Società Italiana di Parassitologia (SoIPa).

INDICE

PREFAZIONE Pag. 6

1 SCOPO Pag. 8

2 INTRODUZIONE Pag. 8

3 QUALI PARASSITI RICERCARE Pag. 11

3.1 IL DATO CLINICO Pag. 11

3.2 IL DATO EPIDEMIOLOGICO Pag. 11

4 FASE PREANALITICA Pag. 13

4.1 RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI Pag. 13

4.2 CONSERVANTI/FISSATIVI Pag. 14

4.3 NUMERO DI CAMPIONI DA ESAMINARE Pag. 18

5 ESAME COPRO-PARASSITOLOGICO Pag. 19

5.1 ESAME COPRO-PARASSITOLOGICO STANDARD Pag. 19

6 TECNICHE DIAGNOSTICHE DIRETTE Pag. 20

6.1 ESAME MACROSCOPICO Pag. 20

6.2 ESAME MICROSCOPICO DIRETTO Pag. 20

6.3 CONCENTRAZIONI Pag. 21

6.3.1 SEDIMENTAZIONE CON FORMOLO-ETIL ACETATO Pag. 21

6.3.2 FLOTTAZIONE Pag. 22

6.4 COLORAZIONI ESTEMPORANEE Pag. 23

6.5 COLORAZIONI PERMANENTI Pag. 24

6.5.1 COLORAZIONI TRICROMICA DI WHEATLEY Pag. 24

6.5.2 COLORAZIONE CON EMATOSSILINA FERRICA Pag. 24

6.5.3 COLORAZIONE DI GIEMSA Pag. 24

6.6 COLORAZIONI PER I COCCIDI Pag. 25

6.6.1 AUTOFLUORESCENZA Pag. 26

6.7 COLORAZIONI PER I MICROSPORIDI Pag. 26

6.8 SCOTCH TEST/TAMPONE PERIANALE Pag. 27

6.9 TECNICHE PER LARVE DI *STRONGYLOIDES* SPP. E ALTRI NEMATODI Pag. 28

6.10 TEST IMMUNOLOGICI Pag. 29

6.10.1 *GIARDIA DUODENALIS* E *CRYPTOSPORIDIUM* SPP. Pag. 30

6.10.2 *ENTAMOEBA HISTOLYTICA/DISPAR* E *ENTAMOEBA HISTOLYTICA* Pag. 30

6.10.3 *SCHISTOSOMA* SPP. Pag. 30

6.11 STIMA DELLA CARICA DI ELMINTI Pag. 30

6.12 COLTURE PER I PROTOZOI Pag. 31

6.13 BIOLOGIA MOLECOLARE Pag. 31

6.13.1 VALORI E LIMITI DEI TEST MOLECOLARI Pag. 32

6.13.2 KIT COMMERCIALI Pag. 34

7 ALTRI MATERIALI DAL TRATTO INTESTINALE Pag. 35

7.1 LIQUIDO DUODENALE Pag. 35

7.1.1 STRING TEST Pag. 36

7.2 CAMPIONI DA SIGMOIDOSCOPIA Pag. 37

7.2.1 AMEBIASI Pag. 37

7.2.2 SCHISTOSOMIASI Pag. 37

8 TECNICHE DIAGNOSTICHE INDIRETTE Pag. 38
8.1 *ENTAMOEBA HISTOLYTICA* – RICERCA ANTICORPI Pag. 38
8.2 *STRONGYLOIDES STERCORALIS* – RICERCA ANTICORPI Pag. 39
8.3 *SCHISTOSOMA MANSONI* – RICERCA ANTICORPI Pag. 39
9 IDENTIFICAZIONE MACROSCOPICA DEGLI ELMINTI Pag. 40
9.1 IDENTIFICAZIONE DELLE PROGLOTTIDI DI CESTODI Pag. 40
9.2 IDENTIFICAZIONE DI VERMI ADULTI DI *ASCARIS LUMBRICOIDES* Pag. 40
9.3 IDENTIFICAZIONE DI VERMI ADULTI DI *ENTEROBIUS VERMICULARIS* Pag. 41
10 IDENTIFICAZIONE MICROSCOPICA DEGLI ELMINTI Pag. 42
10.1 IDENTIFICAZIONE DELLE UOVA Pag. 42
10.2 IDENTIFICAZIONE DELLE LARVE Pag. 45
11 IDENTIFICAZIONE MICROSCOPICA DEI PROTOZOI Pag. 46
11.1 IDENTIFICAZIONE DEI TROFOZOITI AMEBICI Pag. 46
11.2 IDENTIFICAZIONE DELLE CISTI AMEBICHE Pag. 49
11.3 IDENTIFICAZIONE DEI TROFOZOITI DI FLAGELLATI Pag. 51
11.4 IDENTIFICAZIONE DELLE CISTI DI FLAGELLATI Pag. 52
11.5 IDENTIFICAZIONE DEI CILIATI Pag. 53
11.6 IDENTIFICAZIONE DEGLI STRAMENOPILI Pag. 54
11.7 IDENTIFICAZIONE DELLE OOCISTI DEI COCCIDI Pag. 54
11.8 IDENTIFICAZIONE DEI MICROSPORIDI Pag. 57
12 ALGORITMI DIAGNOSTICI Pag. 58
12.1 ALGORITMO A. USO DI TECNICHE TRADIZIONALI Pag. 58
12.2 ALGORITMO B. USO DI TECNICHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE PER PROTOZOI Pag. 60
13 APPENDICE A: IMMAGINI DI UOVA E LARVE DI ELMINTI Pag. 62
14 APPENDICE B: IMMAGINI DI TROFOZOITI E CISTI DI PROTOZOI Pag. 71
15 APPENDICE TECNICA Pag. 81
15.1 ESEMPIO DI MODULO PER LA RACCOLTA DATI CLINICI E ANAMNESTICO-EPIDEMIOLOGICI Pag. 82
15.2 ESEMPIO DI ISTRUZIONI PER LA RACCOLTA DELLE FECI Pag. 83
15.3 SOLUZIONI IODATE PER PARASSITOLOGIA Pag. 84
15.4 ESAME MICROSCOPICO DIRETTO Pag. 85
15.5 CONCENTRAZIONE FORMOLO-ETIL ACETATO Pag. 86
15.6 CONCENTRAZIONE CON FLOTTAZIONE Pag. 87
15.7 MINI-FLOTAC: DA FECI FRESCHE Pag. 88
15.8 MINI-FLOTAC: DA FECI IN FORMALINA 5-10% FISSATE IN LABORATORIO Pag. 89
15.9 SCOTCH TEST Pag. 90
15.10 TAMPONE PERIANALE Pag. 90
15.11 IDENTIFICAZIONE DELLE PROGLOTTIDI DI *TAENIA* SPP. Pag. 91
15.11.1 INIEZIONE DI COLORANTI NELLE PROGLOTTIDI Pag. 91
15.11.2 CHIARIFICAZIONE DELLE PROGLOTTIDI CON ACIDO ACETICO Pag. 91
15.12 COLORAZIONE DI GIEMSA PER *DIENTAMOEBA FRAGILIS* Pag. 92
15.13 METODO DI BAERMANN Pag. 93
15.14 MODIFICHE AL METODO DI BAERMANN Pag. 94
15.15 COLTURA SU CARTA DA FILTRO SECONDO HARADA-MORI Pag. 95

15.16 COLTURA SU AGAR PER *STRONGYLOIDES STERCORALIS* Pag. 96
15.17 METODO DI KATO-KATZ Pag. 97
15.18 METODO DI STOLL PER IL CONTEGGIO DELLE UOVA Pag. 99
15.19 METODO DI MCMASTER Pag. 101
15.20 COLORAZIONI ALCOOL-ACIDO RESISTENTI PER COCCIDI Pag. 102
15.20.1 COLORAZIONE DI ZIEHL-NEELSEN MODIFICATA Pag. 102
15.20.2 COLORAZIONE CON AURAMINA Pag. 102
15.21 PREPARAZIONE DI STRISCI FECALI PER COLORAZIONI PERMANENTI Pag. 103
15.22 COLORAZIONE TRICROMICA DI WHEATLEY Pag. 104
15.23 COLORAZIONE CON EMATOSSILINA FERRICA Pag. 106
15.24 COLORAZIONE DI SARGEAUNT Pag. 108
15.25 COLORAZIONI PER MICROSPORIDI Pag. 109
15.25.1 COLORAZIONE TRICROMICA MODIFICATA DI WEBER O DI RYAN Pag. 109
15.25.2 COLORAZIONE CALCOFLUOR-WHITE Pag. 109
15.26 OCULARE MICROMETRICO Pag. 110
16 APPENDICE ETIMOLOGICA Pag. 111
FONTI BIBLIOGRAFICHE Pag. 119

ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 1. Principali fissativi per la parassitologia fecale Pag. 17
Tabella 2. Analisi e organismi ricercati come proposto da van Gool e Bart Pag. 18
Tabella 3. Principali Colorazioni per Amebe, Flagellati, Coccidi, Microsporidi Pag. 27
Tabella 4. Caratteristiche delle uova di elminti Pag. 44
Tabella 5. Caratteristiche delle larve di elminti Pag. 45
Tabella 6. Caratteristiche dei nuclei delle amebe intestinali e di *D. fragilis* Pag. 48
Tabella 7. Caratteristiche dei trofozoiti delle amebe intestinali (inclusa *D. fragilis*) Pag. 48
Tabella 8. Caratteristiche delle cisti di amebe intestinali Pag. 50
Tabella 9. Caratteristiche dei trofozoiti dei flagellati intestinali Pag. 52
Tabella 10. Caratteristiche delle cisti dei flagellati intestinali Pag. 53
Tabella 11. Alfabeto Greco Pag. 118

ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1. Raccolta delle feci Pag. 13
Figura 2. Dual test Pag. 18
Figura 3. Algoritmo per l'Esame copro-parassitologico standard Pag. 19
Figura 4. Consistenza delle feci: Cisti e Trofozoiti Pag. 20
Figura 5. Esame macroscopico: vermi o parti di essi riscontrabili nelle feci Pag. 20
Figura 6. Esame microscopico diretto Pag. 20
Figura 7. Colorazione di Dobell Pag. 23
Figura 8. Colorazione Tricromica Pag. 24
Figura 9. Colorazione Ematossilina ferrica Pag. 24
Figura 10. Colorazione di Giemsa Pag. 25
Figura 11. Oocisti di *Cryptosporidium* spp. Pag. 26
Figura 12. Autofluorescenza: oocisti di *C. cayetanensis* e di *C. belli* Pag. 26
Figura 13. Microsporidi Pag. 26
Figura 14. Scotch test Pag. 28

Figura 15. String Test Pag. 36
Figura 16. Proglottidi di tenie Pag. 40
Figura 17. *Ascaris lumbricoides*: vermi adulti Pag. 40
Figura 18. *Enterobius vermicularis*: vermi adulti Pag. 41
Figura 19. *Enterobius vermicularis*: particolari dei vermi adulti Pag. 41
Figura 20. Dimensioni relative delle uova di elminti Pag. 43
Figura 21. Caratteristiche delle larve di elminti Pag. 45
Figura 22. Rappresentazione schematica dei trofozoiti delle amebe (inclusa *D. fragilis*) Pag. 49
Figura 23. Rappresentazione schematica delle cisti delle amebe intestinali Pag. 50
Figura 24. Rappresentazione schematica dei trofozoiti dei flagellati intestinali Pag. 51
Figura 25. Rappresentazione schematica delle cisti dei flagellati intestinali Pag. 52
Figura 26. Rappresentazione schematica di *Balantidium coli* Pag. 53
Figura 27. Rappresentazione schematica di *Blastocystis* spp Pag. 54
Figura 28. Rappresentazione schematica di *Cryptosporidium* spp. Pag. 55
Figura 29. Rappresentazione schematica di *Cyclospora cayetanensis* Pag. 55
Figura 30. Rappresentazione schematica di *Cystoisospora belli* Pag. 56
Figura 31. Rappresentazione schematica di *Sarcocystis* spp. Pag. 56
Figura 32 Rappresentazione schematica di una spora di microsporidio al M. E. Pag. 57
Figura 33. Algoritmo A: tecniche tradizionali Pag. 59
Figura 34. Algoritmo B: tecniche di biologia molecolare Pag. 61

PREFAZIONE

DIAGNOSI E DIAGNOSTICA PARASSITOLOGICA
"All'antica"
un *modus* di agire professionalmente etico
TRADIZIONE e INNOVAZIONE

Il passato è un immenso tesoro di novità.
Renmy de Gourmont

L'essere "all'antica" non è un rifiuto del presente, non è una folcloristica tentazione luddista contro la civiltà della tecnica (che è o può essere indispensabile), non è un atteggiamento di carattere "resistenziale" o "resilenziale" magari avventato. No. È necessario riconoscerci in alcuni valori universali che ci consentano di non troncare i rapporti con un passato importante e significativo; la si può definire una "filosofia di vita", come se qualche cambiamento nei nostri modi di pensare e vivere più all'antica potesse avere la capacità di indirizzare diversamente alcune nostre condotte abituali, assai poco ispirate all'etica delle memorie individuali e collettive: oneste, progressive e cioè necessarie per un futuro più virtuoso.
Duccio Demetrio, nel suo saggio "All'antica. Una maniera di esistere" sostiene che essere all'antica non deve essere espressione evocatrice esclusivamente di mentalità, consuetudini, comportamenti conservatori e tradizionalistici. Tutt'altro. Essere all'antica si può rivelare un "punto di vista morale", etico, rispetto al consumismo che ci opprime, sovente inconsciamente.
Ce lo ricorda molto bene anche "l'antico" Mario Rigoni Stern, a proposito del raccontare: "nel narrare, diario o meno che sia, non possiamo non parlare del nostro vissuto, recente ma anche passato".
È vero che chi non è più giovane deve comprendere le novità per poi poterle usare al meglio e per evitare che i giovani meno esperti cadano in errori per banale fretta, comodità, ignoranza e/o per colpa di una mentalità influenzata da un'evoluzione della tecnologia frettolosa, dettata dal mercato e non sempre da prove scientifiche certe. "Il passato è solo l'esperienza che ci proietta nel futuro", scrisse Roberto Costantini in un suo romanzo.
Ecco, il recupero dei valori perduti, che è anche un'altra maniera di interpretare queste parole di Duccio Demetrio: "la coscienza del passato è un privilegio".
Grossa parte della Parassitologia Clinica è riservata tradizionalmente alle parassitosi sostenute da Elminti e Protozoi. Così come all'interno di queste due delle tre branche convenzionalmente definite di Parassitologia (la terza comprende l'Entomologia) una grande fetta è riservata alle parassitosi dell'apparato gastro-intestinale (in senso lato inteso) e alle parassitosi ematiche, del sistema reticolo-endoteliale e sistemiche. Proprio per questi due gruppi di parassitosi di interesse umano la diagnostica è squisitamente di laboratorio e si fonda, tuttora, sulla osservazione microscopica dei preparati specifici. Se importanti e necessarie sono le fasi preanalitiche, i percorsi e le modalità analitiche sono fondamentali. Dalle adeguate preparazione dei vetrini alle colorazioni specifiche successive, dagli arricchimenti raccomandati e raccomandabili alle necessarie procedure preparatorie (anche ricorrendo a consolidate metodologie alternative) per potere alfine addivenire ad una diagnosi morfologica corretta e completa applicandosi con dovizia e perizia, con attenzione e coscienza, alle osservazioni al microscopio ottico, strumento tuttora insostituibile.
Certo per queste per come per le altre parassitosi è d'uopo o può essere d'uopo ricorrere ad altre tecniche diagnostiche, che, comunque sia, vanno interpretate, sovente, come complementari a quelle

usuali e routinarie. E questo vale anche per le tecniche innovative, quelle basate sulla biologa molecolare (e consimili), sia per le parassitosi sinora citate sia per quelle cui ci si deve approcciare per la loro diagnosi in maniera diversificata. Si intende con ciò la diagnostica indiretta siero-immunologica e la ricerca diretta antigenica, o la ricerca di acidi nucleici, con le sue svariate opzioni.

L'importanza della tradizione nei confronti dell'innovazione, ovvero della loro complementarietà, è cosa che va sottolineata. Un esempio noto è questo: le colorazioni specifiche per alcuni protozoi intestinali e per buona parte di quelli ematico-sistemici. Ricorrere direttamente e magari unicamente alle tecniche di biologia molecolare è cosa pericolosissima e che denota scarso senso critico (si pensi ai limiti intrinseci, alle risorse esistenti, ai costi ecc.).

I vari organismi istituzionali, nazionali come Public Health Laboratory Service (PHLS), Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) o sovranazionali quale l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), sono ancora fautori della necessità della diagnostica tradizionale, non di rado tuttora di riferimento ("gold standard"), che comprende oltre alla microscopia anche la diagnostica siero-immunologica e la ricerca di antigeni specifici, in parte come già accennato.

Ma è soltanto con un'attenta, razionale, metodologica coscienza operativa (frutto di conoscenza, studio ed applicazione sul campo) che l'utilizzo eventuale (laddove utile e applicabile) di tecniche innovative può garantire un successo diagnostico, perché e purché le tecniche tradizionali siano di supporto ai dubbi, alle incertezze, alle difficoltà (anche intrinseche) che le prime possono avere o nascondere pericolosamente.

Rimanere ancorati al passato non è un vincolo scontato o criticabile, bensì è espressione di fedeltà e responsabilità, di buon senso e di sicurezza operativa, che potrà ancora per molto tempo garantire qualità e bontà diagnostiche.

Dicebat Bernardus Carnotensis nos esse quasi nanos gigantium humeris insidentes, ut possim plura eis et remotiora videre, non utique proprii visus acumine aut eminentia corporis, sed quia in altum subvehimur et extollimur magnitudine gigantea.(*)

Questa famosa frase di Giovanni da Salisbury, tratta dal *Metalogicon* pubblicato nel 1159, significa che le nostre conoscenze e le nostre acquisizioni in ogni aspetto della vita, comprese le acquisizioni scientifiche, non sono frutto unicamente delle nostre capacità, ma sono il risultato di secoli di sviluppo; quindi noi vediamo lontano non perché dotati di una vista eccezionale, ma solo perché siamo sulle spalle di chi è vissuto prima di noi ed ha portato avanti, un passo dopo l'altro, il grande cammino della scienza, della civiltà.

Ma significa anche, come spiega bene Umberto Eco nel suo saggio "Nani sulle spalle dei giganti, storia di un aforisma", che non si devono pedissequamente copiare gli antichi, al contrario si deve prenderli a modello per poter un domani essere ammirati come loro.

Quindi, per concludere, *Pedro, adelante con juicio*. Ben vengano tutte le innovazioni necessarie, ma sempre avendo ben presente il metodo scientifico, anch'esso "antico", ma pur sempre attuale e indispensabile.

(*) Chi non comprende il latino medioevale, grazie alle innovazioni tecnologiche, può facilmente trovare la traduzione nel web.

Associazione Microbiologi Clinici Italiani
Comitato di Studio per la Parassitologia
(AMCLI- CoSP)

1 SCOPO

Questo documento ha lo scopo di fornire ai laboratori di microbiologia, che quotidianamente affrontano la diagnostica parassitologica, informazioni relative alle procedure standardizzate utili per il ritrovamento dei parassiti intestinali.

Il documento non contiene informazioni riguardo ai cicli vitali dei parassiti, alla patogenesi e clinica delle malattie parassitarie, all'epidemiologia, alla terapia e prevenzione, così come non contiene informazioni concernenti gli strumenti necessari per la diagnostica parassitologica e le misure standard di sicurezza in laboratorio, né la gestione della qualità in parassitologia.

I pochi e succinti riferimenti a tali argomenti sono finalizzati alla scelta dei metodi più idonei per una corretta diagnosi.

2 INTRODUZIONE

Si raggruppano con il termine di "parassitosi intestinali" una serie di quadri clinici che hanno in comune l'essere causati da parassiti ad habitat intestinale (con l'eccezione degli Schistosomi che vivono nei plessi ematici e di *Fasciola* spp. e *Opisthorchis/Clonorchis* spp. che vivono nei dotti biliari) e le cui forme diagnostiche quali adulti o parti di essi, uova, larve per gli elminti, trofozoiti, cisti, oocisti per i protozoi, ma anche acidi nucleici sia per gli elminti che per i protozoi, possono essere evidenziate nell'esame copro-parassitologico.

I principali parassiti intestinali per l'uomo, comprendono:

- Protozoi (microrganismi unicellulari eucarioti appartenenti al Regno dei Protista):
  - Amebe patogene: *Entamoeba histolytica*.
  - Amebe non patogene: *Entamoeba dispar*, *Entamoeba moshkovskii*(*), *Entamoeba bangladeshi*(*), *Entamoeba coli*, *Entamoeba hartmanni*, *Entamoeba polecki*, *Endolimax nana*, *Iodamoeba bütschlii*.
  - Flagellati patogeni: *Giardia duodenalis* (sinonimi *G. intestinalis*, *G. lamblia*), *Dientamoeba fragilis*.
  - Flagellati non patogeni: *Chilomastix mesnili*, *Pentatrichomonas hominis*, *Enteromonas hominis*, *Retortamonas intestinalis.*
  - Ciliati: *Balantidium coli*.
  - Coccidi: *Cryptosporidium* spp. (*C. parvum*, *C. hominis*, *C. felis*, *C. meleagridis* ecc.)(¥) *Cyclospora cayetanensis*, *Cystoisospora belli*, *Sarcocystis* spp.
  - Stramenopili: *Blastocystis* spp.
  - Microsporidi: *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon* spp.(§)
- Elminti o vermi (organismi pluricellulari appartenenti al Regno Animalia):
  - Nematodi: *Enterobius vermicularis*, *Strongyloides stercoralis*, *Strongyloides fülleborni*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Paracapillaria philippinensis*, *Trichostrongylus* spp., *Ancylostoma* spp. (*A. duodenale*, *A. ceylanicum*), *Necator americanus*.
  - Cestodi: *Taenia saginata*, *Taenia asiatica*, *Taenia solium*, *Diphyllobothrium* spp. (*D. balaenopterae*, *D. stemmacephalum* ecc.), *Dibothriocephalus* spp. (*D. latus*, *D. dendriticus*, *D. nihonkaiensis* ecc.), *Adenocephalus pacificus*, *Hymenolepis nana*, *Hymenolepis diminuta*.
  - Trematodi: *Fasciola hepatica*, *Fasciolopsis buski*, *Opisthorchis* spp. (*O. viverrini*, *O felineus*), *Clonorchis sinensis*, *Heterophyes heterophyes*, *Metagonimus yokogawai*, *Dicrocoelium dendriticum*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma intercalatum*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mekongi*.

(*) *E. moshkovskii* e *E. bangladeshi*, morfologicamente indistinguibili da *E. histolytica* e da *E. dispar*, non sono generalmente associate a sintomi specifici; sono comunque ancora in corso studi sulla potenziale patogenicità. L'identificazione di specie è possibile unicamente con tecniche di biologia molecolare.

(¥) La tassonomia di *Cryptosporidium* è incerta, ma si ritiene che non sia un vero coccidio. Dati molecolari e biologici suggeriscono una maggiore affinità con le Gregarine, un gruppo di parassiti del Phylum Apicomplexa che infetta principalmente gli invertebrati.

(§) Dal punto di vista tassonomico i microsporidi appartengono al Regno dei Funghi, ma tradizionalmente, per quanto concerne la diagnostica di laboratorio, essi rientrano arbitrariamente e per convenzione nel gruppo dei "parassiti".

Il Laboratorio di Microbiologia, che effettua la ricerca dei parassiti, di norma in seguito specifica richiesta del medico curante (ricerca mirata), deve essere in grado di utilizzare le tecniche/metodiche più affidabili in relazione ai patogeni di cui si sospetta la presenza.

Inoltre è importante che ogni indagine copro-parassitologica sia preceduta da una coprocoltura con esito negativo in modo da escludere la presenza di batteri patogeni che possano essere la causa del quadro clinico del paziente. In molti casi, come nelle gastro-enteriti, infezioni batteriche possono dare un quadro sintomatologico simile ad alcune parassitosi.

Quindi è indispensabile che il medico curante che formula il sospetto diagnostico in base a criteri clinici (segni, sintomi e/o dati di laboratorio) e a criteri anamnestico-epidemiologici (luogo di provenienza o soggiorno in zone a rischio per specifici parassiti, ecc.), fornisca al laboratorio questi dati clinico-epidemiologici (ed eventuali fattori di rischio) di modo che lo specialista microbiologo o il parassitologo (se presente) possa ottimizzare l'esecuzione dei test parassitologici adottando le tecniche più idonee al caso e proporre ulteriori accertamenti con metodologie diversificate, se lo ritiene necessario.

È sempre utile la descrizione del campione, indicando la presenza di muco, sangue o resti non digeriti. Nei casi di diarrea, per esempio, distinguere la tipologia del campione è utile (es. diarrea acquosa da diarrea di tipo infiammatorio) per indirizzare la ricerca verso un determinato tipo di parassita (es. *Cryptosporidium* spp. o *G. duodenalis*).

In Appendice Tecnica è mostrato un esempio di modulo per la raccolta dei dati clinici e anamnestico-epidemiologici.

Ogni laboratorio deve produrre un proprio modulo per la raccolta dei dati clinici e anamnestico-epidemiologici semplificando o anche ampliando il modello proposto come esempio.

FOCUS

È indispensabile che il campione da esaminare sia accompagnato da informazioni clinico-epidemiologiche per poter ottimizzare l'esecuzione dei test parassitologici adottando le tecniche più idonee.

Le indagini diagnostiche per i parassiti intestinali si basano ancora in buona parte su esami microscopici (osservazioni al microscopio ottico) e quindi su criteri di tipo morfologico, fra cui dimensione, presenza di elementi caratteristici (flagelli, cilia, nelle forme vegetative oppure spine nelle uova di elminti, ecc.). Di conseguenza è necessario che la lettura dei preparati sia effettuata da operatori esperti, che assicurino risultati di alta qualità.

La diagnosi microscopica è particolarmente complicata poiché i parassiti intestinali non sono molto diffusi nei paesi occidentali e quindi è difficile mantenere esperienza e competenza; inoltre nei preparati microscopici delle feci l'enorme quantità di detriti e artefatti presenti può indurre a falsi risultati. È frequente quindi avere risultati sia falsi negativi che falsi positivi.

L'analisi delle risposte delle Valutazioni Esterne di Qualità (VEQ), come ad esempio UKNEQAS o VEQ Regioni Toscana-Lombardia, mettono in evidenza le difficoltà riscontrate dai laboratoristi italiani nell'individuare e/o correttamente identificare, in particolare, i protozoi (ad esempio *E. histolytica/dispar*, *D. fragilis*, *C. mesnili*), ma anche gli elminti (ad esempio *S. japonicum*, *Opisthorchis* spp., *Trichostrongylus* spp.).
Inoltre quando vengono inviati campioni di VEQ negativi sono frequenti da parte dei laboratori le rilevazioni di parassiti che invece non sono presenti nel campione, anche in questi casi sia protozoi che elminti.
Quindi una limitazione oggettiva della diagnosi microscopica convenzionale risiede nel fatto che solo operatori con esperienza sono in grado di produrre una diagnosi corretta. Un'altra limitazione occasionale consiste nel fatto che la morfologia dei parassiti può essere alterata da una cattiva conservazione del campione o che la morfologia da sola non permetta di distinguere tra parassiti molto simili ma con diversa patogenicità (es. *E. histolytica* da *E. dispar*). Inoltre la carica parassitaria di alcuni campioni può essere così bassa da rendere difficile l'identificazione dei rari parassiti presenti nel campione.
Per sopperire a questi limiti, nel tempo, al semplice esame microscopico si sono affiancati metodi che possono supportare o anche sostituire la diagnosi microscopica dei parassiti intestinali.
Un primo avanzamento è costituito dalla microscopia in fluorescenza (fluorescenza diretta) tramite visione con raggi UV che, a differenza della microscopia convenzionale in luce bianca, consente di discriminare facilmente parassiti che sono naturalmente autofluorescenti (es. *Cyclospora* spp.).
Inoltre, la microscopia in fluorescenza con l'ausilio di specifici anticorpi fluorescenti (IFA) è anche utilizzata frequentemente per l'identificazione di parassiti che hanno una morfologia difficilmente distinguibile (es. oocisti di *Cryptosporidium* spp.) da altri comuni organismi commensali come i lieviti.
Oltre l'immunofluorescenza, altre tecniche diagnostiche non microscopiche sfruttano la specificità dell'interazione antigene anticorpo per l'identificazione di determinati parassiti. Ad esempio, saggi immunoenzimatici (EIA), basati sul riconoscimento di antigeni parassitari caratteristici presenti nelle feci, sono utilizzati per la diagnosi dell'amebiasi da *E. histolytica* o altre parassitosi (es. giardiasi e cryptosporidiosi). Le tecniche sierologiche, come *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) e *Western Blot* (WB), invece sfruttano la presenza nel siero di anticorpi specifici contro parassiti che danno infezioni persistenti come nel caso di *Schistosoma* spp.
Un ultimo importante avanzamento nella diagnostica parassitologica è rappresentato dalle tecniche di diagnosi basate su metodi di Biologia Molecolare che presentano elevata sensibilità e specificità. Questi metodi hanno tutti in comune il DNA come materiale di partenza: estratto e purificato dal materiale fecale tal quale o da campioni arricchiti o, quando possibile, dal parassita stesso. Il DNA è utilizzato per l'amplificazione di sequenze specifiche di un determinato parassita tramite la tecnologia della *Polymerase Chain Reaction* (PCR) o tecniche derivate come la *Real time* PCR (Rt-PCR). Il prodotto di questa reazione di amplificazione (amplicon) è di per sé diagnostico della presenza di un determinato parassita o di parassiti correlati (es. *Cryptosporidium* spp.), ma può essere ulteriormente analizzato tramite altre tecniche molecolari, quali ad esempio il *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) o il sequenziamento, per determinare con precisione specie e/o sottospecie di un determinato parassita. L'applicazione della PCR è da preferirsi in quei casi in cui si sospetta che la concentrazione del parassita sia molto bassa o in quei campioni mal preservati in cui la morfologia dei parassiti possa essere alterata. La diagnosi molecolare è

particolarmente utile in alcuni casi per distinguere specie patogene da specie non patogene altrimenti non distinguibili morfologicamente (es. *E. histolytica* da *E. dispar*).

3 QUALI PARASSITI RICERCARE

Come sopra ricordato la raccolta dei dati clinici (sintomi e/o dati di laboratorio) e epidemiologici (luogo di provenienza o soggiorno in zone a rischio per specifici parassiti) fornisce elementi fondamentali per il medico curante nel formulare il sospetto diagnostico e per il microbiologo per ottimizzare l'esecuzione dei test parassitologici.

3.1 IL DATO CLINICO

I sintomi causati dai parassiti intestinali possono essere assai diversi. Brevemente:

- **Quadri diarroici** acuti, cronici o ricorrenti, associati o meno a malassorbimento:
  - *G. duodenalis* può causare enteriti acute, croniche o ricorrenti con meteorismo e malassorbimento;
  - *E. histolytica* può manifestarsi con diarrea muco-ematica anche molto intensa e abbondante (dissenteria) oppure con diarrea ricorrente oppure mimare quadri da retto colite ulcerosa o da morbo di Crohn;
  - *B. coli* può causare quadri dissenterici simili a *E. histolytica*.
  - *Cryptosporidium* spp. può causare un'enterite acuta caratterizzata spesso da diarrea acquosa; l'infezione è autolimitante nel soggetto immunocompetente, ma può essere prolungata e debilitante nei pazienti immunodepressi (es. soggetti con AIDS);
  - *C. cayetanensis* può causare enteriti ricorrenti spesso accompagnate da dolori simili ad una colica biliare, con diarrea spesso acquosa;
  - *D. fragilis* può manifestarsi con quadri enteritici acuti o ricorrenti;
  - *E. bieneusi*, *Encephalitozoon* spp. possono causare enteriti soprattutto in pazienti HIV positivi, particolarmente quelli con un avanzato stadio di immunodepressione (CD4 < 100/mm^3);
  - Gli elminti difficilmente causano quadri di enterite con diarrea ad eccezione di infezioni massive da *S. stercoralis*, *H. nana*, *T. trichiura* ecc.
- **Disturbi intestinali aspecifici**: ne sono o possono essere causa più o meno tutti i parassiti.
- **Eosinofilia**: è frequente nelle infezioni elmintiche, ma può essere presente anche nelle infezioni da *C. belli*. Sono segnalati casi di eosinofilia in presenza di *D. fragilis*.
- **Prurito anale**: è tipico delle infezioni da *E. vermicularis*.

Deve essere infine attentamente considerato lo stato di immunocompetenza del paziente nel caso di un'infezioni da *Cryptosporidium* spp., *E. bieneusi*, *Encephalitozoon* spp. o da *S. stercoralis* che possono essere letali in soggetti immunodepressi.

3.2 IL DATO EPIDEMIOLOGICO

Principali parassiti umani diffusi in Italia (patogeni o potenzialmente tali):

Protozoi: *G. duodenalis, D. fragilis, Blastocystis* spp., *E. histolytica/dispar, Cryptosporidium* spp., *C. belli, Sarcocystis* spp., *E. bieneusi, Encephalitozoon* spp., *B. coli*.

I più di sovente ritrovati nella popolazione autoctona sono *D. fragilis, G. duodenalis* e *Blastocistis* spp., meno frequenti *Cryptosporidium* spp. e *E. histolityca* (più comune *E. dispar* non patogena), rari *E. bieneusi* e *Encephalitozoon* spp., quasi del tutto eccezionali *C. belli, Sarcocystis* spp. e *B. coli*.

Elminti: essenzialmente *E. vermicularis, S. stercoralis, A. lumbricoides, T. trichiura, T. saginata, Dibothriocephalus latus, H. nana, H. diminuta, O. felineus, F. hepatica, D. dendriticum, Trichostrongylus* spp.

I più frequentemente ritrovati nella popolazione autoctona sono *E. vermicularis, S. stercoralis* e *T. saginata*, non del tutto infrequenti, *D. latus*, *H. nana*, e *O. felineus*, mentre il reperimento di *A. lumbricoides* e *T. trichiura* è sporadico e ancor più raro quello di *F. hepatica, Trichostrongylus* spp. e *D. dendriticum*.

In Italia *T. solium* è ormai eradicata sia nell'essere umano sia nei suini, mentre ancora incerta è la sua presenza nei suini di certi aree dell'est dell'Unione Europea (UE). Cio nonostante, è importante tener presente che possono presentarsi casi di cisticercosi e di teniasi da *T. solium* importati. Pure *A. duodenale* sembra non essere più presente nella popolazione autoctona.

È utile ricordare che l'elmintiasi più frequente in Italia è quella da *E. vermicularis*, causa principalmente di prurito anale, e che per l'identificazione di tale nematode il test di elezione è lo Scotch test (vedi a pag. 26); la sensibilità dell'esame copro-parassitologico per l'identificazione di *E vermicularis* ha una sensibilità inferiore al 10%.

Parassiti umani diffusi in altre aree del mondo (patogeni o potenzialmente tali)

I parassiti sopra descritti, ancora endemici in Italia o eradicati, come *T.solium*, sono generalmente endemici anche nelle altre aree a clima temperato del pianeta. Nelle aree a clima tropicale o sub-tropicale, in particolare nei Paesi a basso reddito, ma non solo, oltre ai parassiti presenti nelle aree a clima temperato si possono trovare anche:

Protozoi: *C. cayetanensis*.

Elminti: *P. philippinensis, C. hepatica, S. fülleborni, A. duodenale, N. americanus, F. buski, C. sinensis, O. felineus, O. viverrini, H. heterophyes, M. yokogawai, S. mansoni, S. intercalatum, S. japonicum, S. mekongi*.

Questi parassiti non sono ubiquitari, sono diffusi solo o quasi esclusivamente in determinate aree; a titolo di esempio non esaustivo: tra i protozoi *C. cayetanensis* è diffusa in Centro e Sud America e in Nepal; per quanto invece concerne i più frequenti elminti: *P. philippinensis* è diffuso nelle Filippine e in Tailandia, *S. fülleborni* in Africa subsahariana, *F. buski* in Asia e nel subcontinente indiano, *C. sinensis* in Estremo Oriente (incluso Corea, Cina, Taiwan, Vietnam e Russia asiatica orientale), *O. felineus*, oltre in Italia come sopra detto, in Russia, Bielorussia, Ucraina, Kazakistan, *O. viverrini* nella penisola Indocinese, *H. heterophyes* in Egitto, in Medio oriente e Estremo Oriente, *M. yokogawai* in Estremo Oriente, ma anche nei Balcani, Israele e Cisgiordania, Siberia e Manciuria, *S. mansoni* in Africa subsahariana, Brasile, Venezuela, Suriname, Caraibi e sporadicamente nella penisola arabica, *S. intercalatum* in Congo, *S. japonicum* in Cina e nelle Filippine, *S. mekongi* in Cambogia e nel Laos.

Vi sono inoltre numerosi altri elminti intestinali che hanno come ospiti animali, ma che accidentalmente e molto di rado possono infettare l'essere umano il quale può fungere da ospite definitivo ed è quindi possibile ritrovarne le uova nelle feci. Tra questi parassiti si rammentano in particolare:

- Nematodi: *Anatrichosoma* spp., *Oesophagostomum* spp.
- Cestodi: *Bertiella* spp., *Mesocestoides* spp.
- Trematodi: *Gastrodiscoides hominis, Echinostoma* spp.

– Acantocefali: *Macracanthorynchus* spp., *Acanthocephalus* spp., *Pseudoacanthocephalus* spp., *Moniliformis* spp.

Infine si rammenta che nelle feci è possibile trovare uova di elminti non intestinali, in particolare di *Paragonimus* spp. che ha come localizzazione il polmone, ma le cui uova possono risalire fino alla faringe, essere deglutite e di conseguenza trovate nelle feci e di *Schistosoma haematobium* le cui uova si evidenziano generalmente nelle urine, ma che possono essere ritrovate anche nelle feci nei rari casi in cui gli adulti si localizzano nel plesso mesenterico.

FOCUS

L'elmintiasi più frequente in Italia è quella causata da *E. vermicularis*. Il test di elezione è lo Scotch test. La ricerca nelle feci ha una bassissima sensibilità (< 10%).

4 FASE PREANALITICA

4.1 RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Alcuni giorni prima (5-10 gg) e durante il periodo della raccolta delle feci è opportuno non fare uso di lassativi, antidiarroici, antimicrobici, o di altre sostanze interferenti come bario, bismuto, oli minerali.

È inoltre consigliabile seguire un regime dietetico che prevede di evitare legumi, frutti e verdure a cuticola resistente, frutta secca, carote e banane.

Le feci vanno raccolte defecando su una superficie asciutta quale una padella da letto, un sacchetto di plastica, un foglio di carta posto nel bidet o sotto il sedile copri water, in un cestino, una scodella ampia a bocca larga.

Fig. 1. Raccolta delle feci

Le feci non devono essere contaminate con acqua e urina (non raccogliere le feci direttamente dal water) che potrebbero contenere elementi che possono essere confusi con parassiti fecali.

Prelevare porzioni diverse delle feci evacuate e trasferirle in un contenitore pulito di plastica con tappo a tenuta stagna, preferibilmente tappo a vite, senza riempirlo completamente e/o in un flacone contenente un conservante/fissativo (Formalina al 10%, SAF, PVA, MIF o altro). Il fissativo alla formalina è sempre più sostituito da fissativi cosiddetti "ecologici".

Il Laboratorio deve fornire dettagliate istruzioni scritte al medico curante e/o ai pazienti in merito alla corretta raccolta dei campioni biologici.

In Appendice Tecnica è riportato un esempio di istruzioni per la raccolta delle feci in un contenitore senza conservanti/fissativi; ciascun laboratorio deve produrre proprie istruzioni in relazione alle tecniche in uso e all'utilizzo di feci fresche (ovvero senza conservanti) e/o di feci già fissate.

Feci fresche senza conservanti/fissativi

Per poter trovare trofozoiti mobili di amebe, flagellati o ciliati, è necessario esaminare feci fresche, appena o da poco emesse, con un esame microscopico diretto (vedi "Esame microscopico diretto" a pag. 20). I trofozoiti normalmente si trovano nelle feci diarroiche (liquide o soffici/molli o semi formate) e una volta emessi con le feci mantengono la mobilità e la propria tipica morfologia per un breve periodo di tempo. Ne consegue che le feci devono essere esaminate entro un breve lasso di tempo dall'emissione.

Feci liquide o soffici/molli: esaminare entro 30 minuti dall'emissione (non 30 minuti dall'arrivo in laboratorio).
Feci semi formate: esaminare entro 1 ora dall'emissione.
Nel caso non fosse possibile esaminare tempestivamente le feci liquide o semi formate, il campione deve essere posto in un conservante e quindi trasportato al laboratorio. La mobilità andrà persa, ma la morfologia dei trofozoiti rimarrà intatta, così come la morfologia delle uova e larve di elminti, delle cisti di amebe, flagellati e ciliati, delle oocisti di *Cryptosporidium* spp., *C. cayetanensis*, *C. belli* e delle spore dei microsporidi.
I campioni refrigerati o congelati non sono idonei per valutare la mobilità dei trofozoiti.

Le feci formate, che in genere non contengono trofozoiti mobili, devono essere esaminate entro 24 ore dall'emissione o al massimo entro 48 ore se conservate a a 4-8° C; se non è possibile, anche in questo caso, porre le feci in un conservante.

Le feci fresche permettono di eseguire tutte le tecniche diagnostiche dirette (vedi "Tecniche Diagnostiche Dirette" a pag. 20) e sono indispensabili per la ricerca di *D. fragilis* con le colorazioni di Giemsa o Tricromica, per la ricerca delle larve di *S. stercoralis*, di *Ancylostoma/Necator* spp. e di *Trichostrongylus* spp. con le tecniche di Baerman o di Harada-Mori e con la coltura in agar, per i test immunologici fecali relativi a *E. histolytica/dispar* o *E. histolytica* "sensu stricto" e per la coltura delle amebe.
Infine, si deve tener presente che le feci fresche sono il campione validato per le tecniche molecolari (vedi "Biologia Molecolare" a pag. 31).

4.2 CONSERVANTI/FISSATIVI

Diversi conservanti/fissativi sotto elencati contengono formalina o mercurio. Per tutto quel che concerne la sicurezza in laboratorio (uso dei dispositivi di protezione individuali, uso della cappa chimica ecc.) e l'utilizzo, o il divieto di utilizzo, di sostanze pericolose o tossiche o nocive e lo smaltimento di queste come rifiuti speciali, si rimanda alla normativa vigente europea, nazionale, regionale e alle eventuali raccomandazioni/linee guida locali.

Tutti i conservanti/fissativi devono essere miscelati con il campione secondo il rapporto di tre parti di fissativo e una parte di feci. Lasciare agire il fissativo per almeno 30 minuti prima di eseguire qualsiasi test. Il campione fissato può essere conservato a temperatura ambiente.

Formalina al 5% o al 10%

La formaldeide è di norma commercializzata come soluzione acquosa al 37% di formaldeide gassosa. Tale soluzione è denominata formalina o formolo. Le concentrazioni al 5% o 10% fanno riferimento alla soluzione acquosa al 37%.
In parassitologia viene utilizzata la formalina tamponata con tamponi di fosfato di sodio che mantiene meglio sia la morfologia delle uova e larve di elminti, sia quella delle cisti e oocisti di protozoi.
La diluizione al 5% è raccomandata per la conservazione dei protozoi mentre quella al 10% è raccomandata per uova e larve di elminti.
È indispensabile che la diluizione finale al 5% o al 10% sia effettuata con acqua e non con soluzione fisiologica. La seconda è significativamente meno efficiente nel recupero dei parassiti con la concentrazione con Formolo-Etil Acetato (FEA).
La formalina al 5% è spesso proposta sia per i protozoi che per gli elminti, ma per motivi di sicurezza la maggior parte dei produttori commercializza la diluizione al 10%, che è più probabile

che uccida tutte le uova di elminti e che comunque mantiene bene la morfologia anche delle cisti dei protozoi mentre la morfologia dei trofozoiti non è così ben conservata.
Dal campione conservato in formalina non è possibile eseguire le colorazioni Tricromica o con Ematossilina ferrica per i trofozoiti e le cisti di amebe e flagellati e la colorazione di Giemsa per i trofozoiti di *D. fragilis*, mentre dopo la concentrazione è possibile effettuare le colorazioni acido-resistenti per *Cryptosporidium* spp., *C. cayetanensis*, *C. belli* e la colorazione Tricromica modificata per i microsporidi.
È possibile anche eseguire i test immunocromatografici (vedi "Test immunologici" a pag. 29) per la ricerca di antigeni di *G. duodenalis* e *Cryptosporidium* spp.; al contrario il campione conservato in formalina non è campione idoneo per i test immunologici che ricercano *E. histolytica/dispar* o *E. histolytica* "sensu stricto".
Inoltre non è campione idoneo per i test in cui gli organismi devono essere vitali (tecniche di Baermann o di Harada-Mori e colture) e per i test di biologia molecolare.

Sodio Acetato-Acido Acetico-Formalina (SAF)

Questo fissativo contiene una minor percentuale di formalina (4%) e ha le stesse indicazioni e controindicazioni della formalina al 10% con l'importante differenza che con il SAF è possibile eseguire la colorazione con Ematossilina ferrica partendo dal sedimento della centrifugazione (vedi "Colorazioni permanenti" a pag. 24). È possibile eseguire anche la colorazione Tricromica, ma i risultati non piuttosto scarsi.

Mertiolato® (Thimerosal) Iodio Formalina (MIF)

Questo fissativo, in origine progettato per indagini sul campo, contiene iodio che colora i microrganismi. Permette l'esecuzione dell'esame diretto e dopo concentrazione. Sebbene sia possibile effettuare la colorazione permanente con Ematossilina ferrica (non la colorazione Tricromica) i dettagli morfologici di molti protozoi, in particolare dei trofozoiti, non sono molto nitidi. Lo iodio interferisce con la fluorescenza e quindi MIF non può essere utilizzato per il test di fluorescenza diretta *Giardia/Criptosporidium* e per la colorazione con Auramina per *Cryptosporidium* spp.

Fissativo di Schaudinn

Questo fissativo viene principalmente utilizzato per l'allestimento di preparati da campioni di feci fresche, ma anche da campioni prelevati dalla superficie della mucosa intestinale (sigmoidoscopia), che vengono poi colorati con Ematossilina ferrica o con la colorazione Tricromica (vedi "Colorazioni permanenti" a pag. 24). Con feci molto liquide i risultati non sono ottimali. Il fissativo di Schaudinn è a base di Cloruro mercurico.

Alcool polivinilico (PVA)

Il PVA è una resina plastica combinata con il fissativo di Schaudinn. Il PVA funge da adesivo che aiuta a "incollare" sul vetrino, mentre la fissazione è realizzata dal fissativo di Schaudinn.
IL PVA con fissativo di Schaudinn è il migliore conservante ("gold standard") per le colorazioni Tricromica e con Ematossilina ferrica. La presenza del collante permette di ottenere buoni preparati anche con feci liquide.
A causa dei problemi legati allo smaltimento del mercurio, sono state messe a punto formulazioni nelle quali il Cloruro mercurico, contenuto nel fissativo di Schaudinn, è stato sostituito dal Solfato di rame (Cu-PVA) o dal Solfato di zinco (Zn-PVA). Con queste formulazioni la qualità dei preparati è inferiore, ma quello che più si avvicina a PVA con Cloruro mercurico è Zn-PVA.

Sebbene sia possibile preparare una concentrazione dal materiale fissato in PVA, i risultati sono di scarsa qualità; è preferibile effettuarla partendo da feci conservate in Formalina al 10%, in SAF o in un conservante "ecologico" del commercio (vedi oltre).

Fissativi *One-Vial*/*Single-Vial* (AlcorFix™, Apafix™, EcoFix®, Para-Pak®SVT, UniFix®, Total-Fix®, Proto-Fix®, Parasafe e altri)

Questi fissativi sono stati concepiti per ovviare ai problemi inerenti all'uso e allo smaltimento della formalina e, soprattutto, del mercurio e per disporre di un conservante che permettesse l'esecuzione di tutte o quasi le principali tecniche parassitologiche, partendo da un unico flacone. Da qui la generica denominazione di *One-Vial*/*Single-Vial* Fixatives oppure, per l'assenza di formalina e mercurio, la non del tutto propria denominazione di "Fissativi ecologici". Praticamente tutti questi conservanti non contengono neanche PVA.

È possibile eseguire le concentrazioni, le colorazioni permanenti per i trofozoiti e le cisti di amebe e flagellati (alcuni *One-Vial* devono utilizzare specifiche colorazioni), colorazioni per microsporidi, colorazioni acido-resistenti per *Cryptosporidium* spp., *C. cayetanensis*, *C. belli*, test immunologici per *G. duodenalis* e *Cryptosporidium* spp.

Come già detto per i test immunologici che ricercano *E. histolytica/dispar* o *E. histolytica* "sensu stricto" sono necessarie feci fresche, quindi i fissativi *One-Vial* non sono idonei.

Per l'uso di alcuni *One-Vial* per le ricerche in biologia molecolare (Fissativi Universali) vedi "Biologia Molecolare" a pag. 31.

In tutti i casi è necessario rispettare le istruzioni che accompagnano i vari prodotti in particolare per le finalità dell'uso e le procedure.

In tabella 1 sono riportati i vantaggi e gli svantaggi dei vari conservanti/fissativi.

FOCUS

Ogni laboratorio, in base alle ricerche che esegue, alle risorse a disposizione e alla normativa concernente la sicurezza, deve decidere se accettare feci fresche e/o già fissate e quali e quanti fissativi utilizzare.

È indispensabile fornire istruzioni scritte per la raccolta e il trasporto dei campioni.

Tabella 1. Principali fissativi per la parassitologia fecale

Conservante/Fissativo	Vantaggi	Svantaggi
Formalina al 10%	• Buona conservazione della morfologia di uova e larve di elminti, delle cisti di protozoi, delle oocisti dei coccidi e delle microspore dei microsporidi. • Adatto per le tecniche di concentrazione. • Adatto per le colorazioni alcool-acido resistenti. • Compatibile con i test immunologici (EIA, FA, Immunocromatografici) per *G. duodenalis* e *Cryptosporidium* spp.	• Non ottimale conservazione dei trofozoiti di protozoi. • Non adatto per le colorazioni permanenti (Tricromica, Ematossilina ferrica). • Non adatto per la colorazione di Giemsa per *D. fragilis*. • Non adatto per le tecniche molecolari (PCR). • Non compatibile con i test immunologici per *E. histolytica* e/o *E. histolitica/dispar*.
SAF (Sodio Acetato-Acido Acetico-Formalina)	• Buona conservazione della morfologia di uova e larve di elminti, delle cisti di protozoi, delle oocisti dei coccidi e delle microspore dei microsporidi. • Adatto per le tecniche di concentrazione. • Adatto per le colorazioni alcoo-acido resistenti. • Adatto per la colorazione con Ematossilina ferrica. • Compatibile con i test immunologici per *G. duodenalis* e *Cryptosporidium* spp.	• Non ottimale conservazione dei trofozoiti di protozoi. • Inadeguata colorazione Tricromica. • Non adatto per la colorazione di Giemsa per *D. fragilis*. • Non adatto per le tecniche molecolari (PCR). • Non compatibile con i test immunologici per *E. histolytica* e/o *E. histolitica/dispar*.
MIF (Mertiolato-Iodio-Formalina)	• Fissa e contemporaneamente colora gli organismi. • Utile per programmi di sorveglianza sul campo. • Adatto per le tecniche di concentrazione.	• Lo iodio può causare distorsione della morfologia dei protozoi. • La colorazione con lo iodio interferisce con tutte le altre colorazioni. • Non adatto per la colorazione Tricromica. • Non adatto per la colorazione di Giemsa per *D. fragilis*. • Inadeguata colorazione con Ematossilina ferrica. • Mancano dati di letteratura riguardo l'adeguatezza per i test immunologici. • Non adatto per le tecniche molecolari (PCR).
Fissativo di Schaudinn	• Ottima conservazione della morfologia dei trofozoiti e delle cisti dei protozoi. • Facile preparazione dei vetrini per colorazioni permanenti.	• Contiene Cloruro mercurico. • Inadeguata conservazione della morfologia delle uova e larve di elminti, delle oocisti dei coccidi e delle spore di microsporidi. • Scarsa adesione sui vetrini dei campioni di feci liquide o mucose.
ZN-PVA (Alcool polivinilico con Solfato di Zinco)	• Non contiene cloruro mercurico. • Buona conservazione della morfologia dei trofozoiti e delle cisti dei protozoi. • Adatto per le colorazioni permanenti (Tricromica, Ematossilina ferrica). • Buona adesione sui vetrini anche dei campioni di feci liquide o mucose.	• Inadeguata conservazione della morfologia delle uova e larve di elminti dei coccidi e dei microsporidi. • Non adatto per le tecniche di concentrazione. • Non adatto per i test immunologici. • Non adatto per le colorazioni alcool-acido resistenti. • Non adatto per le tecniche molecolari (PCR).
Fissativi *One-Vial* (AlcorFix™, Apafix™, EcoFix®, Para-Pak® SVT, UniFix®, Total-Fix®, Proto-Fix®, Parasafe e altri)	• Non contengono formalina e cloruro mercurico. • La concentrazione e le colorazioni permanenti per amebe e flagellati, per coccidi e per microsporidi possono essere fatte partendo da un unico flacone. • La maggior parte è compatibile con i test immunologici per *G. duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. • Alcuni fissativi *One-Vial* sono compatibili con le tecniche molecolari (Fissativi Universali).	• Alcuni fissativi *One-Vial* sono compatibili solo con specifiche colorazioni. • Colorazioni non sempre costanti. • Non compatibili con i test immunologici per *E. histolytica* e/o *E. histolitica/dispar*.

4.3 NUMERO DI CAMPIONI DA ESAMINARE

Per poter escludere una parassitosi intestinale è consigliabile esaminare più campioni fecali.

Nelle feci la quantità di molti organismi, in particolare i protozoi intestinali, non è sempre elevata, inoltre le quantità di trofozoiti e cisti eliminate possono variare su base giornaliera.

Tradizionalmente si indica di raccogliere almeno tre campioni in giorni successivi o alterni, ma non nello stesso giorno.

La probabilità di rilevare parassiti clinicamente rilevanti in un singolo campione può andare dal 50 al 60%, ma sale al 95% se vengono esaminati microscopicamente 3 campioni.

Secondo alcuni studi affiancando alla microscopia i test immunologici per *G. duodenalis*, *Cryptosporidium* spp. e *E. histolitica* o *E. histolytica/dispar* sono sufficienti 2 campioni per raggiungere una sensibilità diagnostica del 90%.

Ciò di cui il Microbiologo deve essere conscio e che deve rendere noto al medico curante è che l'esame di un unico campione analizzato con le tecniche tradizionali ha una sensibilità analitica molto bassa.

Con l'introduzione negli ultimi anni dei test di biologia molecolare per diversi protozoi patogeni, è stato proposto un approccio diagnostico che prevede di esaminare un unico campione suddiviso in due flaconi (*Dual Fecal Test*), il primo senza conservanti (feci fresche) per l'esecuzione dei test molecolari e il secondo con un conservante, come Formalina 10%, SAF o altro, per la concentrazione.

In tabella 2 sono riportate i tipi di analisi e gli organismi ricercati con il *Dual Fecal Test*.

Fig. 2. Dual Fecal Test

One day collection kit
(two tubes)
Da: Tom van Gool e Aldett Bart
ESCMID Barcellona 2014

Tabella 2. Analisi e organismi ricercati come proposto da van Gool e Bart (modificata)

Biologia Molecolare (PCR)	Microscopia dopo concentrazione		
Protozoi patogeni	Protozoi patogeni	Protozoi non patogeni	Elminti
Entamoeba histolytica "sensu stricto"	*Cystoisospora belli*	*Entamoeba dispar*	Nematodi
Giardia duodenalis	*Balantidium coli*	*Entamoeba coli*	Cestodi
Cryptosporidium spp.	Microsporidi(*)	*Entamoeba hartmanni*	Trematodi
Dientamoeba fragilis		*Iodamoeba bütschlii*	Acantocefali
Blastocystis spp.		*Chilomastix mesnili*	
Cyclospora cayetanensis		*Sarcocystis hominis*	

È evidente che man mano che verranno sviluppati nuovi test in PCR per gli altri protozoi patogeni e per gli elminti la colonna di "Biologia Molecolare (PCR)" sarà sempre più lunga.

(*) Allo stato esiste un unico kit commerciale per biologia molecolare dei microsporidi (vedi a pag. 34)

FOCUS

Con le tecniche tradizionali devono essere esaminati almeno tre campioni raccolti in giorni successivi o a giorni alternati. L'esame microscopico di un solo campione ha una sensibilità analitica molto bassa (50-60%).

5 ESAME COPRO-PARASSITOLOGICO

Con il generico termine di "Esame copro-parassitologico" si intende l'insieme delle tecniche che si utilizzano per ricercare i parassiti intestinali in campioni di feci.

Solitamente la ricerca dei parassiti è effettuata mediante esami microscopici, ma in alcuni casi è utile e/o necessario ricercare direttamente nelle feci gli antigeni specifici (*E. histolytica/dispar*, *E. histolytica* "sensu stricto", *G. duodenalis*, *Cryptosporidium* spp.) oppure allestire un esame colturale (*E. histolytica*, *S. stercoralis*) o anche ricercare i parassiti con una PCR (alcuni protozoi patogeni, alcuni elminti).

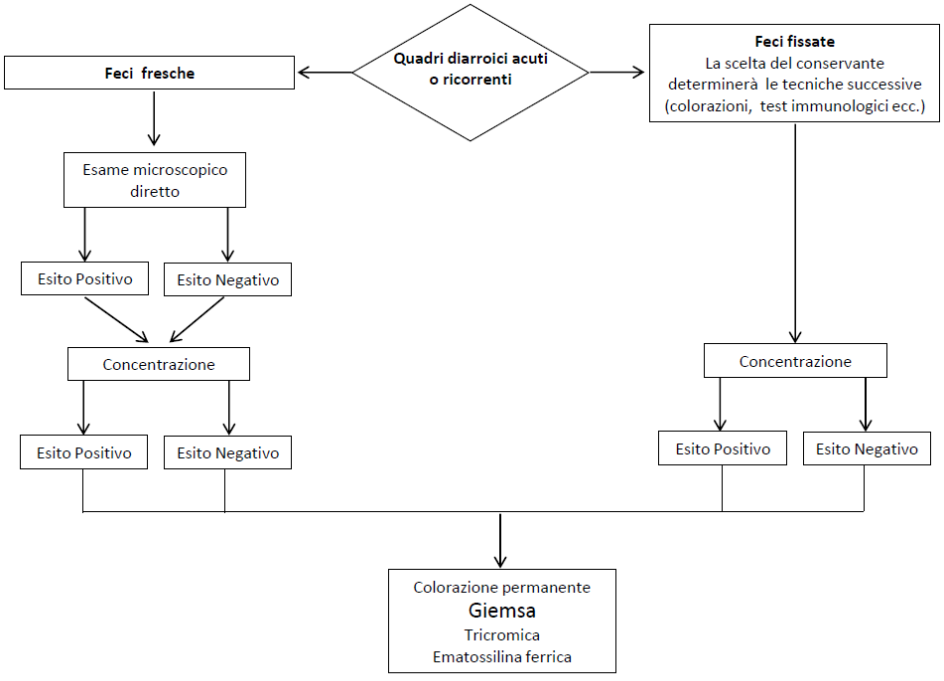
Certe tecniche sono in grado di evidenziare sia protozoi che elminti, altre sono adatte alla ricerca di un solo gruppo di parassiti o di una singola specie.

A fronte di una richiesta generica di ricerca parassiti nelle feci, occorre effettuare un esame copro-parassitologico che permetta di ricercare la maggior parte dei trofozoiti, cisti ed oocisti di protozoi e delle uova e larve di elminti.

5.1 ESAME COPRO-PARASSITOLOGICO STANDARD (O&P)

Un "Esame copro-parassitologico standard", quello che gli autori anglosassoni denominano come "O&P" (*Ova and Parasites*), deve consistere almeno in un esame microscopico diretto, un esame microscopico dopo concentrazione ed una colorazione permanente. In figura 3 è presentato un algoritmo per l'esame copro-parassitologico standard.

Figura 3. Algoritmo per l'Esame copro-parassitologico standard.



Da: L.S Garcia. *Diagnostic Medical Parasitology* . 2016 (modificata)

Il laboratorio che vuole cimentarsi nella diagnostica delle parassitosi intestinali deve essere in grado di eseguire almeno l'esame copro-parassitologico standard e lo Scotch test (test di Graham o *Cellophane tape test* per gli anglosassoni) per la ricerca di *E. vermicularis.*

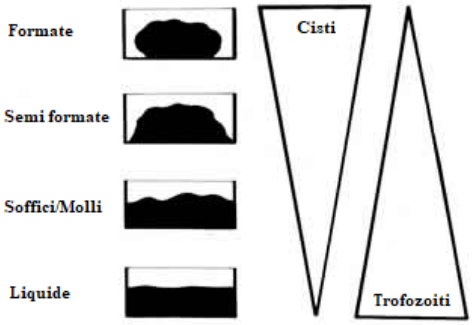
Il laboratorio deve anche essere consapevole dei vantaggi e dei limiti delle tecniche utilizzate per eseguire l'esame copro-parassitologico standard e lo Scotch test. Queste tecniche fondamentali permettono di effettuare una buona diagnostica di base, ma non sono sufficienti per evidenziare alcuni parassiti intestinali per i quali occorrono tecniche specifiche che lo specialista microbiologo deciderà ed effettuerà sulla base delle informazioni cliniche ed epidemiologiche.

6 TECNICHE DIAGNOSTICHE DIRETTE

6.1 ESAME MACROSCOPICO

Per ogni campione di feci fresche deve essere notata la consistenza (feci liquide, soffici/molli, semi formate, formate) e la eventuale presenza di muco e/o sangue.

Fig. 4. Consistenza delle feci: Cisti e Trofozoiti



Da: CDC *Stool Specimen Collection* (modificata)

Queste caratteristiche aiutano nell'indirizzare le ricerche microscopiche. I trofozoiti di amebe, flagellati e ciliati si trovano più frequentemente nei campioni liquidi; nei campioni soffici/molli possono essere visualizzati sia trofozoiti che cisti; nei campioni di feci semi formate e formate possono esservi cisti, ma raramente sono presenti trofozoiti.

Fanno eccezione *Cryptosporidium* spp. e gli altri coccidi per i quali si riscontrano solamente le oocisti a prescindere dalla consistenza delle feci.

La presenza nelle feci di muco e sangue è suggestiva per una amebiasi, mentre è eccezionale che sangue sia presente in un'infezione da *G. duodenalis*.

Inoltre, tutti i campioni (sia feci fresche, sia feci in conservanti) devono essere esaminati macroscopicamente perché possono contenere vermi adulti o parti di essi (*E. vermicularis*, *A. lumbricoides*, proglottidi di *Taenia* spp.) che devono essere recuperati ed identificati (vedi "Identificazione macroscopica" a pag. 40).

Fig. 5. Esame macroscopico: vermi o parti di essi riscontrabili nelle feci

E. vermicularis maschio (in alto)
femmina (in basso)

Proglottidi di *T. saginata*

A. lumbricoides femmina

Da: CDC-DPDx (modificate)

6.2 ESAME MICROSCOPICO DIRETTO

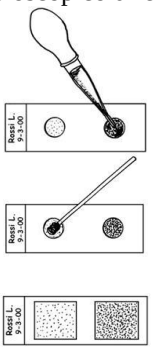
Pur essendo una tecnica poco sensibile questo tipo di preparazione è consigliata se si esaminano feci fresche, soprattutto se liquide o soffici/molli, principalmente per rilevare la mobilità di trofozoiti e di larve di nematodi.

L'esame diretto consente di evidenziare anche cisti di protozoi, oocisti di *Cyclospora* e *Cystoisospora* (assai più difficile rilevare oocisti di *Cryptosporidium*) e uova di elminti.

Inoltre è possibile mettere in evidenza anche globuli rossi, leucociti, cristalli di Charcot-Leyden, elementi che possono essere utili a indirizzare la diagnosi.

Il vetrino si prepara diluendo una piccola quantità di feci in una o due gocce di soluzione fisiologica e quindi esaminando la sospensione sotto un vetrino coprioggetto da 22 x 22 o 24 x 24 mm o anche di dimensioni maggiori.

Fig. 6. Esame microscopico diretto



È possibile anche allestire un'ulteriore sospensione in una goccia di soluzione iodata, Dobell o Lugol 1:5, che permette di meglio evidenziare le strutture interne delle cisti (nuclei, corpi cromatoidi ecc.).
Anche per i campioni conservati in formalina o altri fissativi è possibile eseguire l'esame microscopico diretto, ma di norma non è ritenuto necessario in quanto in questi campioni la mobilità viene meno.

6.3. CONCENTRAZIONI

Nella routine di laboratorio vi sono essenzialmente due tecniche di concentrazione fecale: Sedimentazione con Formolo-Etil Acetato (FEA) e Flottazione.
Entrambe possono essere eseguite a partire sia da feci fresche che da feci conservate in qualunque tipo di fissativo con l'eccezione di PVA, Zn-PVA, Cu-PVA per i quali tali tecniche sono sconsigliabili.
Il Comitato per lo Studio della Parassitologia dell'AMCLI (CoSP) raccomanda la Sedimentazione con FEA in quanto è la più facile da eseguire, la meno soggetta ad errori tecnici e consente il recupero della più ampia gamma di parassiti.
Questa scelta deriva dalle indicazioni di numerosi organismi internazionali: Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), National Health Service of England (NHS), American Society for Microbiology (ASM), Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

6.3.1 SEDIMENTAZIONE CON FORMOLO-ETIL ACETATO

Nel 1948 Lawrence Ritchie mise a punto una metodica di concentrazione che prevedeva la diluizione delle feci in soluzione fisiologica e la filtrazione attraverso due strati di garza inumidita seguite da ripetuti lavaggi per centrifugazione e risospensione del sedimento. Nell'ultima fase il sedimento veniva risospeso in formalina al 10% con l'aggiunta di etere etilico come solvente dei grassi. Dopo la centrifugazione si ottenevano nella provetta quattro strati: etere, detriti fecali leggeri, formalina, sedimento contenente materiale organico e strutture parassitarie.

Nel 1953 Maldonado e Acosta-Matienzo proposero di aggiungere un detergente neutro (Triton X-100). L'effetto tensioattivo del Triton, favorendo l'emulsione delle molecole di grasso, permetteva di ottenere un sedimento meno denso e di diminuire l'adesione dei parassiti ai detriti, consentendo così una più facile identificazione delle strutture parassitarie.
Nel 1956 Ridley e poi nel 1970 Allen e Ridley inserirono ulteriori modifiche per semplificare la metodica di Ritchie usando come fissativo la formalina al 10% diluita in acqua, migliorando la filtrazione con l'utilizzo di filtri con pori da 425 µm, eliminando i ripetuti lavaggi e proponendo una velocità di centrifugazione di 3.000 rpm per 1 minuto.

A causa del rischio di alta infiammabilità e di esplosione da parte dell'etere etilico, nel 1978 Young *et al*. raccomandarono di sostituire questo prodotto con acetato di etile. Con tale solvente non vi era nessuna distorsione o alterazione della morfologia dei parassiti e l'efficienza nel recuperare le forme parassitarie pareva migliore che con l'etere etilico.
Sostanzialmente, sia pur con varie piccole modifiche, è quest'ultima procedura quella tuttora utilizzata e comunemente conosciuta come concentrazione di Ritchie o di Ridley o di Ridley-Allen.
In "Appendice Tecnica" è presentata una procedura per la Sedimentazione con FEA.

Di frequente per la concentrazione vengono utilizzati dispositivi commerciali; si rammenta che questi devono essere validati prima dell'uso e che è necessario seguire le istruzioni dei produttori.
Per massimizzare il recupero dei parassiti quattro sono i punti chiave che vanno tenuti presenti: la filtrazione dei campioni, l'uso di un solvente per i grassi, la forza centrifuga applicata e il tempo di centrifugazione.
Pori del filtro troppo grandi permettono un buon passaggio delle forme diagnostiche dei parassiti, ma anche dei detriti causando difficoltà per la lettura, con possibile mascheramento delle uova, dei trofozoiti, delle cisti e delle oocisti.
Di contro con pori troppo piccoli si avrà un preparato pulito, ma si rischia di avere un passaggio inferiore di parassiti.
I sistemi commerciali hanno filtri diversi con grandezza dei pori diversa, con un *range* che va da 350 µm a 1.500 µm.
Dall'unico studio che, a nostra conoscenza, ha confrontato la dimensione dei pori per il filtraggio delle feci risulta che la grandezza ideale rimane quella indicata da Allen e Ridley (425 µm).
Il medesimo studio ha confrontato sistemi che utilizzano un detergente e un solvente per grassi (Triton X-100 + Etil acetato) con kit che non li utilizzano dimostrando che il recupero di parassiti è significativamente ridotto se non si usa il detergente ed il solvente.
Inoltre dal confronto di velocità di centrifugazione diverse, da 500 rpm (34 g) a 3.500 rpm (1.650 g) e diversi tempi di centrifugazione, da 1 a 10 minuti, risulta che un giusto equilibrio tra velocità, tempo e numero di parassiti recuperati si ha centrifugando a 3.000 rpm (1.200 g) per 3 minuti.
Tempi e velocità maggiori possono permettere di recuperare una quantità lievemente maggiore di parassiti, ma aumentano anche la quantità di detriti fecali nel sedimento rendendo più difficile la lettura del preparato.
In conclusione:

- Filtrare con un filtro con pori da 425 µm (circa 0,5 mm).
- Utilizzare un detergente e un solvente per grassi (Triton X-100 + Etil acetato).
- Centrifugare a 3.000 rpm (1.200 g) per 3 minuti.

Come già detto questo tipo di concentrazione, quando correttamente eseguita, permette di evidenziare un'ampia gamma di elementi parassitari, trofozoiti, cisti, oocisti di protozoi e uova di elminti, ma a causa di una dimostrata scarsissima sensibilità non è raccomandata per la ricerca di larve di *S. stercoralis*, per la quale ci si deve avvalere di altri metodi (vedi "Tecniche per la ricerca di Strongyloides spp. e altri Nematodi" a pag. 28).

Esame microscopico del sedimento

A partire dal sedimento della centrifugazione, miscelato con 2-3 gocce di soluzione fisiologica, si allestiscono due preparati come per l'esame microscopico diretto.
Con l'esame microscopico del sedimento non è possibile mettere in evidenza i trofozoiti di *D. fragilis*, le oocisti di *Cryptosporidium* spp. e i Microsporidi. Per la ricerca di questi microrganismi vedi paragrafo "Colorazioni permanenti" a pag. 24.

6.3.2 FLOTTAZIONE

La tecnica di flottazione permette la separazione dei parassiti dai detriti organici più grossolani usando una soluzione di flottazione con un elevato peso specifico.

Le cisti, le oocisti e le uova che hanno un peso specifico minore di quello della soluzione di flottazione, dopo la centrifugazione, saliranno alla sommità della provetta contenente la soluzione, mentre i detriti fecali con peso specifico maggiore si troveranno nel sedimento sul fondo.
Le soluzioni di flottazione più usate sono: soluzione satura al cloruro di sodio (peso specifico 1,20 a 20° C) e soluzione allo zinco solfato (peso specifico 1,20 oppure 1,35).

Questa tecnica produce un materiale più pulito rispetto alla tecnica di sedimentazione, ma ha lo svantaggio che diverse uova di elminti (uova opercolate e uova non fertili di *Ascaris*) data l'elevato peso specifico non flottano e si troveranno al fondo della provetta tra i detriti fecali, pertanto si dovrà esaminare sia la parte superficiale sia il sedimento.
Per poter far flottare anche queste uova sarebbe necessaria una soluzione contenente Iodio-Mercurato di Potassio con peso specifico 1,44-1,45, ma a causa della presenza di mercurio questa soluzione non viene generalmente utilizzata nei laboratori di microbiologia umana.
Il preparato deve essere esaminato entro 15-20 minuti dalla centrifugazione finale; oltre questo lasso di tempo, gli elementi parassitari iniziano a distorcersi e a disintegrarsi.

In "Appendice Tecnica" è presentata una procedura per la Flottazione.

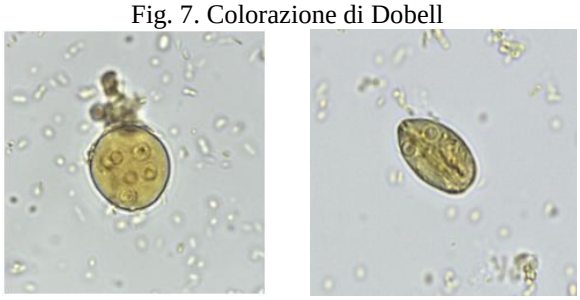
In commercio vi sono kit per la flottazione (Mini-FLOTAC, McMaster test kit) che permettono anche di quantificare il numero di elementi parassitari per grammo di feci. Primariamente studiati per la parassitologia veterinaria, sono utilizzabili anche per la parassitologia umana.

6.4 COLORAZIONI ESTEMPORANEE

SOLUZIONI DI DOBELL O LUGOL 1:5

La soluzione di Dobell o Lugol 1:5, a volte denominata in inglese come *double-strength Lugol's iodine*, contiene l'1% di iodio e non va confusa con la soluzione di Lugol utilizzata per la colorazione di Gram (*Gram's iodine*) che contiene lo 0,33-0,5% di iodio. Il Lugol per Gram non è raccomandato; NON usare.
Alcuni autori utilizzano la soluzione di D'Antoni che ha una concentrazione di iodio pari all'1,5%.
Vengono usate per i preparati "a fresco" sia nell'esame diretto che in quello dopo concentrazione per evidenziare le strutture interne delle cisti, ma anche dei trofozoiti, di flagellati e amebe.
A una goccia di campione posta su un vetrino portaoggetto si aggiunge una goccia di soluzione iodata, si copre con un vetrino coprioggetto da 22 x 22 o 24 x 24 mm o anche di maggiori dimensioni, si fa agire il colorante per circa 30 secondi e poi si legge al microscopio.
La soluzione di Dobell è reperibile in commercio, ma è anche facilmente preparabile in laboratorio (vedi "Appendice Tecnica").

Fig. 7. Colorazione di Dobell



Colorazione con soluzione di Dobell: cisti di *E. coli* (600x) e cisti di *G. duodenalis* (1.000x)

FOCUS

La soluzione a base di iodio serve per evidenziare le strutture interne delle cisti, ma anche dei trofozoiti, di flagellati e amebe nell'esame microscopico sia diretto, sia dopo concentrazione.

6.5 COLORAZIONI PERMANENTI

Le colorazioni permanenti sono il terzo elemento dell'esame copro-parassitologico standard (esame microscopico diretto, esame microscopico dopo concentrazione, colorazione permanente).

Permettono di ritrovare e identificare trofozoiti e cisti di amebe e flagellati, ma non sono indicate per la ricerca e l'identificazione delle uova e larve di elminti e dei trofozoiti e cisti dei protozoi ciliati (*B. coli*).

In tabella 3 a pag. 27 sono riportate le indicazioni e i limiti delle colorazioni permanenti per le amebe e i flagellati.

6.5.1 COLORAZIONE TRICROMICA DI WHEATLEY

È una modifica dell'originale colorazione istologica di Gomori.

I campioni migliori per questa colorazione sono le feci fresche immediatamente fissate con fissativo di Schaudinn o le feci conservate in PVA; è possibile effettuare la colorazione tricromica anche a partire dai fissativi "Ecologici" *One-Vial* (per alcuni si devono utilizzare specifiche colorazioni dedicate).

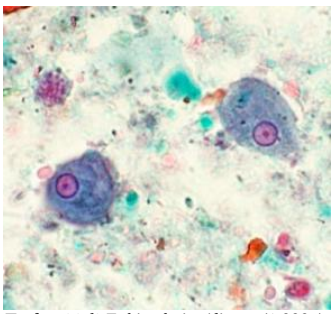
Non è indicata con feci conservate in formalina, SAF e MIF in quanto i risultati con questi fissativi sono molto scarsi.

La colorazione è laboriosa, ma non di difficile esecuzione e consente il rilevamento e l'identificazione di trofozoiti e cisti di amebe e flagellati grazie all'elevata definizione dei particolari dei nuclei.

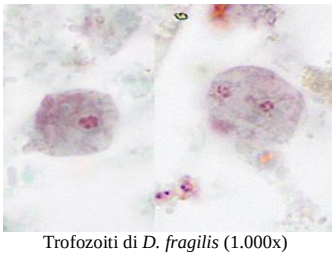
Il contrasto di colore (variazioni di rosso, blu, viola e verde) con la colorazione tricromica è più netto rispetto alla colorazione con Ematossilina ferrica.

I reagenti per la colorazione Tricromica di Wheatley sono reperibili in commercio.

Fig. 8. Colorazione Tricromica



Trofozoiti di *E. histolytica/dispar* (1.000x)

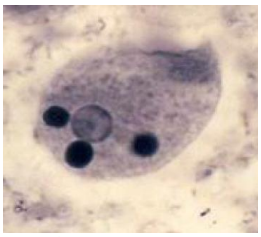


Trofozoiti di *D. fragilis* (1.000x)
Da: CDC (modificata)

6.5.2 COLORAZIONE CON EMATOSSILINA FERRICA

Vi sono molte modifiche della colorazione con Ematossilina ferrica, le due più comunemente utilizzate sono le procedure di Spencer-Monroe e di Tompkins-Miller.

Fig. 9. Colorazione Ematossilina ferrica



Trofozoita di *E. histolytica* (1.000x)
Da: Petithory JC *et al. Amibes et Flagellés Intestinaux*

Anche per questa colorazione i campioni migliori sono le feci fresche immediatamente fissate con fissativo di Schaudinn o le feci conservate in PVA, ma a differenza che con la tricromica si ottengono buoni risultati anche a partire da campioni conservati in SAF, mentre con feci conservate in formalina o in MIF i risultati sono del tutto insoddisfacenti.

È possibile effettuare la colorazione con Ematossilina ferrica anche a partire dai fissativi "Ecologici" *One-Vial*.

Pur senza la gamma di contrasti di colore della tricromica anche questa colorazione è ottima per l'identificazione dei trofozoiti e delle cisti di amebe e flagellati.

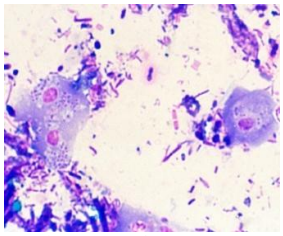
6.5.3 COLORAZIONE DI GIEMSA

È una colorazione molto semplice da eseguire, in tutto simile alla colorazione utilizzata per i Plasmodi.

Per la colorazione di Giemsa sono necessarie feci fresche; le feci conservante in qualunque fissativo non sono idonee.

È indicata per la diagnosi microscopica di *D. fragilis.* Possono essere facilmente identificate anche *Blastocystis* spp. e *G. duodenalis*, ma per questi due protozoi la tecnica microscopica d'elezione è la ricerca dopo concentrazione.

Fig. 10. Colorazione di Giemsa



Trofozoiti di *D. fragilis* (1.000x)

Pur non raggiungendo la nitidezza dei dettagli della colorazione tricromica, permette comunque di effettuare una diagnosi di infezione da *Dientamoeba* molto accurata.

Dal momento che *D. fragilis*, con *Blastocystis* spp., è il protozoo intestinale più diffuso in Italia e che, come detto, questa colorazione è molto facile da eseguire, il Comitato per lo Studio della Parassitologia dell'AMCLI (CoSP) raccomanda, come colorazione permanente, la colorazione di Giemsa.

Questa scelta è stata effettuata anche in base alle indicazioni del National Health Service of England (NHS).

FOCUS

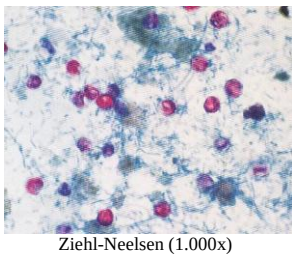
Con le tecniche tradizionali, per identificare *D. fragilis* è necessario eseguire una colorazione permanente. Il Comitato per lo Studio della Parassitologia dell'AMCLI (CoSP) raccomanda la colorazione di Giemsa.

6.6 COLORAZIONI PER I COCCIDI

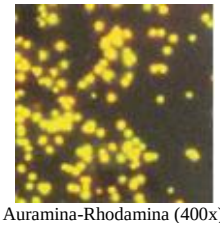
Queste colorazioni sono particolarmente utili per la ricerca di *Cryptosporidium* spp., meno per *C. cayetanensis* e *C. belli* che possono essere più facilmente trovate e identificate all'esame microscopico diretto o dopo concentrazione.

La parete cellulare di *Cryptosporidium* spp., *C. cayetanensis* e *C. belli* contiene lipidi acido-resistenti, ciò permette l'uso di colorazioni alcool-acido resistenti per la ricerca di questi protozoi.

Fig. 11. Oocisti di *Cryptosporidium* spp.



Ziehl-Neelsen (1.000x)



Auramina-Rhodamina (400x)

Il campione migliore per le colorazioni dei coccidi è il sedimento dopo concentrazione.

Possono essere utilizzate diverse tecniche di colorazione, ma le più usate sono la colorazione di Ziehl-Neelsen (Z-N) a caldo, la colorazione di Z-N modificata a freddo, la colorazione di Kinyoun e la colorazione con Auramina o Auramina-Rhodamina. Quest'ultima colorazione, per la la cui lettura è necessario un microscopio a fluorescenza, è consigliabile come metodo di screening.

Con le colorazioni di Z-N e di Kinyoun le oocisti si colorano di rosa, rosso, rosso-viola su uno sfondo di diverso colore a seconda del contrastante utilizzato (Verde di malachite, Blu di metilene). Di frequente vi è differenza di intensità di colore tra gli organismi presenti nel medesimo preparato, non tutte le oocisti appaiono del medesimo colore e alcune non si colorano affatto e appariranno chiare.

Alla colorazione con Auramina o Auramina-Rhodamina le oocisti appariranno di colore giallo, giallo-verde su uno sfondo scuro.

Un'ulteriore colorazione per i coccidi, meno utilizzata, è la colorazione con Safranina a caldo. Le oocisti si colorano di arancio rossastro più o meno intenso. Anche in questo caso vi è differenza di intensità di colore tra le oocisti presenti nel medesimo preparato e alcune non si colorano affatto.

6.6.1 AUTOFLUORESCENZA

Caratteristica peculiare delle oocisti di *C. cayetanensis* e di *C. belli* è l'autofluorescenza quando il preparato è esposto a luce ultravioletta.

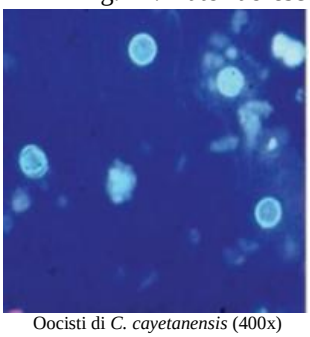
A lunghezza d'onda compresa tra 330 e 385 nm si ottiene un'autofluorescenza blu intenso; con filtri di eccitazione tra 450 e 490 nm la fluorescenza è meno intensa ed è di colore verde.

I CDC di Atlanta hanno suggerito di utilizzare questa caratterista per lo screening rapido nelle epidemie da *C. cayetanensis*.

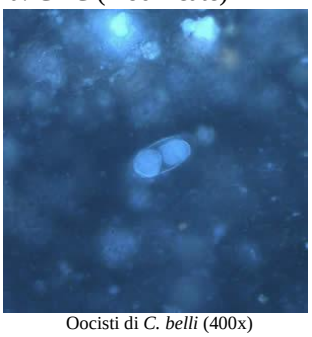
Anche *Cryptosporidium* spp. presenta autofluorescenza, ma in forma minore e soprattutto molto più incostante rispetto a *C. cayetanensis* e *C. belli*; di conseguenza questa tecnica non è applicabile per uno screening rapido.

In tabella 3 a pag. 27 sono riportate le indicazioni e i limiti delle colorazioni permanenti per i coccidi.

Fig. 12. Autofluorescenza. Da: CDC (modificate)



Oocisti di *C. cayetanensis* (400x)



Oocisti di *C. belli* (400x)

FOCUS

Con le tecniche tradizionali, per identificare *Cryptosporidium* spp. è necessario eseguire una colorazione alcool-acido resistente (Ziehl-Neelsen modificata, Kinyoun, Auramina).

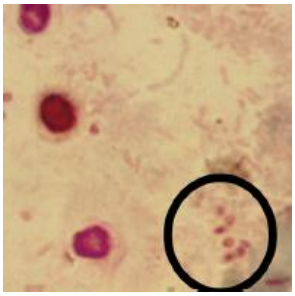
6.7 COLORAZIONI PER I MICROSPORIDI

Per la ricerca microscopica dei Microsporidi il campione raccomandato è il sedimento dopo concentrazione con FEA a partire da feci conservate in formalina, in SAF o in un fissativo "Ecologico" *One-Vial*.

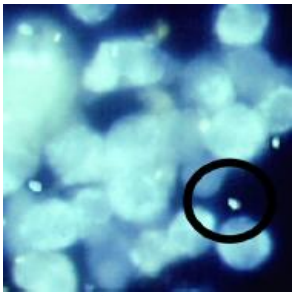
Vi sono diversi tipi di colorazione, ma le più utilizzate sono la colorazione Tricromica modificata secondo Weber o Ryan e la colorazione con agenti chemofluorescenti (fluorocromi) tipo Calcofluor White o Uvitex 2B. Sono entrambe di facile esecuzione e i reagenti sono reperibili in commercio.

Dato che i microsporidi intestinali sono molto piccoli, da 0,9-1,5 µm a 1,2-2,0 µm a seconda della specie, è necessario che chi legge al microscopio i preparati abbia particolare esperienza.

Fig. 13. Microsporidi



Tricromica modificata (1.000x)



Calcofluor White (1.000x)

Da: L. S. Garcia. *Diagnostic Medical Parasitology* (modificate)

Con la colorazione Tricromica modificata le spore, ovali, assumono colore rosa-rosso spesso con un vacuolo più trasparente all'interno; occasionalmente è visibile una banda rossa diagonale più scura che attraversa la spora (tubulo polare). Può essere confondente la presenza di batteri e lieviti che possono colorarsi in rosso; sono tuttavia più scuri dei microsporidi e senza vacuolo trasparente.

Al microscopio a fluorescenza, nei preparati colorati con Calcofluor White o Uvitex 2B, le spore appaiono rifrangenti di colore azzurro-bianco; anche in questo caso a volte è possibile vedere il tubulo polare.
I lieviti e altri elementi fungini possono essere fluorescenti, mentre non lo sono i batteri.
Con le colorazioni non è possibile distinguere né il genere né la specie, quindi in caso di positività si dovrà refertare: "Presenza di spore di Microsporidi".
In tabella 3 sono riportate le indicazioni e i limiti delle colorazioni per i Microsporidi.

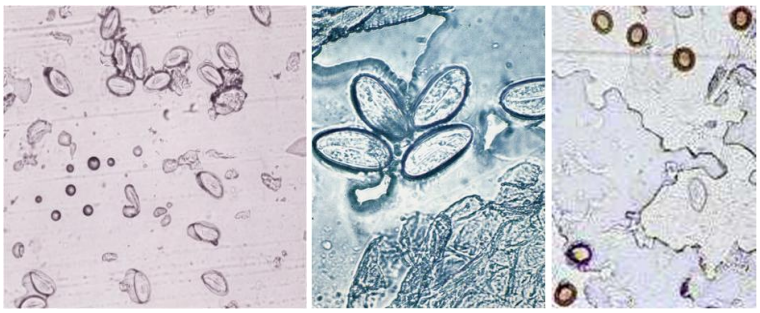
Tabella 3. Principali colorazioni per Amebe, Flagellati, Coccidi, Microsporidi

Colorazione	Indicazione	Limiti
Tricromica di Wheatley	Ricerca e identificazione definitiva di Amebe e Flagellati.	Non idonea per ricerca di Coccidi, Microsporidi.
Ematossilina ferrica	Ricerca e identificazione definitiva di Amebe e Flagellati.	Non idonea per ricerca di Coccidi, Microsporidi.
Giemsa	Ricerca e identificazione *Dientamoeba fragilis* e *Blastocystis* spp.	Non idonea per ricerca di Amebe, Coccidi, Microsporidi.
Alcool-acido resistenti modificate	Ricerca e identificazione di Coccidi.	Non idonee per ricerca di Amebe, Flagellati, Microsporidi.
Safranina a caldo	Ricerca e identificazione di Coccidi.	Non idonea per ricerca di Amebe, Flagellati, Microsporidi.
Tricromica modificata (Weber, Ryan)	Ricerca di Microsporidi.	Non idonea per ricerca di Amebe, Flagellati, Coccidi.
Fluorocromi (Calcofluor White, Uvitex 2B)	Ricerca di Microsporidi.	Non idonea per ricerca di Amebe intestinali, Flagellati, Coccidi.

6.8 SCOTCH TEST/TAMPONE PERIANALE

Con le tecniche di concentrazione delle feci è possibile evidenziare le uova in meno del 5-10% dei casi di soggetti infettati da *E. vermicularis* (ossiuri). Ciò è causato dal fatto che, durante le ore notturne, le femmine adulte gravide migrano fino all'apertura anale dell'ospite, dove rilasciano le uova che aderiscono alla mucosa ed alla cute perianale.
Le uova vanno quindi ricercate a livello delle pliche perianali con la tecnica dello Scotch test (Test di Graham) o con la tecnica del Tampone perianale.
Con queste tecniche è possibile evidenziare anche uova di *Taenia* spp. perché le proglottidi gravide di frequente si insinuano nell'area perianale rilasciando uova.
Il prelievo deve essere effettuato al mattino, prima che il paziente defechi e/o si lavi.
Anche per la ricerca degli ossiuri è molto importante esaminare almeno tre campioni raccolti a giorni alterni, infatti un singolo Scotch test o Tampone perianale individua solo circa il 60% delle infezioni.
A volte può essere necessario esaminare sino a 6 campioni prima di poter escludere con certezza un'infezione da ossiuri.
In "Appendice Tecnica" sono presentate le procedure per l'esecuzione dello Scotch test e del Tampone perianale.

Fig. 14 Scotch test



Uova di *E. vermicularis* (100x e 200x) e uova di *Taenia* spp. (100x)

FOCUS

È necessario esaminare almeno tre campioni (a volte sei) prima di considerare negativa la ricerca di *E. vermicularis*.

6.9 TECNICHE PER LA RICERCA DI LARVE DI *STRONGYLOIDES* SPP. E ALTRI NEMATODI

Le femmine adulte partenogenetiche di *S. stercoralis* non vivono nel lume intestinale, bensì all'interno della sottomucosa ove depositano le uova che rapidamente si schiudono rilasciando larve rabditiformi (L1). Già nel lume intestinale le larve L1 sono in grado di svilupparsi in larve filariformi infettive (L3) che possono auto-infestare l'ospite rendendo la strongiloidiasi cronica. In determinati casi, pazienti immunodepressi o in terapia cortisonica, l'auto-infezione può essere massiva con migrazione delle larve L3 dall'intestino a altri organi, compreso l'encefalo, con effetti non di rado letali.

La sensibilità nel rilevare le larve con le tecniche di concentrazione FEA è del tutto insoddisfacente, di conseguenza in caso di negatività con la concentrazione e in tutte le situazioni in cui è essenziale escludere l'infezione con un elevato grado di sicurezza, come nel caso di pazienti anziani che devono essere sottoposti a terapia cortisonica o di pazienti con un quadro anamnestico-clinico fortemente sospetto per strongiloidiasisi, andrebbero sempre utilizzate tecniche dirette più sensibili quali il metodo di Baermann e/o la coltura su agar per le larve.

Per queste tecniche è indispensabile che il campione sia rappresentato da feci fresche non refrigerate o congelate.

Molto importante per la diagnosi di strongiloidiasi si è dimostrata la ricerca sierologica di anticorpi anti *Strongyloides* (vedi "Tecniche Diagnostiche Indirette" a pag. 38).

Metodo di Baermann

Il metodo di Baermann sfrutta la termotassi positiva e la idrofilia delle larve di nematodi che migrano, dalle feci collocate in un involucro di garza, nell'acqua calda posta in un imbuto; dopo circa un'ora di incubazione le larve si concentreranno sul fondo dell'imbuto e potranno essere raccolte ed esaminate (vedi "Appendice Tecnica").

È un metodo fino a quattro volte più sensibile della FEA e, grazie alla grande quantità di feci esaminate, può rilevare anche infezioni leggere, ma è anche un metodo alquanto macchinoso per cui sono state proposte diverse modifiche per renderlo più agevole (vedi "Appendice Tecnica").

Si rammenta che qualora si esaminassero feci "vecchie", ovvero mantenute a temperatura ambiente per 48-72 ore, eventuali uova di Ancilostomidi (*Ancylostoma/Necator*) o di *Trichostrongylus* spp. potrebbero liberare larve nel campione; in questo caso è necessario differenziarle dalle larve di *S. stercoralis*.

Un'altra tecnica di migrazione che si giova dell'emergenza in acqua delle larve di nematodi è la tecnica di Harada-Mori per la quale si rimanda a "Appendice Tecnica".

Coltura su piastra di agar

La procedura di coltura delle larve su agar è stata introdotta negli anni 90 del secolo scorso. È più sensibile di circa 6 volte rispetto alla FEA e secondo alcuni autori è anche più sensibile del metodo di Baermann (o sue modifiche validate); è attualmente considerata il metodo diagnostico diretto di elezione in particolare nei pazienti immunodepressi.

Come terreno si utilizza un agar nutriente non selettivo che viene inoculato con circa 6-7 grammi di feci fresche non refrigerate. Il terreno per la coltura è reperibile in commercio pronto per l'uso, ma è anche facilmente preparabile in laboratorio (vedi "Appendice Tecnica").

Sembra che anche altri tipi di agar nutrienti non selettivi siano soddisfacenti, tuttavia il terreno specifico per *S. stercoralis* è più appropriato per garantire l'elevata sensibilità della tecnica.

Per aumentare la sensibilità del test è opportuno insemenzare con lo stesso campione almeno tre piastre.

In caso di positività nella piastra di coltura oltre alle larve strongiloidi L1 è possibile trovare larve filariformi L3, vermi adulti e uova.

Con questa tecnica è possibile coltivare anche Ancilostomidi e *Trichostrongylus* spp.

Avviso di sicurezza

Con tutte le tecniche per le larve di *S. stercoralis* è tassativo rispettare le precauzioni di sicurezza poiché nei campioni positivi possono essere presenti larve filariformi L3 trasmissibili al contatto con la cute dell'operatore.

FOCUS

La coltura su agar è considerato il metodo diagnostico diretto di elezione per la ricerca diretta di *S. stercoralis*. Valida alternativa è il metodo di Baermann.

6.10 TEST IMMUNOLOGICI

Sul mercato sono disponibili numerosi test immunologici per il rilevamento e l'identificazione di *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., *Entamoeba histolytica/dispar* e *Entamoeba histolytica* "sensu stricto" che rilevano gli antigeni per mezzo di tecniche Immunoenzimatiche (*Enzyme Immunosorbent Assay* - EIA) o Immunocromatografiche (*Rapid Diagnostic Tests* - RDTs) o in Immunofluorescenza Diretta (*Direct Fluorescence Assay* - DFA).

Se utilizzati secondo le istruzioni fornite dai produttori nei riguardi della conservazione dei campioni fecali e dell'esecuzione del test (quantità e trattamento dell'inoculo, tempi di incubazione, lettura e interpretazione dei risultati) hanno sensibilità e specificità in genere superiori al 90%. La sensibilità analitica è comunque superiore a quella che si ottiene con l'esame copro-parassitologico standard e/o con le colorazioni specifiche, ma inferiore alla sensibilità analitica della biologia molecolare.

Per la diagnosi di Schistosomiasi è commercializzato un test per la ricerca di un antigene presente in tutte le specie di *Schistosoma*; il test non viene eseguito su un campione fecale, bensì su un campione di urina.

La sensibilità della ricerca delle uova di *S. mansoni* nelle feci risulta essere bassa e variabile a seconda del numero di campioni esaminati e del metodo di ricerca utilizzato (Kato-Katz,

Concentrazione con FEA ecc.), ne consegue la necessità di utilizzare metodi alternativi quali la ricerca di antigeni nelle urine e/o la sierologia (vedi "Tecniche Diagnostiche Indirette" a pag. 38).

6.10.1 *GIARDIA DUODENALIS* E *CRYPTOSPORIDIUM* SPP.

I kit commerciali per la ricerca degli antigeni di questi protozoi utilizzano le tecniche EIA, RDT e DFA. Possono essere utilizzate sia feci fresche, anche refrigerate per non più di 2-3 giorni o congelate dopo averle riportate a temperatura ambiente, sia feci conservate in Formalina 10%, SAF o Fissativi "Ecologici" *One-Vial*; per questi ultimi verificare la compatibilità dichiarata dai produttori. Al contrario i fissativi contenenti PVA non sono idonei e, unicamente per DFA, non sono indicate le feci congelate.

Vi sono kit che individuano i singoli protozoi o entrambi oltre a un kit che individua contemporaneamente *G. duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., *E. histolytica/dispar* e per il quale sono necessarie feci fresche anche refrigerate o congelate.

Per i test DFA e RDT è raccomandato l'esame del sedimento dopo concentrazione in quanto aumenta la sensibilità, invece per i test EIA è anche possibile l'esecuzione diretta dalle feci prima della concentrazione.

6.10.2 *ENTAMOEBA HISTOLYTICA/DISPAR* E *ENTAMOEBA HISTOLYTICA*

I kit commerciali per la ricerca degli antigeni di *Entamoeba* utilizzano le tecniche EIA e RDT.

La maggior parte non distingue tra *E. histolityca* patogena e *E. dispar* non patogena, evidenziando quindi il gruppo *E. histolytica/dispar*; vi sono però anche kit specifici per *E. histolityca* "sensu stricto".

Devono essere utilizzate feci fresche anche refrigerate per non più di 2-3 giorni o congelate dopo averle riportate a temperatura ambiente. Le feci conservate in qualsivoglia fissativo non sono idonee.

Anche per il kit che individua contemporaneamente *G. duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., *E. histolytica/dispar* sono necessarie feci fresche.

6.10.3 *SCHISTOSOMA* SPP.

In zone endemiche, ma anche per soggetti provenienti o di ritorno da zone endemiche. può essere utile la determinazione di antigeni circolanti (antigeni catodico e anodico circolanti) mediante anticorpi monoclonali.

In Italia è commercializzato un test per la ricerca dell'antigene catodico circolante (CCA) nelle urine.

La sensibilità del test è ottima per elevate cariche parassitarie (≥ 400 uova per grammo di feci) e diminuisce al diminuire della carica parassitaria, ma rimane sempre superiore alla sensibilità della ricerca diretta delle uova nelle feci. In caso di negatività dell'antigene catodico circolante è consigliabile ripetere i test dopo due, tre mesi.

FOCUS

Per la ricerca di antigeni di *Entamoeba histolytica/dispar* o *Entamoeba histolytica* "sensu stricto" devono essere utilizzate feci fresche.

6.11 STIMA DELLA CARICA DI ELMINTI

La quantificazione delle uova di elminti non è di norma richiesta come esame di routine.

Conoscendo il numero totale di uova presenti in un campione fecale delle 24 ore è possibile stimare approssimativamente il numero di vermi adulti presenti in un paziente. In base al numero di vermi l'infezione può essere classificata come leggera, moderata o severa.
La stima della carica (o intensità) di elminti, espressa come uova per grammo (UPG) di feci, è indicata soprattutto per determinare l'efficacia degli antiparassitari, nel corso di un programma di controllo o di eradicazione, mediante il *Faecal Egg Count Reduction Test* (FECRT). In aree ad alta endemia e con scarse risorse economiche, fa da guida nella decisione di trattare o meno un particolare paziente per un'infezione da vermi che può avere poca o nessuna rilevanza clinica.
Il conteggio delle uova di elminti è influenzato da diversi fattori che possono condurre a errori nella valutazione della UPG; i principali sono la fecondità dei vermi, la variabilità nella produzione quotidiana delle uova, la consistenza delle feci e, ultimo ma non meno importante, l'esperienza e la capacità di chi esegue il test.
Gli unici elminti per i quali è possibile correlare con una accettabile approssimazione la quantità di uova prodotte con la quantità di vermi adulti sono: *A. lumbricoides*, *T. trichiura*, gli Ancilostomidi (*A. duodenale* e *N. americanus*) e gli Schistosomi.
Le tecniche di conteggio più comuni sono il metodo di Stoll, il metodo di Kato-Katz e, con la flottazione, il metodo di McMaster e i metodi FLOTAC e Mini-FLOTAC.
In "Appendice Tecnica" sono riportati i metodi di Stoll, di Kato-Katz, di McMaster e Mini-FLOTAC.

6.12 COLTURE PER I PROTOZOI

Sono veramente molto pochi i laboratori che eseguono tecniche colturali per i protozoi intestinali.
Le colture non possono essere considerate un'alternativa ad altri metodi di ricerca, poiché sono poco sensibili; campioni positivi all'esame microscopico possono risultare negativi alla coltura.
Queste tecniche sono utilizzate soprattutto per la coltura di *Entamoeba* spp., *D. fragilis* e *Blastocystis* spp. principalmente per poter disporre di un gran numero di trofozoiti a scopo di ricerca come lo studio di potenziali agenti terapeutici o di approfondimento diagnostico come la tipizzazione zimodemica mediante gel-elettroforesi per la distinzione tra *Entamoeba histolytica* patogena e *Entamoeba dispar* non patogena.
La distinzione tra amebe patogene e non patogene mediante la tipizzazione zimodemica è sempre meno utilizzata essendo stata sostituita dai test immunologici e soprattutto dalla biologia molecolare.
Vi è un gran numero di terreni colturali che si distinguono tra di loro principalmente per la presenza o meno di microrganismi, ad esempio *Escherichia coli*, nella composizione del terreno; i terreni che contengono microrganismi sono definiti come xenici (monoxenici se contengono un unico tipo di microrganismi, polixenici se ne contengono 2 o più), mentre quelli che non contengono microrganismi sono definiti axenici. Esempio di terreno xenico è il terreno di Robinson, esempi di terreni axenici sono i terreni di Jones modificato e di Diamond (TYI-S-33) e il terreno TYS GM-9.
Sono tutti terreni molto complessi che devono essere preparati in laboratorio e che non si ritiene debbano essere illustrati in questo documento.
Per la preparazione e l'utilizzo si rinvia a testi specializzati.

6.13 BIOLOGIA MOLECOLARE

La biologia molecolare ha permesso di migliorare la diagnosi microbiologica da oltre 30 anni.
In ambito parassitologico le tecniche bio-molecolari sono state utilizzate inizialmente per studi di tipizzazione, tassonomia, caratterizzazione biologica e patogenetica.

La reazione nota come PCR (*Polymerase Chain Reaction*, ovvero Reazione a Catena della Polimerasi) permette l'amplificazione di uno specifico frammento di DNA utilizzando come inneschi delle corte sequenze nucleotidiche (*primers*).
La specificità della reazione è determinata dalla sequenza dei *primers* che si potranno appaiare solo con complementari sequenze note e caratteristiche dell'organismo da identificare nel campione analizzato. Quindi l'eventuale frammento amplificato, che avrà lunghezza e sequenza nota, costituirà la prova diagnostica della presenza del microrganismo nel campione in questione.
Alla fine degli anni 90 del secolo scorso l'uso della PCR era ancora limitato e la maggior parte della ricerca era dedicata a malaria, leishmaniasi, tripanosomiasi e toxoplasmosi.
Inoltre, ad eccezione della toxoplasmosi, l'esperienza dell'uso della PCR sul DNA isolato direttamente dal materiale del paziente era assai limitata.
Con lo sviluppo delle tecniche PCR, al principiare degli anni 2000, è stato possibile per i laboratori con esperienza in biologia molecolare costruirsi PCR fatte "in casa" per la ricerca di parassiti nelle feci.
A partire dal 2010, con la spinta per i test su base sindromica, l'industria ha cominciato ad inserire anche i parassiti intestinali nei pannelli per la diagnosi delle gastroenteriti e nei test di amplificazione del segnale in tempo reale noti come *Real time PCR* (Rt-PCR)[§].
Questa tecnica riduce i tempi di esecuzione del test in quanto non necessita di una successiva analisi dei prodotti di amplificazione tramite elettroforesi, come nel caso della PCR convenzionale. In questa tecnica l'amplificazione dello specifico frammento di DNA è simultaneamente accoppiata all'emissione di luce fluorescente dovuta alla presenza di specifici fluorofori nella miscela di reazione. Ciò permette la generazione di un profilo di emissione che può essere seguito nel corso stesso della reazione (*Real time*), quindi riducendo di molto i tempi di analisi.
Dopo gli studi condotti da autori olandesi (van Gool e Verweij), la Rt-PCR diventa sempre più diffusa per la sua maggiore sensibilità e specificità nella rilevazione dei principali protozoi intestinali (*E. histolytica*, *G. duodenalis*, *D. fragilis* e *Cryptosporidium* spp.) anche utilizzando un solo campione di feci.
Sono in aumento le ditte che hanno sviluppato test in Rt-PCR e che hanno costruito pannelli che comprendono anche alcuni elminti intestinali e microsporidi. Il problema ora è la loro validazione clinica.
In questo ambito, difficile per la relativa rarità di campioni positivi, il Comitato di Studio per la Parassitologia (CoSP) dell'Associazione Microbiologi clinici Italiani (AMCLI) ha già presentato, a livello nazionale e internazionale, risultati interessanti di studi multicentrici di alcuni test in commercio. Infatti soprattutto grazie ai membri iscritti all'AMCLI è stato possibile raccogliere un discreto numero di campioni, positivi per i diversi parassiti intestinali, dalla rete dei laboratori a livello nazionale.

(§) Detta pure *quantitative PCR* (qPCR) in quanto consente, in alcune condizioni, anche la quantificazione della sequenza bersaglio. Inoltre la *Real time PCR* (Rt-PCR) su DNA non va confusa con un'altra tecnica diagnostica la *Reverse Transcriptase PCR* (RT-PCR) che ha una prima fase che utilizza RNA come materiale di partenza, molto nota al giorno d'oggi perché è la principale tecnica per la diagnosi del SARS-CoV-2 (tampone molecolare).

6.13.1 VALORI E LIMITI DEI TEST MOLECOLARI

I test molecolari hanno apportato un miglioramento della sensibilità e della specificità per la diagnosi dei protozoi intestinali superando le difficoltà della diagnosi morfologica tradizionale

legata all'esperienza dell'operatore, al numero di campioni da esaminare e alla qualità dei preparati microscopici da esaminare.
Stark ha dimostrato un aumento della sensibilità della PCR di oltre il 30% rispetto alle tecniche tradizionali nel rilevare *G. duodenalis, E. histolytica, D. fragilis* e *Cryptosporidium* spp.
La PCR permette di differenziare *E. histolytica* da *E. dispar* altrimenti impossibili da discriminare con il solo microscopio. La PCR migliora anche l'identificazione di *D. fragilis* che tradizionalmente obbliga la ricerca microscopica da strisci fecali dopo colorazione Giemsa o Tricromica.
Non si hanno per ora dati così validi anche per la ricerca degli elminti intestinali eccezion fatta per i geoelminti.
Come tutte le tecniche di biologia molecolare, la PCR applicata ai parassiti intestinali non è scevra di difficoltà.
Prima fra tutte la necessità di una procedura efficiente per l'estrazione del DNA dalle feci. Punto cruciale per tutti i metodi molecolari è la qualità del DNA estratto dal campione biologico, in tal senso le feci rappresentano una matrice particolarmente complessa ed eterogenea che può contenere sostanze inibenti la reazione di amplificazione del DNA alla base della PCR e della Rt-PCR.
I test disponibili in commercio raccomandano sistemi di estrazione validati. Per le PCR sviluppate "in casa" (*in house/at home*), sono disponibili diversi sistemi di estrazione che devono essere studiati nella fase di valutazione e della messa a punto del test.
Fra i principali sistemi di estrazione automatizzati vi sono ad oggi: QIAsymphony e QIAamp DNA mini kit (Qiagene), NucliSENSE easyMAG (bioMérieux), MagNAPure (Roche), Microlab Nimbus (Hamilton), Microlab STARlet (Hamilton), InviGinius (Stratec), Maxwell (Promega).
Il campione ideale per la biologia molecolare è costituito da feci fresche, anche refrigerate o congelate. Sono ancora da validare i sistemi di trasporto e conservazione idonei per ogni test in commercio. Alcune ditte propongono per i loro test sistemi di trasporto e conservazione validati e ai quali è necessario attenersi.

FOCUS

L'estrazione degli acidi nucleici dal materiale fecale è un punto critico. Le feci contengono numerose sostanze interferenti o inibitorie la reazione di amplificazione del DNA.
È necessario utilizzare sistemi di estrazione validati.

Allo stato attuale non esistono sistemi commerciali validati per campioni conservati in mercurio, PVA e formalina, con l'eccezione di un kit che rileva *G. duodenalis, E. histolytica* e *Cryptosporidium* spp. (solo *C. hominis* e *C. parvum*) e che, secondo quanto riportato nell'inserto, è validato anche per campioni conservati in formalina al 10% al massimo per 5 giorni. Questo kit non permette l'uso di campioni congelati.
Negli ultimi anni le ditte produttrici hanno progettato e commercializzato dei fissativi/conservanti, costituiti da miscele di alcooli, che permettono di eseguire, a partire da un unico flacone, oltre alle concentrazioni, le colorazioni permanenti, i test immunologici, ma anche i test molecolari (fissativi universali).
I CDC di Atlanta e L. S. Garcia (vedi "Fonti bibliografiche") indicano come conservante compatibile con la biologia molecolare il Total-Fix® (Medical Chemical Corporation).
Recentemente sono stati commercializzati altri fissativi universali: Apafix™ (Apacor) che nella *brochure* illustrativa dichiara la possibilità di eseguire test molecolari e Para-Pak® SVT (Meridian)

per il quale il produttore dichiara che è possibile utilizzarlo con metodi di biologia molecolare, previa specifica validazione per il metodo molecolare prescelto.
Allo stato attuale delle conoscenze, AMCLI – CoSP consiglia di seguire la proposta di van Gool del 2014: un campione di feci raccolto in un unico giorno e poi distribuito in aliquote in due flaconi, uno senza conservanti per la Rt-PCR per i protozoi intestinali (oltre che per tutti i test che prevedono un campione di feci fresche) e uno con fissativo (SAF, Formalina 10% ecc.) per l'esame microscopico dopo concentrazione (vedi "Dual Fecal Test" a pag. 18).
In alternativa, se non si vogliono utilizzare due flaconi, è possibile utilizzare solo feci fresche che vengono distribuite in aliquote in laboratorio ove possono anche essere congelate per eventuali approfondimenti e/o studi di validazione dei sistemi di biologia molecolare e/o studi epidemiologici.
Per una corretta diagnosi dei parassiti intestinali con le tecniche bio-molecolari è necessaria un'esperienza sia nella parassitologia tradizionale con conoscenza dei dati epidemiologici, biologici, clinici e diagnostici sia nella capacità di interpretare i dati dei test di amplificazione.
È necessario scegliere tecniche validate, semplici da utilizzare e con costi contenuti.
La diagnosi molecolare ha il noto limite di rilevare solo i geni per i quali è stata disegnata, quindi la specificità del test deve essere valutata in relazione al livello di identificazione necessario per una diagnosi corretta. Alcuni test, per esempio, rilevano solo *C. parvum* e quindi, in teoria, potrebbero perdere altre specie di *Cryptosporidium*, sebbene ne esistono altri che rilevano tutte le specie che infettano l'uomo basandosi su geni conservati.
Le ditte dovrebbero concordare i pannelli delle PCR multiplex con le Associazioni Scientifiche come AMCLI – CoSP o SoIPa.
La diffusione delle tecniche bio-molecolari potrebbe causare la perdita dell'esperienza della parassitologia tradizionale costruita nel tempo. Sarà necessario, pertanto, cercare di non perdere le conoscenze acquisite e anzi diffonderle, come illustrato nella prefazione di questo documento.
Le metodiche di biologia molecolare non sono indicate per il follow-up dei pazienti infettati, poiché, a causa della loro elevata sensibilità, potrebbero rilevare anche gli acidi nucleici di parassiti morti ma ancora presenti nel campione, rilevando così false positività.

6.13.2 KIT COMMERCIALI

Vi sono numerosi kit, prodotti da diverse ditte e marcati CE-IVD, per la rilevazione dei protozoi intestinali umani mediante Rt-PCR. Sono kit Monoplex (che rilevano un unico parassita) o Duplex (che rilevano due parassiti) o Multiplex (che rilevano contemporaneamente tre o più parassiti). Tutti i kit Multiplex per protozoi ad oggi in commercio permettono di rilevare *G. duodenalis*, *E. histolytica* e *Cryptosporidium* spp. Alcuni rilevano anche *D. fragilis* e/o *Blastocystis* spp. Inoltre è presente sul mercato un kit che oltre ai cinque protozoi citati permette la rilevazione anche di *C. cayetanensis*.
Allo stato attuale (dicembre 2021) in commercio in Italia vi è un unico kit Rt-PCR per la rilevazione di elminti marcato CE-IVD per uso diagnostico. Il kit permette di evidenziare: *Ancylostoma* spp. (*A. duodenale*, *A. caninum*, *A. ceylanicum*), *Necator americanus*, *Strongyloides* spp. (*S. stercoralis*, *S. fülleborni*) *Ascaris* spp. (*A. lumbricoides*, *A. suum*), *T. trichiura*, *E. vermicularis*, *Taenia* spp. (*T. solium*, *T. saginata*, *T. asiatica*), *Hymenolepis* spp. (*H. nana*, *H. diminuta*). Inoltre nel medesimo kit sono presenti *primers* per il rilevamento di *Enterocytozoon* spp./*Encephalitozoon* spp. (*E. bieneusi*, *E. cuniculi*, *E. hellem*, *E. intestinalis*).

Purtroppo in questo kit non sono presenti *primers* per *Schistosoma* spp. e inoltre meraviglia la presenza di *primers* per i microsporidi in quanto il tipo di popolazione che necessita di questa ricerca (pazienti immuno-compromessi con diarrea) differisce notevolmente da quella per la quale si ricercano generalmente gli elminti (immigrati e viaggiatori da zone endemiche).
Recenti studi retrospettivi (Köller T. *et al* 2020, Autier B. *et al* 2021, Hoffmann T. *et al* 2021) hanno messo in evidenza, nel complesso, una buona performance dei kit commerciali Rt-PCR per elminti, ma hanno pure rilevato un discreto numero di falsi negativi in particolare per Ancilostomidi, *Strongyloides* spp., *T. trichiura* e *E. vermicularis*, anche se i tre studi non concordano completamente sulle false negatività per questi elminti. Le principali criticità sono presumibilmente legate al tipo di materiale utilizzato per gli studi retrospettivi (campioni congelati anche da alcuni anni), all'uso di feci e non materiale perianale per la ricerca di *E. vermicularis*, al tipo di *primers* utilizzati e, non ultimo, ai metodi di estrazione del DNA (estrazione diretta da feci o estrazione dopo trattamento con microbiglie in ceramica per la frammentazione delle uova). Tutti gli articoli concordano con il fatto che sono necessari ulteriori studi, soprattutto di tipo prospettico, per validare definitivamente questi kit. Per maggiori approfondimenti si rinvia ai lavori sopra citati (vedi Fonti Bilografiche).
In Italia è anche reperibile un secondo kit che contiene *primers* per *A. lumbricoides, N. americanus, A. ceylanicum, A. duodenale, T. trichiura, S. stercoralis*, ma che allo stato attuale è considerato per solo uso di ricerca (RUO).

FOCUS

I test di Biologia Molecolare (PCR, Rt-PCR, Microarray) eseguiti su materiale fecale hanno dimostrato una sensibilità e specificità maggiore rispetto alle tecniche tradizionali per i principali protozoi, ma allo stato attuale non per tutti gli elminti.

7 ALTRI MATERIALI DAL TRATTO INTESTINALE

7.1 LIQUIDO DUODENALE

Il liquido duodenale viene primariamente esaminato per la ricerca di trofozoiti di *G. duodenalis*, ma anche di larve di *S. stercoralis* e oocisti di *Cryptosporidium* spp. e di *C. belli*, nei casi in cui l'esame copro-parassitologico abbia dato esito ripetutamente negativo per questi parassiti, ma vi sia comunque un forte sospetto d'infezione.
Più raramente possono essere anche evidenziate uova di *Clonorchis*/*Opisthorchis* spp., di *Fasciola hepatica*, di *Trichostrongylus* spp. e di Ancilostomidi.

Il materiale può essere raccolto in corso di endoscopia o tramite un sondino naso gastrico o con il metodo dello String Test (Enterotest®).

Il liquido duodenale raccolto non necessita di conservanti e deve essere immediatamente inviato al laboratorio, dove deve essere prontamente esaminato, al massimo entro un'ora dal prelievo.
Nel caso in cui il materiale fosse scarso (<0,5 mL) esaminare "a fresco" ponendo una o due gocce del liquido su un vetrino portaoggetto e coprendo con un copri oggetto, quindi esaminare microscopicamente a 100x e 400x; nel caso di una quantità maggiore centrifugare a 500 g per 10' ed esaminare nella medesima maniera una o due gocce del sedimento. Se presente del muco rimuoverlo con una pipetta Pasteur ed esaminarlo microscopicamente in quanto spesso i trofozoiti rimangono adesi al muco.

Se il liquido è esaminato tempestivamente è possibile apprezzare i movimenti a "foglia cadente" dei trofozoiti di *G. duodenalis*, movimenti che a volte sono appena percettibili, così come è possibile osservare il movimento delle larve di *S. stercoralis*.
Se il liquido è esaminato tardivamente, dopo oltre 1-2 ore dal prelievo, non sarà più possibile apprezzare i movimenti e l'identificazione si baserà unicamente sugli aspetti morfologici dei parassiti presenti.

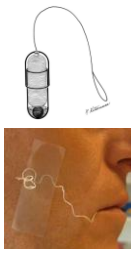
È anche possibile allestire dei preparati per colorazioni permanenti, obbligatorie se si ricerca *Cryptosporidium* spp., facoltative nel caso di ricerca di *G. duodenalis*.
Strisciare una o due gocce di liquido duodenale, o di sedimento dopo centrifugazione, su un vetrino portaoggetto, far asciugare all'aria, fissare per circa 1 minuto con metanolo e colorare con Ziehl-Neelsen modificata per *Cryptosporidium* spp. o con colorazione di Giemsa per *G. duodenalis* (vedi le relative metodiche in "Appendice Tecnica" a pag. 102 e pag. 92).

Sono effettuabili anche le colorazioni Tricromica e con Ematossilina ferrica dopo aver fissato il liquido duodenale con fissativo di Schaudinn o con PVA.
Strisciare una o due gocce di liquido duodenale (o del sedimento dopo centrifugazione) su un vetrino portaoggetto e senza far asciugare il preparato immergerlo in una vaschetta contenente il fissativo di Schaudinn e lasciarvelo per 30-60 minuti, quindi procedere con la colorazione prescelta senza far asciugare il preparato.
In alternativa, su un vetrino portaoggetto miscelare una o due gocce di liquido duodenale (o del sedimento dopo centrifugazione) con due o tre gocce di PVA o Zn-PVA e allestire un preparato sottile. Far asciugare perfettamente per 8-10 ore (preferibilmente una notte) il vetrino a temperatura ambiente o per 2-3 ore a 37° C, quindi procedere con la colorazione prescelta (vedi le metodiche delle colorazioni in "Appendice Tecnica" a pag. 104 e pag. 106).
Infine sul liquido duodenale, possono essere anche effettuati test immunologici per la ricerca di *G. duodenalis* e *Cryptosporidium* spp. Questi test, di ausilio per il parassitologo, al momento non sono validati per questo tipo di campione.

7.1.1 *String Test* (Enterotest®)

Lo *String test* permette di prelevare del liquido duodenale con una procedura meno invasiva dell'endoscopia e del sondino naso gastrico. Consiste in una capsula gelatinosa contenente un filo di nylon alla cui estremità è fissato un piccolo peso. Il filo sporge attraverso un'estremità della capsula ed è lungo 90 cm per i bambini e 140 cm per gli adulti.
Dopo aver fissato con del nastro adesivo o un cerotto l'estremità del filo che fuoriesce dalla capsula a una guancia del paziente, la capsula viene ingerita.
Arrivata nello stomaco la capsula gelatinosa si dissolve e il filo si srotola, con i movimenti peristaltici, grazie al piccolo peso, il filo raggiunge il piccolo intestino dove il peso si stacca (viene espulso nelle feci).

Fig. 15
String Test



Il filo viene lasciato in sede per circa quattro ore, per permettere al succo duodenale di aderire al filo stesso, quindi questo viene rapidamente estratto, posto in una capsula di Petri che va sigillata con nastro adesivo e immediatamente inviata in laboratorio. Durante il periodo della permanenza del filo il paziente non deve mangiare, ma può bere piccole quantità d'acqua.
Il colore giallastro all'estremità distale del filo, dovuto alla bile, conferma il corretto raggiungimento del duodeno.

Spremendo il filo facendolo scorrere tra il pollice e l'indice (indossare guanti mono uso) si ottengono 4 o 5 gocce di materiale. Esaminare il liquido duodenale così ottenuto come indicato nel paragrafo precedente.

7.2 CAMPIONI DA SIGMOIDOSCOPIA

7.2.1 AMEBIASI

I campioni ottenuti con la sigmoidoscopia possono essere utili per la diagnosi di amebiasi quando ripetuti esami fecali di routine non sono stati in grado di evidenziare *E. histolytica*, ma rimane un forte sospetto clinico. L'introduzione dei test immunologici specifici e soprattutto delle tecnologie in biologia molecolare hanno comunque ridotto la necessità di eseguire questa procedura.

Per garantire il corretto prelievo e l'immediata analisi dei campioni è indispensabile che vi sia uno stretto collegamento tra il laboratorio e il medico che effettua l'endoscopia.

Il campione, costituito da muco superficiale e/o superficie della mucosa, deve essere prelevato in corrispondenza delle aree che appaiono ulcerate. Se non vi sono lesioni evidenti si devono prelevare almeno 6 campioni da diverse aree della mucosa intestinale. Ogni prelievo va considerato e analizzato come campione singolo.

I preparati devono essere allestiti immediatamente sul luogo dell'endoscopia o immediatamente portati in laboratorio, eventualmente aggiungendo un poco di soluzione fisiologica, per poterli analizzare al massimo entro 30' dal prelievo.

I campioni possono essere esaminati sia "a fresco" che dopo colorazione permanente.

Mettere una o due gocce del materiale prelevato su un vetrino portaoggetto, aggiungere una o due gocce di soluzione fisiologica, miscelare accuratamente e coprire con vetrino coprioggetto.

Esaminare a 100x indugiando per alcuni secondi su ciascun campo per evidenziare eventuali movimenti. In presenza di elementi sospetti passare a 400x.

È possibile aggiungere una piccola goccia di soluzione iodata (porre la goccia a contatto con il vetrino coprioggetto, la soluzione iodata passerà nel preparato per capillarità). Con questo preparato si evidenziano meglio i nuclei dei trofozoiti, ma la mobilità andrà persa.

Attenzione: i trofozoiti possono essere confusi con macrofagi, anch'essi mobili; è necessario confermare con una colorazione permanente.

Strisciare delicatamente una o due gocce di materiale su un vetrino portaoggetto e senza far asciugare il preparato immergerlo in una vaschetta contenente il fissativo di Schaudinn e lasciarvelo per 30-60 minuti, quindi procedere con la colorazione prescelta senza far asciugare il preparato

In alternativa, su un vetrino portaoggetto miscelare una o due gocce di materiale con due o tre gocce di PVA o Zn-PVA e allestire un preparato sottile. Far asciugare perfettamente per 8-10 ore (preferibilmente una notte) il vetrino a temperatura ambiente o per 2-3 ore a 37° C, quindi procedere con la colorazione prescelta (vedi le metodiche delle colorazioni in "Appendice Tecnica" a pag. 104 e pag. 106). In presenza di trofozoiti amebici contenenti emazie è possibile refertare: trofozoiti di *Entamoeba histolytica*, altrimenti refertare: trofozoiti di *Entamoeba histolytica/dispar*.

Sebbene sia stato proposto l'utilizzo di test immunologici specifici per *E. histolytica* anche per i campioni da sigmoidoscopia, si rammenta che questi NON sono validati per questo tipo di campione e che quindi i risultati vanno considerati con senso critico.

7.2.2 SCHISTOSOMIASI

Il materiale da sigmoidoscopia è utile anche per la diagnosi di infezione da Schistosomi intestinali, *S. mansoni*, *S. intercalatum*, *S. japonicum*, *S. mekongi*.

Anche in questo caso la sigmoidoscopia può essere indicata quando ripetuti esami copro parassitologici hanno dato esito negativo ma rimane un forte sospetto clinico.
Il prelievo, che consiste in biopsie rettali da sigmoidoscopia o anche anali da proctoscopia, va effettuato a livello delle lesioni infiammate o granulomatose o, in assenza di queste, in siti casuali (almeno 6).
Il materiale prelevato viene posto su un vetrino portaoggetto e schiacciato delicatamente con un altro vetrino portaoggetto in modo da rendere quasi trasparente il preparato ed esaminato microscopicamente a 100x e 400x.
Le uova degli schistosomi appaiono rifrangenti, spesso raggruppate, e sono identificate morfologicamente in base alla forma, alle dimensioni e alla dimensione e posizione della spina (mucrone). Il rilevamento del movimento delle cellule a fiamma dell'apparato escretore, all'interno dei miracidi, indicherà la vitalità delle uova.

In rari casi è possibile osservare in campioni rettali anche uova di *S. haematobium* che andranno differenziate dalle uova di *S. intercalatum* (entrambe con spina terminale). Queste ultime, così come le uova degli altri schistosomi intestinali sono acido resistenti, mentre le uova di *S. haematobium* in genere non hanno questa caratteristica; quindi una colorazione di Ziehl-Neelsen modificata può essere di aiuto per la diagnosi di specie.

8 TECNICHE DIAGNOSTICHE INDIRETTE

I test sierologici possono avere limiti di sensibilità e specificità, che in alcuni casi variano per i limiti o i vantaggi intrinseci legati al tipo di test utilizzato (ad esempio IFA, ELISA, RDT, IHA, WB ecc.), per il tipo di anticorpi ricercati (IgG, IgM, IgA) e per il tipo di antigene (Ag) utilizzato nel test in uso (Ag crudo, Ag solubile, Ag ricombinante ecc.). È necessario conoscere i limiti del test in uso e valutare i risultati insieme con le informazioni cliniche, epidemiologiche e con gli esiti degli esami diretti.
Quando disponibile in commercio, è vantaggioso usare un secondo test che impieghi una tecnica e/o un antigene diversi dal test utilizzato in prima battuta.

8.1 *ENTAMOEBA HISTOLYTICA* – RICERCA DI ANTICORPI

Sono due le situazioni per cui può essere utile la sierologia per *E. histolytica*:

1. forme a localizzazione extraintestinale;
2. forme intestinali invasive.

1. Nelle forme extraintestinali, in particolare in quelle epatiche, la sierologia per *E. histolytica* è molto sensibile e specifica (94-95%) e permette quindi di confermare la natura amebica delle alterazioni sospettate clinicamente e, in genere, evidenziate con la diagnostica per immagini.
2. Nelle forme intestinali permette di confermare l'invasività dell'infezione e, di conseguenza, la diagnosi d'infezione da *E. histolytica* "sensu stricto". Si deve comunque tener conto del fatto che per queste forme la sensibilità è inferiore (circa 75%) anche in presenza di lesioni intestinali evidenziate con endoscopia. La sierologia è tuttavia sempre negativa in caso di portatori asintomatici e in presenza d'infezione da *E. dispar* non patogena.

   Gli anticorpi specifici possono rimanere presenti per un lungo periodo, quindi non è possibile distinguere, saggiando un unico siero, tra infezione in atto ed infezione pregressa soprattutto in pazienti provenienti da zone ad alta endemia amebica.

I test più utilizzati sono quelli di Immunofluorescenza indiretta (IFA), ELISA e Emoagglutinazione indiretta (IHA), tutti dotati di buona sensibilità e specificità.

8.2 *STRONGYLOIDES STERCORALIS* – RICERCA DI ANTICORPI

I test sierologici per *S. stercoralis* hanno sensibilità e specificità molto elevate e sebbene non permettano di distinguere accuratamente tra infezione recente e infezione pregressa in aree endemiche, come numerose zone d'Italia, possono essere molto utili negli screening sierologici e nei casi di forte sospetto diagnostico (ipereosinofilia, provenienza da zone endemiche, età elevata ecc.), ma nei quali ripetute ricerche dirette hanno dato esito negativo.

Vi sono diverse tecniche sierologiche: Immunofluorescenza indiretta (IFA), Luciferasi immunoprecipitazione (LIPS), ELISA.

IFA presenta la più elevata sensibilità (93,9%) e una buona specificità (92,2%), mentre LIPS ha una sensibilità meno elevata (85,1%) ma una specificità eccellente (100%). I due metodi non sono presenti in commercio.

Attualmente in commercio vi sono due test ELISA: IVD-ELISA (non in commercio in Italia) che utilizza come antigene *S. stercoralis* e che presenta una sensibilità del 91,2% e una specificità del 99,1% e Bordier-ELISA (in commercio in Italia) che utilizza come antigene *S. ratti* e che presenta una sensibilità del 89,5% e una specificità del 98,3%. Vè anche un kit NovaTec-ELISA per cui studi preliminari indicano una sensibilità inferiore rispetto ad altri test sierologici

8.3 *SCHISTOSOMA MANSONI* – RICERCA DI ANTICORPI

Come già detto la sensibilità della ricerca delle uova di *S. mansoni* nelle feci risulta essere bassa e variabile a seconda del numero di campioni esaminati e del metodo di ricerca utilizzato (Kato-Katz, Concentrazione con FEA ecc.). È quindi evidente l'utilità di una sierodiagnosi.

Viene utilizzato come antigene *S. mansoni*, l'unica specie per la quale è possibile la coltivazione in laboratorio, ma la sensibilità e la specificità delle tecniche sierologiche varia a seconda che si utilizzino antigeni da cercarie, da schistosomuli, da verme adulto, da uova oppure antigeni circolanti o antigeni ricombinanti.

I test più comunemente disponibili sono quelli in Emoagglutinazione indiretta (IHA) e in ELISA sia con antigene solubile dell'uovo (SEA), sia con antigene da verme adulto (WA) che presenta buone sensibilità e specificità.

In commercio in Italia vi sono anche un test Immunocromatografico (RDT) per IgG-IgM specifiche, e un test di conferma in Western Blot (WB) per le IgG; entrambi i test hanno mostrato un'elevata sensibilità nell'identificare infezioni da *Schistosoma* spp. in individui provenienti da aree endemiche.

In caso di negatività della ricerca di anticorpi è consigliabile ripetere i test dopo due-tre mesi.

FOCUS

I test sierologici sono particolarmente utili nella diagnosi di infezione da *S. stercoralis* e da *Schistosoma* spp. e nell'identificazione di infezione invasiva da *E. histolytica*.

Tuttavia tali test possono avere sensibilità e specificità variabili. È necessario conoscere e ricercare in letteratura i limiti del test in uso e valutare sempre i risultati insieme con le informazioni cliniche, epidemiologiche e con gli esiti degli esami diretti.

9 IDENTIFICAZIONE MACROSCOPICA DEGLI ELMINTI

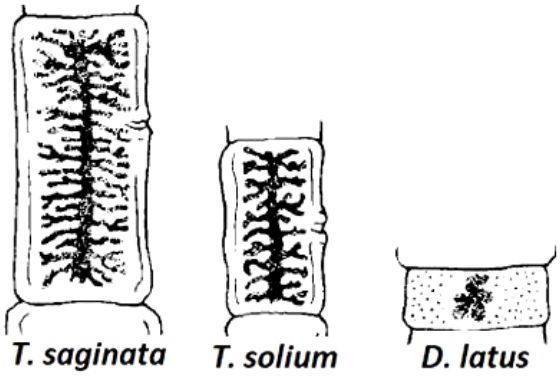
9.1 IDENTIFICAZIONE DELLE PROGLOTTIDI DI CESTODI

Con le feci vengono espulse soprattutto proglottidi di *Taenia* spp. (le proglottidi di *T. saginata*, sono dotate di movimenti propri che permettono loro di fuoriuscire forzando lo sfintere anale), ma anche, sia pur raramente, di *Dibothriocephalus latus*.

Le proglottidi di *Hymenolepis* spp. non vengono praticamente mai emesse.

Le proglottidi mature (gravide) di *T. saginata* sono più lunghe che larghe e misurano fino a 2 x 0,6 cm, quelle di *T. solium* sono anch'esse più lunghe che larghe, ma più piccole misurando fino a 1,3 x 0,8 cm. Le proglottidi di *D. latus* sono invece più larghe che lunghe e misurano fino a 0,3 x 1 cm.

Fig. 16 Proglottidi di tenie.



Da: L. S. Garcia. *Diagnostic Medical Parasitology* (modificata)

Il ritrovamento di proglottidi di *Taenia* spp. pone l'obbligo dell'identificazione delle stesse a livello di specie, identificazione raggiungibile attraverso la tecnica dell'iniezione di coloranti nelle proglotti gravide oppure, più semplicemente, per mezzo della chiarificazione in acido acetico (vedi "Appendice tecnica").

Come sopra riportato, le proglottidi di *T. saginata* sono dotate di movimenti propri che permettono loro di fuoriuscire forzando lo sfintere anale; tali movimenti, che durano alcune ore dopo l'emissione, sono un buon criterio diagnostico differenziale rispetto alle proglottidi di *T. solium* che sono sprovviste di movimenti propri.

9.2 IDENTIFICAZIONE DI VERMI ADULTI DI *ASCARIS LUMBRICOIDES*

Gli adulti di *Ascaris lumbricoides* sono piuttosto grandi. Come in tutti nematodi è presente un marcato dimorfismo sessuale. Le femmine misurano 20-35 cm di lunghezza e presentano una coda dritta; i maschi sono più piccoli misurando 15-31 cm e hanno la coda ricurva.

Fig. 17 *Ascaris lumbricoides*: vermi adulti.

Femmina adulta

Da: CDC-DPDx

Maschio adulto

Da: L. S. Garcia. *Diagnostic Medical Parasitology*

9.3 IDENTIFICAZIONE DI VERMI ADULTI DI *ENTEROBIUS VERMICULARIS*

Le femmine adulte di *Enterobius vermicularis* misurano 8-13 mm di lunghezza per 0,3-0,5 mm di larghezza e possiedono una lunga coda appuntita. I maschi adulti sono molto più piccoli, misurano fino a 2,5 mm di lunghezza per 0,1-0,2 mm di larghezza e hanno la coda ricurva.

Fig. 18 Enterobius vermicularis: vermi adulti.

Maschio e femmina adulti

Maschio adulto

Da: CDC-DPDx

Fig. 19 *Enterobius vermicularis*: particolari dei vermi adulti.

Femmina, particolare della coda: appuntita

Maschio, particolare della coda: smussata e ricurva

Da: CDC-DPDx

10 IDENTIFICAZIONE MICROSCOPICA DEGLI ELMINTI

A livello microscopico le forme diagnostiche che vanno evidenziate ed identificate sono le uova e le larve.

Le uova sono facilmente evidenziabili e in genere per l'identificazione è sufficiente osservarle a piccolo ingrandimento (100x), ma a volte in presenza di uova di piccole dimensioni, per esempio di *Opisthorchis* spp, è necessario utilizzare ingrandimenti maggiori (250x o 400x).

È preferibile osservare preparati non colorati con soluzioni iodate per evitare interferenze nell'identificazione, infatti anche il colore, o l'assenza di colore, è un carattere che aiuta nel riconoscimento delle uova.

Anche per la ricerca delle larve di nematodi, che sono di grandi dimensioni (> 200 µm di lunghezza), è sufficiente l'osservazione a 100x ed in genere le larve che si possono ritrovare nelle feci umane sono larve di *Strongylodes* spp.

Nei campioni di feci appena emesse, esaminati a "fresco" senza conservanti e senza colorazione con soluzioni di iodio, è possibile osservare la mobilità delle larve.

Nelle feci analizzate entro 12-24 ore dalla raccolta non sono presenti larve di *Ancylostoma/Necator* spp., ma se i campioni vengono lasciati a temperatura ambiente per più di 24-48 ore prima di essere esaminati, dalle uova eventualmente presenti si possono sviluppare larve rabditoidi, rendendo così necessaria la distinzione con le larve rabditoidi di *S. stercoralis* (vedi "Identificazione delle larve di nematodi).

Come ricordato nel paragrafo "Prefazione" si deve tener presente che non tutti gli elminti si ritrovano in ogni area del mondo; alcuni hanno una ristretta distribuzione geografica. Di conseguenza ha molta importanza l'informazione anamnestica circa la provenienza o eventuali viaggi effettuati dal paziente.

10.1 IDENTIFICAZIONE DELLE UOVA

Le caratteristiche utilizzate per l'identificazione delle uova a livello di specie sono le seguenti:

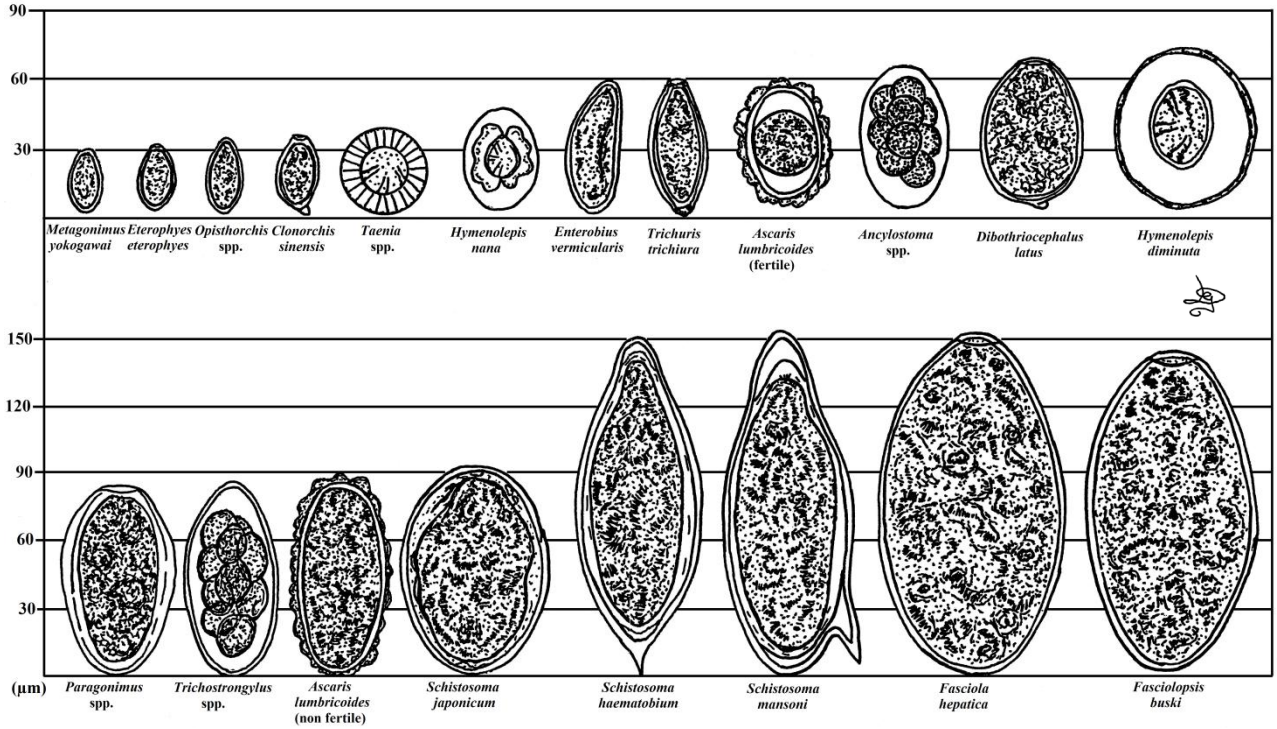
- Dimensioni. La lunghezza e la larghezza, che vanno misurate, in genere rientrano in uno specifico range.
- Forma. Ogni specie ha la sua peculiare forma.
- Spessore delle parete delle uova. Alcune specie, come *Ascaris lumbricoides*, hanno parete spessa; altre, come *Ancylostoma/Necator* spp., hanno parete sottile.
- Colore. Alcune uova sono incolori (ad esempio: *E. vermicularis*, *Ancylostoma/Necator* spp.) altre sono di colore bruno o giallo (ad esempio: *A. lumbricoides*, *T. trichiura*).
- Presenza di strutture peculiari. Opercoli (ad esempio: *Opisthorchis/Clonorchis* spp.), spine (ad esempio: *Schistosoma* spp.), mammellonature (ad esempio: *A. lumbricoides*) possono aiutare nella diagnosi di specie.
- Stadio di sviluppo. Al momento dell'emissione, in alcune specie le uova sono costituite da un'unica cellula, in altre possono essere costituite da parecchie cellule e in altre possono essere embrionate (contenenti una larva). Occasionalmente, se i campioni di feci sono vecchi di parecchie ore, le uova si possono trovare in stadi più avanzati. Le uova di *Ascaris lumbricoides* hanno in genere al proprio interno una sola cellula quando vengono emesse con le feci; nei campioni vecchi la singola cellula può dividersi e quindi si possono vedere uova con 2, 4, 8 cellule. In campioni vecchi di alcune ore, le uova di *Ancylostoma/Necator* spp. possono contenere 16, 32 o più cellule. In 24-48 ore l'uovo può divenire embrionato e si possono liberare larve nelle feci. Perciò, quando si osserva lo stadio di sviluppo delle uova di elminti, è

necessario assicurarsi che le feci siano state emesse da poco. Se il campione è vecchio ci si deve aspettare di vedere dei cambiamenti nello stadio di sviluppo di alcune specie. L'eventuale aggiunta di formalina o di un altro fissativo, cui seguirà l'arricchimento per concentrazione, va effettuata entro 12 ore dalla evacuazione.

Se viene evidenziato un uovo, o qualcosa che assomigli ad un uovo, vanno considerate le caratteristiche sopra descritte allo scopo di raggiungere una corretta identificazione. A volte si possono osservare uova distorte o atipiche, in questi casi è necessario cercare attentamente forme più tipiche al fine di ottenere una diagnosi attendibile. Occorre ricordare che un individuo può essere parassitato da più specie di elminti o anche da protozoi, per cui la ricerca non deve essere interrotta quando viene ritrovato un tipo di uova: il preparato va sempre esaminato interamente.

In figura 20 sono riportate le dimensioni relative delle uova dei principali elminti che possono parassitare l'uomo e in tabella 4 le caratteristiche utili per l'identificazione.
In Appendice A sono presentate immagini delle uova dei principali elminti intestinali che possono infettare l'essere umano.

Fig. 20. Dimensioni relative delle uova di elminti.



Da: Bernieri F, Crotti D, Galli D, Raglio A. Manuale Illustrato di Diagnostica Parassitologica (modificata)

Tabella 4. Caratteristiche delle uova di elminti.

***Taenia* spp.**	***Hymenolepis nana***	***Hymenolepis diminuta***
- Rotonde o leggermente ovali, diametro 30-35 µm. - Parete spessa, marrone con strie radiali, che circonda l'embrione. - Tre paia di uncini nell'embrione.	- Ovali o rotonde, incolori, diametro 30-50 µm. - Tre paia di uncini nell'embrione. - Dai due poli originano filamenti che circondano l'embrione.	- Ovali o rotonde, giallo chiaro, diametro 70-85 µm. - Tre paia di uncini nell'embrione. - Assenti i filamenti polari.
Dibothriocephalus latus	***Opisthorchis/Clonorchis* spp.**	***Dicrocoelium dendriticum***
- Ovali, giallo pallido, dimensioni 55-70 x 40-50 µm. - Ad un polo hanno un opercolo non sempre ben visibile. - Contengono una massa granulare di cellule. - A volte è visibile una protuberanza al polo non opercolato.	- Ovali, giallo marrone, dimensioni 19-30 x 1-20 µm. - Chiaramente visibile un opercolo e, sul lato opposto, una protuberanza. - Visibile un orletto nel punto su cui si appoggia l'opercolo. - A maggior ingrandimento è visibile una membrana che riveste il guscio.	- Ovali, marrone, dimensioni 35-45 x 20-30 µm. - Presentano un opercolo. - Nelle infezioni spurie (uova presenti per ingestione passiva), nelle uova, di colore più chiaro, non è possibile evidenziare un interno ben definito.
***Paragonimus* spp.**	***Fasciola /Fasciolopsis* spp.**	***Schistosoma mansoni***
- Ovali, giallo marrone, a volte leggermente appiattite al polo non opercolato, dimensioni 80-120 x 45-70 µm. - Ad un polo hanno un opercolo. - Lo spessore della parete varia, è più spesso al polo opposto a quello dell'opercolo.	- Grandi, ovali, giallo marrone, dimensioni 130-150 x 60-90 µm. - Presentano un opercolo. - Contengono una massa non segmentata dall'aspetto granulare.	- Ovali, giallo marrone, dimensioni 114-180 x 54-70 µm. - Presenza di una spina laterale. - Contengono un miracidio completamente sviluppato.
Schistosoma haematobium	***Schistosoma intercalatum***	***Schistosoma japonicum***
- Ovali, incolori, giallo chiaro, dimensioni 110-170 x 40-70 µm. - Presenza di una spina terminale. - Contengono un miracidio completamente sviluppato. - Sono eliminate con le urine (eccezionalmente con le feci).	- Simili a quelle di *S. haematobium*, ma in genere più lunghe (140-240 µm). - Di frequente hanno un rigonfiamento nella parte centrale. - Sono eliminate con le feci e non con le urine.	- Rotonde o ovali, incolori o giallo pallido, dimensioni 70-100 x 55-65 µm. - A volte presenza di una piccola spina rudimentale. - Contengono un miracidio completamente sviluppato.
Schistosoma mekongi	***Ascaris lumbricoides*** (uova fertili)	***Ascaris lumbricoides*** (uova non fertili)
- Simili a quelle di *S. japonicum*, ma più piccole, dimensioni 50-80 x 40-65 µm.	- Ovali o rotonde, giallo marrone, ricoperte da uno strato granulare albuminoso, dimensioni 60 x 40 µm. - Contengono un'unica massa granulare non segmentata. - Talvolta perdono il rivestimento (uova decorticate).	- Ovali allungate, dimensioni 90 x 45 µm. - Più scure delle uova fertili, con rivestimento più spesso.
Enterobius vermicularis	***Trichuris trichiura***	***Paracapillaria philippinensis***
- Ovali, incolori, con parete netta, dimensioni 50-60 x 20-30 µm. - Un lato è appiattito. - Le uova mature (da Scotch test) contengono una larva. - Le uova da feci non sono in genere larvate.	- Ovali, giallo marrone, dimensioni 50-55 x 20-25 µm. - Ai poli presentano un tappo mucoso incolore. - Contengono una massa granulare centrale non segmentata.	- Ovali, giallo grigie, dimensioni 35-45 x 20-25 µm. - Presentano due protuberanze polari piatte. - La parete dell'uovo è striata.
***Ancylostoma/Necator* spp.**	***Trichostrogylus* spp.**	
- Ovali, incolori, con parete sottile che appare come una linea scura, dimensioni 60-67 x 35-40 µm. - Contengono una massa di solito segmentata. - Se il campione ha più di 24-48 ore (a temperatura ambiente) contengono una larva che può fuoriuscire (vedi identificazione delle larve).	- Simili alle uova di *Ancylostoma/Necator*, ma più lunghe, dimensioni 75-95 x 40-50 µm. - Di frequente assottiglia ad un'estremità.	

Da: Bernieri F, Crotti D, Galli D, Raglio A. Manuale Illustrato di Diagnostica Parassitologica (modificata)

10.2 IDENTIFICAZIONE DELLE LARVE

In campioni di feci fresche le larve che in genere si possono trovare sono le larve rabditoidi di *Strongyloides* spp (in pazienti autoctoni *S. stercoralis*). Se le feci sono state emesse da più di 12 ore e conservate a temperatura ambiente, le larve rabditoidi (L1) possono svilupparsi in larve filariformi (L3 stadio infettivo). Ricordarsi che la presenza di larve filariformi in feci appena emesse può essere indice di una iperinfestazione sistemica.

Le larve di *Strongyloides stercoralis* vanno differenziate da quelle di *Ancylostoma/Necator* spp. che, come già detto, possono essere presenti in feci eliminate da più di 24-48 ore e conservate a temperatura ambiente (per evitare tale stato di cose, se entro le prime 12 ore non si può procedere all'esame standard di concentrazione delle feci è opportuno fissare i campioni fecali con formalina o altro fissativo).

È evidente che la distinzione tra le due specie ha senso solo per i pazienti che provengono da zone endemiche per *Ancylostoma/Necator* spp.

Le caratteristiche differenziali tra le due specie e, all'interno di queste, tra larve rabditoidi e larve filariformi, sono indicate in tabella 5 e in figura 21.

In Appendice A sono presentate immagini delle larve di nematodi intestinali.

Tabella 5. Caratteristiche delle larve di elminti.

LARVE RABDITOIDI (L 1)

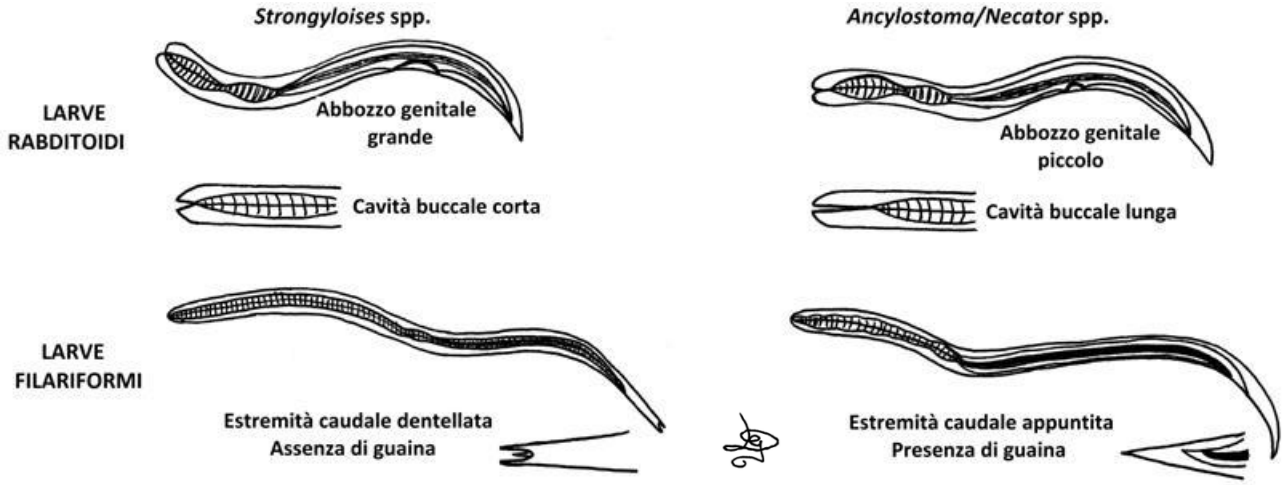
CARATTERISTICHE SALIENTI	***Strongyloides* spp.**	***Ancylostoma/Necator* spp.**
- Grandezza: - Cavità buccale: - Esofago: - Abbozzo genitale: - Poro anale:	- 180-380 x 14-20 µm. - Corta (4 µm). - 1/3 della lunghezza del corpo con 2 strozzature. - Grande (22 µm). - A 50 µm dall'estremità caudale.	- 250-300 x 15-20 µm. - Lunga (15 µm). - 1/3 della lunghezza del corpo con 2 strozzature. - Piccolo (7 µm). - A 80 µm dall'estremità caudale.

LARVE FILARIFORMI (L 3)

CARATTERISTICHE SALIENTI	***Ancylostoma/Necator* spp.**	***Ancylostoma/Necator* spp.**
- Grandezza: - Guaina: - Esofago: - Estremità caudale:	- 500-600 x 14-20 µm. - Assente. - 1/2 della lunghezza del corpo, senza strozzature. - A 2-3 punte (dentellata) o smussata.	- 500-700 x 15-20 µm. - Presente. - 1/3 della lunghezza del corpo, senza strozzature. - Appuntita.

Da: Bernieri F, Crotti D, Galli D, Raglio A. Manuale Illustrato di Diagnostica Parassitologica (modificata)

Fig. 21 Caratteristiche delle larve di elminti.



Da: Bernieri F, Crotti D, Galli D, Raglio A. Manuale Illustrato di Diagnostica Parassitologica (modificata)

11 IDENTIFICAZIONE MICROSCOPICA DEI PROTOZOI

I principali protozoi che possono parassitare l'intestino umano appartengono a 6 gruppi: amebe, flagellati, ciliati, stramenopili, coccidi, e microsporidi (vedi “Introduzione”).

Per quanto riguarda amebe, flagellati e ciliati, nelle feci si possono ritrovare sia trofozoiti che cisti. Come indicato nel paragrafo “Tecniche diagnostiche dirette” in genere i trofozoiti si ritrovano più facilmente nelle feci diarroiche liquide, mentre le cisti in quelle formate o semi formate. Comunque le due forme possono essere presenti nel medesimo campione.

Per gli stramenopili (*Blastocystis* spp.) vanno evidenziate le forme vacuolari e/o le forme granulari; le forme ameboidi e le forme cistiche sono del tutto eccezionali.

Per quanto concerne i coccidi di interesse medico le forme che si debbono cercare nei campioni fecali sono le oocisti.

Per i microsporidi, le forme diagnostiche da ricercare sono le spore.

Nelle tabelle riportate in questo paragrafo sono indicate le misure (lunghezza, larghezza) dei trofozoiti, delle cisti e delle oocisti dei protozoi, che spesso risultano indispensabili per una corretta diagnosi di specie o almeno di genere. A solo titolo di esempio: le cisti di *E. hartmanni* e quelle di *E. histolytica/dispar* sono morfologicamente molto simili, ma le prime misurano mediamente 6-8 µm, le seconde 12-15 µm; le oocisti di *Cryptospoydium* spp e quelle di *C. cayetanensis*, con le colorazioni di Ziehl-Neelsen o di Kinyoun, sono tra di loro difficilmente distinguibili, ma le prime misurano mediamente 4-6 µm, le seconde 8-10 µm.

Nelle varie fonti bibliografiche consultate (OMS, CDC, CLSI, PHLS, Garcia L. S., Petithory J. C.) spesso vi sono differenze, sia pur non rilevanti, nelle misure riportate per i vari parassiti. Questo può dipendere da diversi fattori quali: la quantità delle misurazioni effettuate per il calcolo delle misure medie e dei *range* di grandezza, l’accuratezza nelle misurazioni, ma soprattutto il tipo di preparato esaminato. Ad esempio nei campioni conservati in formalina (o altri conservanti contenenti formalina o alcooli) oppure nei preparati colorati, i trofozoiti e le cisti di amebe, ma non solo, subiscono una disidratazione che ne provoca un restringimento, per cui alla misurazione risultano più piccoli rispetto a quelli misurati da preparati “a fresco” senza conservanti.

In Appendice B sono presentate immagini di trofozoiti, cisti e oocisti dei protozoi intestinali.

11.1 IDENTIFICAZIONE DEI TROFOZOITI AMEBICI

In questo paragrafo vengono illustrate anche le caratteristiche di *Dientamoeba fragilis* che pur essendo un flagellato, presenta un trofozoite simile a quello delle amebe.

Preparati con soluzione fisiologica (Esame microscopico diretto)

Nelle feci fresche, esaminate poco dopo l’emissione, osservando al microscopio a 400 ingrandimenti è possibile rilevare trofozoiti e evidenziare sia il tipo di movimento sia le eventuali inclusioni (emazie, lieviti, batteri ecc.).

Mentre i trofozoiti di *Entamoeba coli* emettono pseudopodi in tutte le direzioni e hanno movimenti torpidi senza mostrare una chiara direzione di traslazione, i trofozoiti di *Entamoeba histolytica/dispar* hanno un movimento rapido unidirezionale.

Si ricorda che microscopicamente non è di norma possibile distinguere tra *E. histolytica*, patogena, e *E. dispar*, non patogena, per la cui differenziazione si deve ricorrere a tecniche immunoenzimatiche o di biologia molecolare (vedi a pag. 29 e a pag. 31). Non è più praticamente in uso la tipizzazione zimodemica dei trofozoiti isolati da coltura.

Il solo caso in cui è possibile la diagnosi microscopica diretta di *E. histolytica* "sensu stricto" si verifica quando nel campione sono presenti trofozoiti contenenti emazie, segno di invasività del protozoo:

MOBILITÀ UNIDIREZIONALE VELOCE + EMAZIE INCLUSE = *ENTAMOEBA HISTOLYTICA* "SENSU STRICTO"

Si rammenta che anche i macrofagi, a volte presenti nelle feci, possono avere movimenti ameboidi e contenere emazie fagocitate.
Con questo tipo di preparati il nucleo non è chiaramente visibile (tranne per *E. coli*).

Preparati con soluzione iodata (Esame microscopico diretto e/o dopo concentrazione)

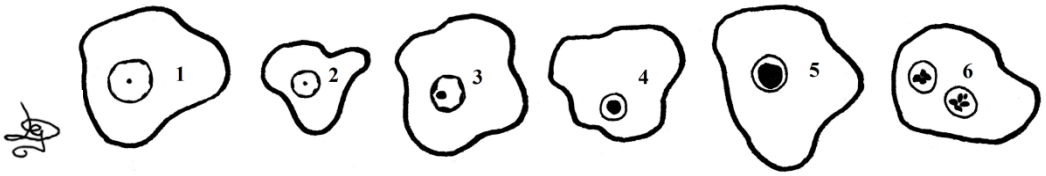
Con questa colorazione estemporanea (vedi a pag. 23) i trofozoiti si immobilizzano e possono coartarsi. La soluzione a base di iodio permette di evidenziare i nuclei dei trofozoiti.
Pur potendosi identificare, con questa colorazione estemporanea, le varie specie di amebe, per una più accurata diagnosi di genere e di specie sono consigliabili le tecniche di colorazione permanente.

Preparati con colorazioni permanenti (Tricromica, Ematossilina ferrica, Giemsa)

La colorazione tricromica e la colorazione con Ematossilina ferrica (vedi a pag. 24) sono consigliate per identificare tutte le amebe. La scelta tra l'una e l'altra è in funzione di alcune variabili quali il fissativo impiegato, tempo a disposizione ecc., ma anche dalle preferenze personali.
I trofozoiti possono apparire rotondi, allungati o di forma irregolare.
Negli strisci colorati con Tricromica, il citoplasma si colora generalmente in verde o blu verde, mentre il nucleo, la cromatina periferica ed il cariosoma si colorano in rosso o in rosso porpora.
Nelle preparazioni colorate con Ematossilina ferrica le varie strutture, ben distinguibili, appaiono colorate in blu, grigio e nero.
Con entrambe le colorazioni si possono osservare trofozoiti a diversi stadi maturativi; la asincronia maturativa tra nucleo e citoplasma può fare rilevare, a volte, la presenza di trofozoiti binucleati.
La colorazione di Giemsa (vedi a pag. 25) è raccomandata per *D. fragilis*, data anche la sua semplicità e rapidità d'esecuzione.
Negli strisci colorati con Giemsa, il citoplasma si colora in azzurro grigio, mentre il nucleo si colora in rosso violetto più o meno scuro.

In tabella 6 sono riportate le caratteristiche morfologiche dei nuclei dei trofozoiti delle amebe intestinali e di *D. fragilis*.
In tabella 7 sono riportate le descrizioni delle caratteristiche morfologiche differenziali dei trofozoiti delle amebe intestinali e di *D. fragilis*.
In figura 22 è riportata la rappresentazione schematica dei trofozoiti delle amebe intestinali e di *D. fragilis*.

Tabella 6. Caratteristiche dei nuclei dei trofozoiti delle amebe intestinali e di *D. fragilis*.

TROFOZOITI (caratteristiche del nucleo)

***Entamoeba histolytica*/*dispar* (1)**, ***Entamoeba. hartmanni* (2)** Cariosoma centrale o subcentrale. Cromatina periferica distribuita regolarmente.
***Entamoeba coli* (3)** Cariosoma eccentrico. Cromatina periferica distribuita irregolarmente, a zolle.
***Endolimax nana* (4)** Cariosoma voluminoso, compatto, centrale o eccentrico, di forma variabile, rotondo, lobulato o irregolare. Delicata membrana nucleare senza cromatina periferica.
***Iodamoeba bütschlii* (5)** Cariosoma voluminoso, compatto, circondato da fini granuli o disposti solo da un lato a forma di cuffia. Delicata membrana nucleare senza cromatina periferica.
***Dientamoeba fragilis* (6)** Cariosoma formato da 2 a 8 granuli o zolle di cromatina. Delicata membrana nucleare senza cromatina periferica.

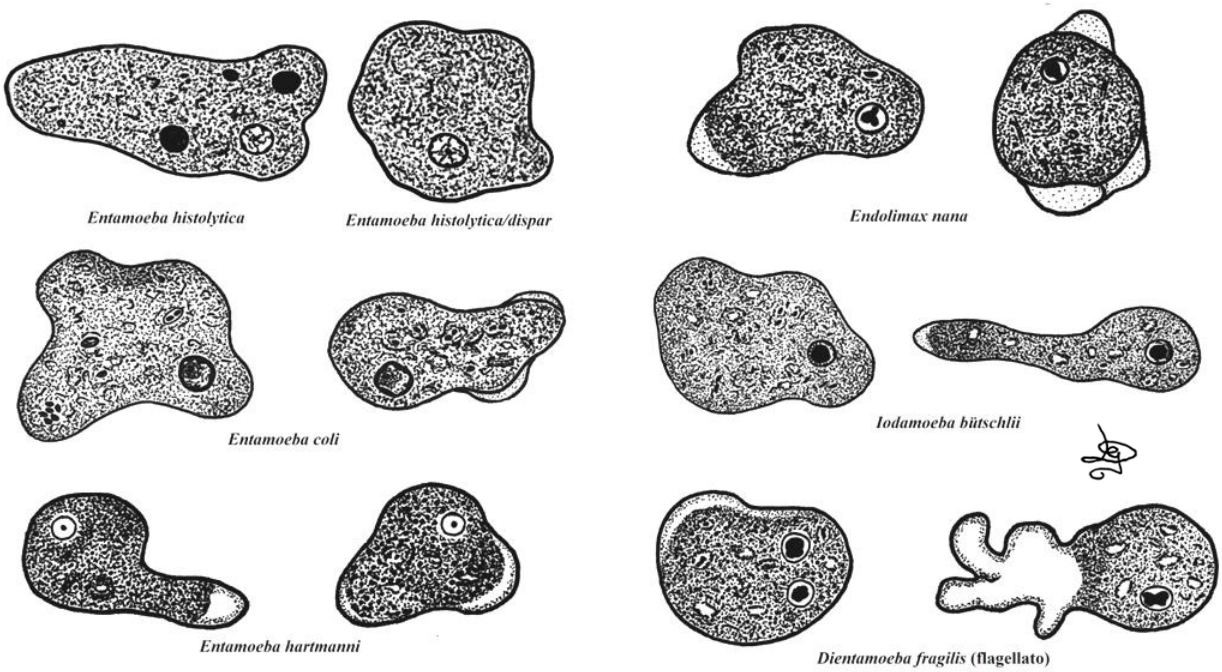
Da: Bernieri F, Crotti D, Galli D, Raglio A. Manuale Illustrato di Diagnostica Parassitologica (modificata)

Tabella 7. Caratteristiche dei trofozoiti delle amebe intestinali (inclusa *D. fragilis*).

			NUCLEO		**CITOPLASMA**		
Specie	**Dimensioni (lunghezza µm)**	**Mobilità**	**Nr**	**Cromatina periferica**	**Cariosoma**	**Apparenza**	**Inclusioni**
Entamoeba histolytica* *Entamoeba dispar	Media: 12-20. *Range*: 10-60. (60 µm nelle forme invasive).	Progressiva veloce unidirezionale con pseudopodi ialini.	1	Usualmente sottile e uniforme (o piccoli granuli disposti in maniera regolare).	Di solito piccolo, compatto centrale (talora appena eccentrico).	Pulito o delicatamente granulare.	Emazie (*E. histolytica* forme invasive), batteri, lieviti.
Entamoeba. coli	Media: 20-25. *Range*: 15-50.	Lenta, non progressiva, multidirezionale.	1	Non uniforme.	Grande, rotondo e di solito eccentrico.	Grossolano e granuloso, spesso con vacuoli.	Batteri, lieviti, altri residui.
Entamoeba hartmanni	Media: 8-10 *Range* 5-12	Di solito non progressiva.	1	Simile a *E. histolytica*.	Piccolo, compatto, di solito centrale.	Finemente Granulare.	Batteri.
Endolimax nana	Media: 8-10. *Range*: 6-15.	Simile a *E. coli*.	1	Assente.	Grande e rotondo, anche irregolare o accollato alla parete.	Granulare, vacuolato.	Batteri.
Iodamoeba bütschlii	Media: 12-15. *Range*: 8-20.	Simile a *E. coli*.	1	Assente.	Voluminoso, centrale o accollato alla parete, circondato da fini granuli.	Granulare, vacuolato.	Batteri, lieviti, altri residui.
Dientamoeba fragilis (flagellato)	Media: 8-15. *Range*: 5-35.	Molto blanda con pseudopodi anche angolari	1-2 (*)	Assente.	Frammentata in granuli (di solito da 4 a 8).	Finemente granulare.	Batteri.
(*) In genere due nuclei anche se circa il 30% dei trofozoiti può presentare un solo nucleo.							

Da: Bernieri F, Crotti D, Galli D, Raglio A. Manuale Illustrato di Diagnostica Parassitologica (modificata)

Fig. 22. Rappresentazione schematica dei trofozoiti delle amebe intestinali (inclusa *D. fragilis*)



Da: Bernieri F, Crotti D, Galli D, Raglio A. Manuale Illustrato di Diagnostica Parassitologica (modificata)

11.2 IDENTIFICAZIONE DELLE CISTI AMEBICHE

L'accurata misurazione delle cisti (ancor più che dei trofozoiti), per mezzo di un oculare micrometrico, è essenziale per una corretta identificazione (vedi "Appendice tecnica").

Unica alternativa all'oculare micrometrico è l'uso di un microscopio munito di telecamera che permetta di misurare gli oggetti osservati.

Per l'identificazione delle cisti amebiche non è solitamente necessario ricorrere alle colorazioni permanenti.

Preparati con soluzione fisiologica (Esame microscopico diretto e/o dopo concentrazione)

Utilizzando l'obiettivo a 40X (400 ingrandimenti), cercare elementi rotondi rifrangenti; osservare anche l'eventuale presenza di corpi cromatoidi, che possono essere presenti nelle cisti del solo genere Entamoeba (*E. histolytica/dispar*, *E. hartmanni*, *E. coli*), in particolare in quelle immature.

I corpi cromatoidi di *E. histolytica/dispar* e di *E. hartanni* hanno estremità arrotondate (a forma di sigaro), mentre quelli di *E. coli* hanno estremità sfrangiate e appuntite, a volte riuniti in fascio.

I corpi cromatoidi sono meglio rilevabili nei preparati con soluzione iodata o con le colorazioni permanenti o ancor meglio con una specifica colorazione estemporanea detta di Sargeaunt (vedi "Appendice tecnica").

I nuclei non sono facilmente visibili nei preparati con soluzione fisiologica, mentre si vedono bene nei preparati con soluzione iodata.

Si ricorda che oltre che le dimensioni, è molto importante per la corretta identificazione delle cisti amebiche la struttura dei nuclei che è del tutto simile a quella dei nuclei dei trofozoiti (vedi Tabella 6).

Preparati con soluzione iodata (Esame microscopico diretto e/o dopo concentrazione)

La colorazione estemporanea con soluzione iodata (Dobell, Lugol 1:5, D'Antoni) permette di evidenziare i nuclei e il glicogeno eventualmente presente nelle cisti immature, in forma diffusa (*Entamoeba* spp) o in forma compatta (*I. bütschlii*).

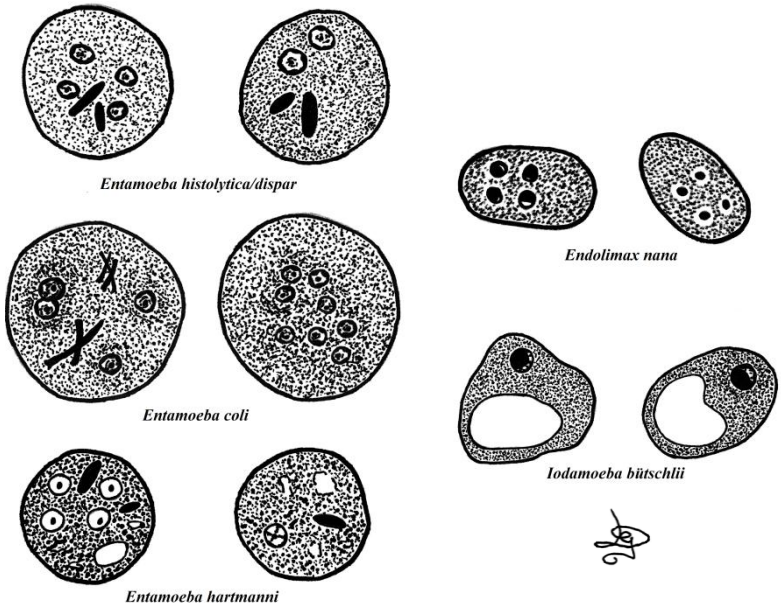
Preparati con colorazioni permanenti (Tricromica, Ematossilina ferrica)

Le colorazioni permanenti possono non aggiungere molto nell'identificazione delle cisti di amebe diversamente da quanto riferito per i trofozoiti (e questo vale anche per le cisti dei flagellati). Peraltro, altrettanto non di rado, in particolare nelle infezioni miste, soltanto una colorazione Tricromica o con Ematossilina ferrica può garantire una sicurezza diagnostica, grazie alla valutazione delle caratteristiche morfologiche soprattutto dei nuclei.

In figura 23 è riportata la rappresentazione schematica delle cisti delle amebe.

In tabella 8 sono riportate le descrizioni delle caratteristiche morfologiche differenziali delle cisti delle amebe.

Fig. 23. Rappresentazione schematica delle cisti delle amebe intestinali.



Da: Bernieri F, Crotti D, Galli D, Raglio A. Manuale Illustrato di Diagnostica Parassitologica (modificata)

Tabella 8. Caratteristiche delle cisti di amebe intestinali.

			NUCLEO			CITOPLASMA	
Specie	**Dimensioni (lunghezza µm)**	**Forma**	**Numero**	**Cromatina periferica**	**Cariosoma**	**Corpi cromatoidi**	**Glicogeno**
Entamoeba histolytica Entamoeba dispar	Media: 12-15. *Range*: 10-25.	Di solito sferica.	4 (nelle forme immature: 1 o 2).	Finemente granulare e uniformemente distribuita.	Piccolo e compatto, di solito centrale.	Presenti ad estremità arrotondate.	Diffuso, di solito in vacuolo nelle cisti giovani.
Entamoeba coli	Media: 15 25. *Range*: 10-35.	Di solito sferica, ma spesso ovale o variata.	8 (talora 16) da 1 a 8 nelle immature.	Grossolana, disposta irregolarmente.	Compatto e diffuso, eccentrico o centrale.	Quando presenti ad estremità appuntite.	Come in *E. histolytica*.
Entamoeba hartmanni	Media: 6-8. *Range*: 5-10.	Rotonda.	4 (nelle forme immature: 1 o 2).	Simile a *E. histolytica*.	Simile a *E. histolytica*.	Presenti ad estremità arrotondate.	Simile a *E. histolytica*.
Endolimax nana	Media: 6-8. *Range*: 5-10.	Rotonda o ellittica.	4 (a volte visibili solo 2-3).	Assente.	Grosso e centrale.	Assenti o ammassi che li mimano.	Simile a *E. histolytica*.
Iodamoeba bütschlii	Media: 10-12. *Range*: 5-20.	Più ovale che tondeggiante.	1	Assente.	Voluminoso ed eccentrico.	Come in *E. nana*.	Grosso vacuolo di glicogeno.

Da: Bernieri F, Crotti D, Galli D, Raglio A. Manuale Illustrato di Diagnostica Parassitologica (modificata)

11.3 IDENTIFICAZIONE DEI TROFOZOITI DI FLAGELLATI

Le specie di flagellati intestinali patogene per l'uomo sono *Giardia duodenalis* e *Dientamoeba fragilis*. Quest'ultima, per motivi di diagnostica microscopica, è stata descritta nel paragrafo riguardante l'identificazione dei trofozoiti amebici.

Preparati con soluzione fisiologica (Esame microscopico diretto e/o dopo concentrazione)

I trofozoiti di *G. duodenalis* sono piriformi, hanno 2 nuclei, misurano 10-20 µm (media di 12-15 µm) x 6 µm circa, presentano una concavità ventrale con un disco adesivo e possiedono 8 flagelli. La concavità ventrale dà ai trofozoiti visti di profilo la caratteristica forma a "cucchiaio".

Tali trofozoiti si possono ritrovare in campioni di feci diarroiche appena emesse e in campioni di liquido duodenale prelevati con endoscopia o per mezzo dello *String Test* (vedi a pag. 36).

La tipica mobilità a "foglia cadente" dei trofozoiti (visibile nei preparati "a fresco" da liquido duodenale o dalle feci appena emesse, ma non dopo concentrazione) non è sempre facilmente apprezzabile; i trofozoiti possono essere intrappolati in frammenti di muco e l'unico movimento visibile è l'agitarsi dei flagelli.

Preparati con soluzione iodata (Esame microscopico diretto e/o dopo concentrazione)

In questi preparati è possibile evidenziare strutture interne dei trofozoiti quali i nuclei e, soprattutto in *G. duodenalis*, i corpi parabasali e l'assonema.

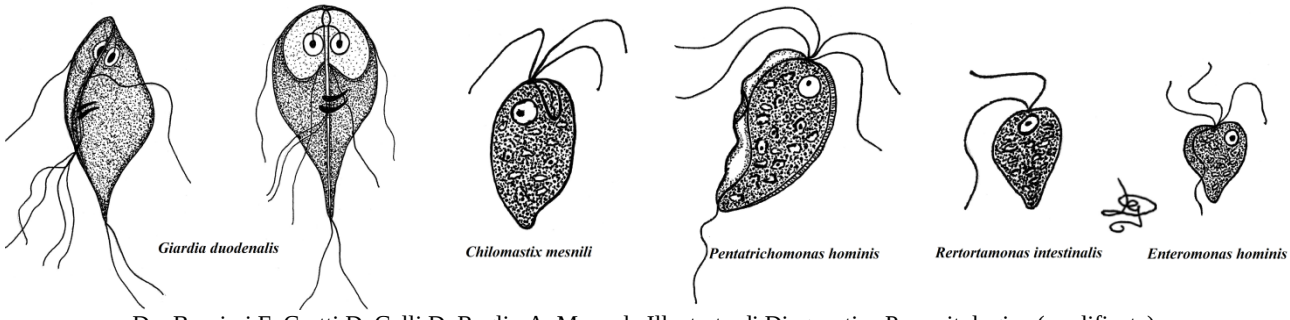
Preparati con colorazioni permanenti (Tricromica, Ematossilina ferrica, Giemsa)

Con l'eccezione di *D. fragilis* per la quale è stato già detto in precedenza (raccomandata la colorazione di Giemsa), per l'identificazione degli altri flagellati, in particolare *G. duodenalis* e *Chilomastix mesnili*, non sono in genere necessarie le colorazioni permanenti essendo sufficiente la colorazione estemporanea con soluzione iodata. Comunque per poter ben evidenziare le caratteristiche dei nuclei e dei flagelli le colorazioni con Giemsa, oppure meglio ancora, con Tricromica o con Ematossilina ferrica rimangono molto utili.

In figura 24 è riportata la rappresentazione schematica dei trofozoiti dei principali flagellati intestinali, escluso *D. fragilis*.

In tabella 9 sono riportate le descrizioni delle caratteristiche morfologiche differenziali dei trofozoiti dei principali flagellati intestinali, escluso *D. fragilis*.

Fig. 24. Rappresentazione schematica dei trofozoiti dei flagellati intestinali.



Da: Bernieri F, Crotti D, Galli D, Raglio A. Manuale Illustrato di Diagnostica Parassitologica (modificata)

Tabella 9. Caratteristiche dei trofozoiti dei flagellati intestinali.

Specie	Dimensioni (µm)	Forma	Mobilità	Nuclei (*)	Numero dei flagelli	Altre caratteristiche
Giardia duodenalis	Lunghezza: 10-20. Larghezza: 5-12.	A pera, a cucchiaio (di profilo).	A foglia cadente.	2	8 4 laterali, 2 ventrali, 2 caudali.	Disco adesivo, assonema, corpi para basali.
Chilomastix mesnili	Lunghezza: 12-20. Larghezza: 5-6.	A pera.	Rotatoria.	1, con un cariosoma di frequente eccentrico.	4 3 anteriori, 1 nel citostoma	Prominente citostoma.
Pentatrichomonas hominis	Lunghezza: 10-15. Larghezza: 7-10.	A pera.	A scatti.	1 con un piccolo cariosoma.	4-6 3-5 anteriori, 1 posteriore.	Prominente membrana ondulante con continui movimenti.
Retortamonas intestinalis	Lunghezza: 3-6. Largheza: 3-5.	A pera, ovale.	Rotazione a scatti.	1, con un piccolo cariosoma.	2 anteriori o 1 anteriore e 1 posteriore.	Citostoma piccolo e poco profondo.
Enteromonas hominis	Lunghezza: 3-6.	Ovale, a pera.	A scatti.	1, con un piccolo cariosoma.	4 3 anteriori, 1 posteriore.	Non visibile il citostoma.
(*) Ad eccezione di *G. duodenalis* i nuclei degli altri flagellati non sono in genere visibili nei preparati non colorati.						

Da: Bernieri F, Crotti D, Galli D, Raglio A. Manuale Illustrato di Diagnostica Parassitologica (modificata)

11.4 IDENTIFICAZIONE DELLE CISTI DI FLAGELLATI

Le cisti di *G. duodenalis*, rispetto ai trofozoiti, sono la forma diagnostica più facilmente riscontrabile, in particolare se le feci non sono diarroiche. Le cisti sono ovali (talvolta appaiono rotondeggianti), misurano circa 8-14 µm x 8-9 µm, contengono 4 nuclei e residui dell'assonema, dei corpi parabasali e dei flagelli. A volte l'organismo appare staccato dalla parete cistica e le strutture interne non sono ben visibili, comunque la forma e le dimensioni restano indicative.

L'osservazione diretta in soluzione fisiologica, preferibilmente dopo concentrazione, è di solito più che soddisfacente e sufficiente per l'identificazione.

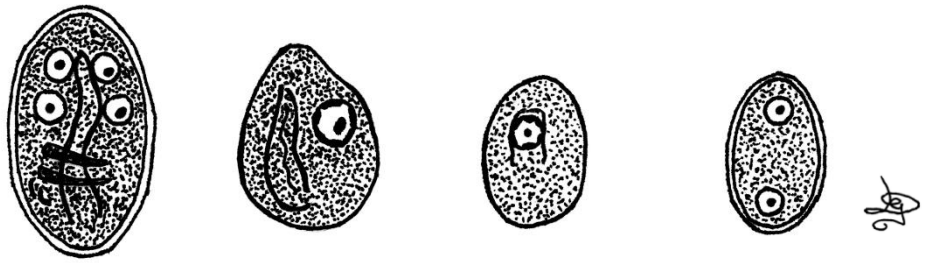
In soluzione iodata le cisti di *G. duodenalis* assumono un colore giallo bruno. La colorazione con iodio consente di visualizzare più facilmente le strutture interne.

In figura 25 è riportata la rappresentazione schematica delle cisti dei principali flagellati intestinali.

In tabella 10 sono riportate le descrizioni delle caratteristiche morfologiche differenziali delle cisti dei principali flagellati intestinali

P. hominis non presenta forme cistiche, mentre per *D. fragilis* sono state descritte in modelli animali, ma anche nell'uomo, forme cistiche di dimensioni di circa 5 µm. Il riscontro in campioni clinici di queste cisti è rarissimo se non del tutto eccezionale e non viene preso in considerazione in questo documento.

Fig. 25. Rappresentazione schematica delle cisti dei flagellati intestinali.



Giardia duodenalis *Chilomastix mesnili* *Retortamonas intestinalis* *Enteromonas hominis*

Da: Bernieri F, Crotti D, Galli D, Raglio A. Manuale Illustrato di Diagnostica Parassitologica (modificata)

Tabella 10. Caratteristiche delle cisti dei flagellati intestinali

Specie	Dimensioni (µm)	Forma	Nuclei(§)	Altre caratteristiche
Giardia duodenalis	Lunghezza: 8-14. Larghezza: 8-9.	Ovale.	Usualmente 4: siti ad una estremità.	Diverse strutture interne variamente apprezzabili (fibrille, flagelli); citoplasma talora retratto.
Chilomastix mesnili	Lunghezza: 6-10. Larghezza: 4-6.	Ovale, a forma di limone.	1, con un cariosoma di frequente eccentrico, sottile cromatina periferica.	A volte riconoscibile l'abbozzo del citostoma e dei flagelli.
Retortamonas intestinalis	Lunghezza: 4-7. Range: 3-4.	Ovale, a volte simile a *C. mesnili*.	1, con un piccolo cariosoma e con sottile cromatina periferica.	A volte visibile un flagello a U rovescita con i due rami della U che circondano il nucleo.
Enteromonas hominis	Media: 6-8. Range: 3-4.	Ovale, allungata.	1-4 In genere 2 situati alle opposte estremità della cisti.	Molto raramente visibili fibrille e flagelli.
(§) Ad eccezione di *G. duodenalis* i nuclei degli altri flagellati non sono in genere visibili nei preparati non colorati.				

Da: Bernieri F, Crotti D, Galli D, Raglio A. Manuale Illustrato di Diagnostica Parassitologica (modificata)

11.5 IDENTIFICAZIONE DEI CILIATI

L'unico ciliato di interesse medico è *Balantidium coli* che è soprattutto un parassita dei suini.

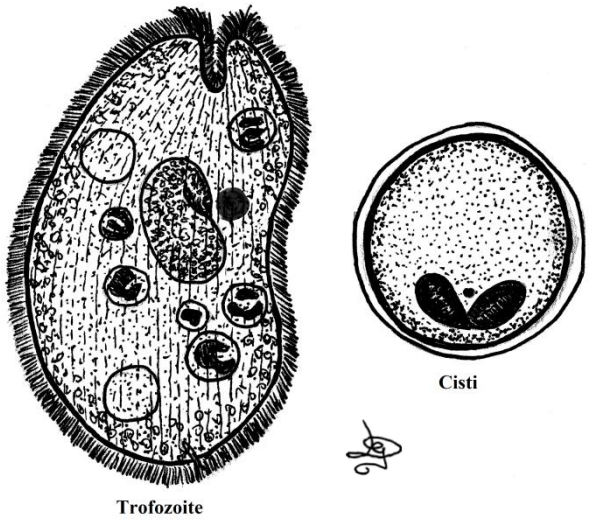
B. coli presenta uno stadio di trofozoita ed uno di cisti (vedi figura 26).

I trofozoiti misurano 50-200 µm di lunghezza x 40-70 µm di larghezza, sono molto attivi e possono essere facilmente visti anche a piccolo ingrandimento (100x). Sono coperti da ciglia che si agitano rapidamente permettendo all'organismo di muoversi. I trofozoiti muoiono in breve tempo al di fuori dell'ospite, quindi per poter apprezzare i movimenti delle ciglia i campioni fecali devono essere esaminati entro un'ora dall'emissione.

Ad un polo presentano un citostoma e al polo opposto è possibile vedere un citopigio. All'interno è spesso visibile un macronucleo a forma di "fagiolo", mentre il micronucleo è più difficilmente visibile; nel citoplasma vi sono molti vacuoli con batteri e detriti ingeriti.

Le cisti misurano 45-75 µm di diametro e sono tondeggianti. All'interno sono presenti un macronucleo spesso a forma di "ferro di cavallo" e un micronucleo.

Fig. 26. Rappresentazione schematica *Balantidium coli*.



Da: Bernieri F, Crotti D, Galli D, Raglio A. Manuale Illustrato di Diagnostica Parassitologica (modificata)

11.6 IDENTIFICAZIONE DEGLI STRAMENOPILI

L'unico protozoo appartenente a questo gruppo che infetta l'uomo è *Blastocystis* spp.

Si conoscono almeno 17 sottotipi di *Blastocystis* di cui 9 possono infettare l'uomo oltre che altri animali; sono tra di loro morfologicamente indistinguibili per cui l'identificazione microscopica può essere unicamente a livello di genere.

Non è ancora accertata la reale patogenicità di *Blastocystis* spp.

Nel campione fecale questo microrganismo può essere presente in diverse forme: forma vacuolare, forma granulare, forma ameboide, forma cistica.

Sebbene tutti questi stadi possano essere presenti, la diagnosi si basa di fatto sul riconoscimento delle forme vacuolari che sono le più frequenti e le più facili da riconoscere.

Le forme granulari sono meno frequentemente viste e le forme ameboidi e cistiche sono estremamente rare oltre che difficili da riconoscere.

Le dimensioni sono molto variabili anche nello stesso campione andando da 5 µm a 40-50 µm, ma il *range* di grandezza usuale è 8-10 µm.

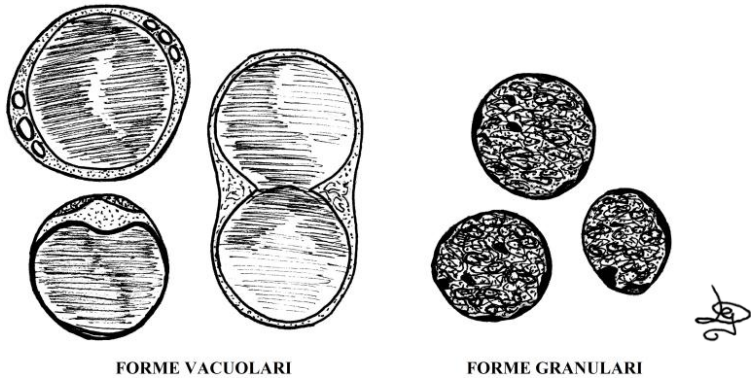
La forma vacuolare è sferica con un grande vacuolo in posizione centrale, il citoplasma è relegato in un sottile bordo periferico nel quale sono visibili i nuclei e i corpi inclusi; non è raro osservare forme in divisione. La forma granulare è simile a quella vacuolare, ma con granulazioni nel citoplasma o nel vacuolo centrale.

L'identificazione è possibile nei preparati "a fresco", meglio se dopo concentrazione, senza alcuna colorazione anche se con la colorazione estemporanea con soluzione iodata si apprezzano meglio le caratteristiche morfologiche.

Le colorazioni permanenti non sono indispensabili per una corretta diagnosi microscopica. Talora, peraltro, una colorazione con Giemsa può tornare utile in quanto *Blastocystis* spp. e *D. fragilis* sono non di rado compresenti e, nei preparati a "fresco", possono essere tra loro confuse; con la colorazione di Giemsa, *Blastocystis* spp. appare colorata in rosa.

In figura 27 è riportata la rappresentazione schematica di *Blastocistis* spp (forme vacuolari e granulari).

Fig. 27. Rappresentazione schematica di *Blastocystis* spp.



Da: Bernieri F, Crotti D, Galli D, Raglio A. Manuale Illustrato di Diagnostica Parassitologica (modificata)

11.7 IDENTIFICAZIONE DELLE OOCISTI DI COCCIDI

I principali coccidi intestinali che possono parassitare l'uomo sono *Cryptosporidium* spp., *Cyclospora cayetanensis*, *Cystoisospora belli* e *Sarcocystis* spp.

Sono conosciute diverse specie di *Cryptosporidium* che possono infettare l'uomo e che sono tra di loro morfologicamente indistinguibili; di conseguenza l'identificazione microscopica può essere unicamente a livello di genere.

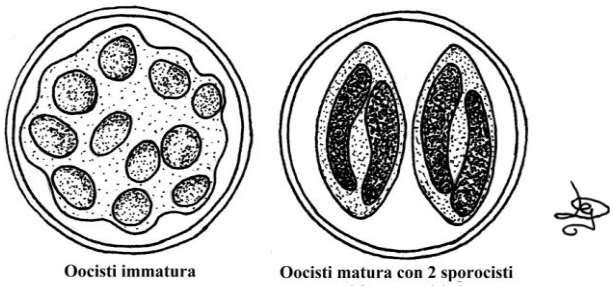
Le oocisti di *Cryptosporidium* spp. assai difficilmente si possono distinguere in soluzione fisiologica o con colorazioni estemporanee iodate. È necessario utilizzare colorazioni permanenti all'alcool-acido resistenza (vedi "Colorazioni per i coccidi" a pag 25).
Osservando a 1.000x in immersione, le oocisti hanno forma sferica e misurano 4-6 µm di diametro; con le colorazioni Ziehl-Neelsen a caldo o a freddo e di Kinyoun, si colorano in rosa, rosso, rosso-viola; non tutte le oocisti si colorano con la medesima intensità, alcune non si colorano affatto e appariranno chiare.

Fig. 28. Rappresentazione schematica di *Cryptosporidium* spp.

Con queste colorazioni è possibile osservare, in alcune oocisti, la presenza degli sporozoiti, da 1 a 4.
Con la colorazione con Auramina o Auramina-Rhodamina (necessario un microscopio a fluorescenza) le oocisti appariranno di colore giallo, giallo-verde.
Si rammenta che il campione migliore per le colorazioni dei coccidi è il sedimento dopo concentrazione.

Le oocisti di *C. cayetanensis* sono organismi sferici di 8-10 µm di diametro, il doppio di *Cryptosporidium* spp. Le forme immature, osservabili nei campioni fecali dei soggetti infetti da questo coccidio, presentano una morula centrale contenente diverse sferule rifrangenti (aspetto a "vetro smerigliato") che sono più facilmente riconoscibili con l'esame "a fresco" piuttosto che dopo le colorazioni all'alcool-acido resistenza.
Invece, le oocisti mature, che di norma non si ritrovano nelle feci, presentano la morula già divisa in due strutture più piccole (sporocisti) contenenti due sporozoiti ciascuna.
Sia direttamente sia nel sedimento ottenuto per concentrazione possono essere evidenziate le oocisti immature che, se osservate con luce ultravioletta (lunghezza d'onda tra 330 e 385 nm), mostrano una fluorescenza blu spontanea (vedi "Autofluorescenza" a pag. 26).
Con le colorazioni alcool-acido resistenti le oocisti in genere si colorano in rosso, in rosa o non si colorano affatto, apparendo così come masse rotondeggianti incolori su uno sfondo del colore del contrastante.

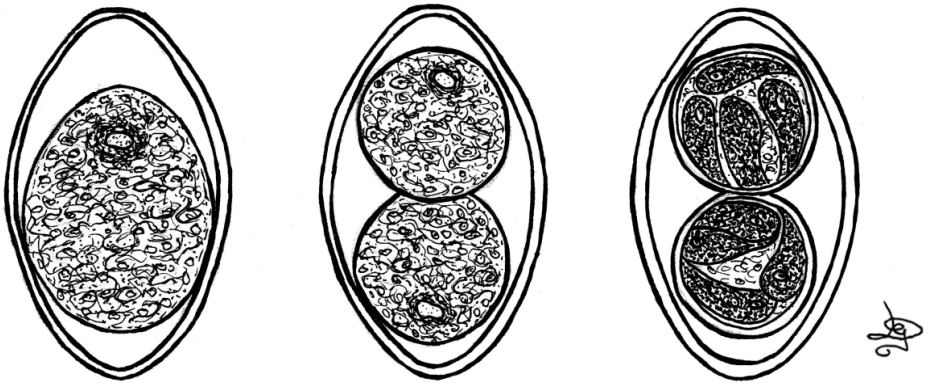
Fig. 29. Rappresentazione schematica di *Cyclospora cayetanensis*.



Da: Bernieri F, Crotti D, Galli D, Raglio A. Manuale Illustrato di Diagnostica Parassitologica (modificata)

La diagnosi di infezione da *C. belli* si effettua evidenziando le oocisti nei preparati fecali sia con esame diretto sia dopo concentrazione. In genere nelle feci si trovano le oocisti immature che sono ovali e misurano 20-33 µm x 10-19 µm e che al centro presentano una massa di protoplasma (lo zigote). È raro trovare nelle feci forme più mature, quali oocisti con due sporoblasti o addirittura con due sporocisti contenenti ciascuna quattro sporozoiti. Le oocisti si osservano molto bene in soluzione fisiologica. Peraltro sono anch'esse acido resistenti e quindi possono essere evidenziate anche con le colorazioni alcool-acido resistenti utilizzate per *Cryptosporidium* spp.
Anche le oocisti di *C. belli* sono autofluorescenti.
Si ricorda come le infezioni intestinali da *C. belli* possano accompagnarsi alla presenza di cristalli di Charcot-Leyden e ad eosinofilia.

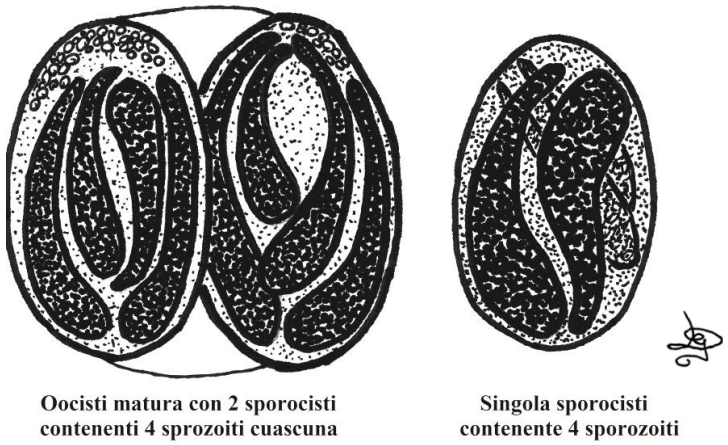
Fig. 30. Rappresentazione schematica di *Cystoisospora belli*.



Da: Bernieri F, Crotti D, Galli D, Raglio A. Manuale Illustrato di Diagnostica Parassitologica (modificata)

Le oocisti di *Sarcocystis* spp misurano 15-20 µm x 15- 20 µm, hanno una sottile parete e contengono 2 sporocisti ovali, di 15-18 µm x 8-10 µm, contenenti 4 sporozoiti ciascuna.
Sono facilmente evidenziabili sia nei preparati con soluzione fisiologica, sia nei preparati con soluzione iodata.
A causa della fragilità della parete delle oocisti nelle feci è possibile trovare anche singole sporocisti.
Esposte alla luce ultravioletta le sporocisti di *Sarcocystis* spp sono autofluorescenti.

Fig. 31. Rappresentazione schematica di *Sarcocystis* spp.



Da: Bernieri F, Crotti D, Galli D, Raglio A. Manuale Illustrato di Diagnostica Parassitologica (modificata)

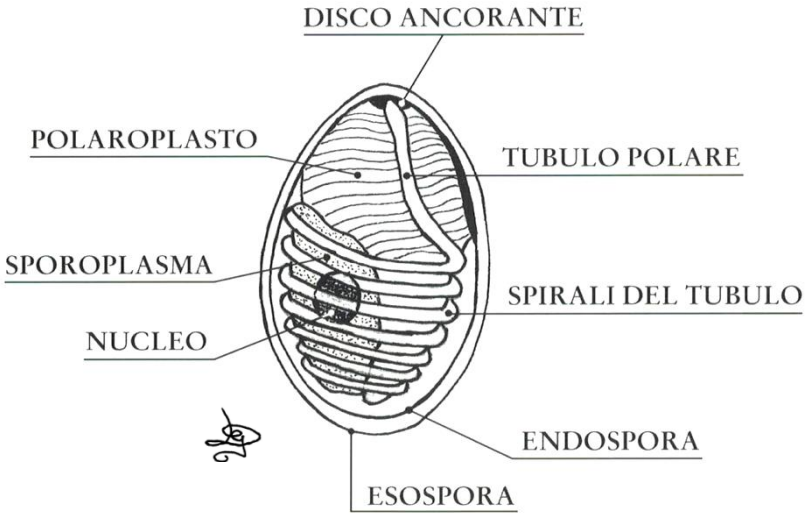
11.8 IDENTIFICAZIONE DEI MICROSPORIDI

La diagnosi di genere e di specie è ottenibile soltanto con la microscopia elettronica o con la biologia molecolare, mentre con la microscopia ottica è possibile effettuare diagnosi generica di microsporidiosi.

Per la ricerca microscopica delle spore vedi il paragrafo “Colorazioni per i microsporidi” a pag. 26.

In figura 2.10 è riportata la struttura schematica di una spora al microscopio elettronico (M. E.).

Fig. 32. Rappresentazione schematica di una spora di microsporidio al M. E.



Da: Bernieri F, Crotti D, Galli D, Raglio A. Manuale Illustrato di Diagnostica Parassitologica (modificata)

12 ALGORITMI DIAGNOSTICI

Come illustrato nel testo non esiste un'unica tecnica che permetta di diagnosticare tutti i parassiti, elminti e protozoi, di interesse medico.

In ogni laboratorio la scelta delle tecniche/metodi e di conseguenza dei parassiti che verranno ricercati, dipende da diversi fattori, il più importante dei quali è la quantità di risorse economiche e di personale messe a disposizione del laboratorio. Principalmente da questo dipende la scelta dei metodi di raccolta e conservazione delle feci (feci fresche, in SAF, in formalina al 10%, in PVA ecc.), la disponibilità unicamente di tecniche tradizionali (esame diretto e dopo concentrazione, colorazioni permanenti ecc.) oppure la disponibilità di tecniche innovative (test immunologici, test di biologia molecolare).

Conseguentemente non è possibile indicare un unico algoritmo diagnostico che tenga conto di tutte le variabili sopra esposte.

Di seguito vengono proposti due algoritmi che in sostanza si basano sulle tecniche a disposizione del laboratorio:

A. disponibilità delle tecniche tradizionali a cui si possono aggiungere i test immunologici per la ricerca di *E. histolytica*, *G. duodenalis*, *Cryptosporidium* spp.;
B. disponibilità di test di biologia molecolare per protozoi.

Questi algoritmi non sono applicabili a casi particolari quali ad esempio lo studio ed il monitoraggio di episodi epidemici o lo studio del microbiota intestinale a scopo di trapianto per i quali è necessario solo il rilevamento di specifici microrganismi (*Blastocystis* spp., G. *duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., Microsporidi ecc.). Non sono altresì applicabili, o solo parzialmente applicabili, quando vi siano richieste per specifici parassiti come ad esempio: *S. stercoralis*, *Cryptosporidium* spp. ecc. o per specifici metodi come ad esempio: sierologia per *E. histolytica*, antigene catodico circolante per *Schistosoma* spp. ecc.

Ovviamente è possibile passare da un algoritmo all'altro. Per esempio, nel dubbio di *E. histolytica* o in caso di necessità di approfondimento diagnostico per microsporidi, dall'algoritmo A si può procedere al B chiedendo ad altro laboratorio l'esecuzione del necessario test bio-molecolare.

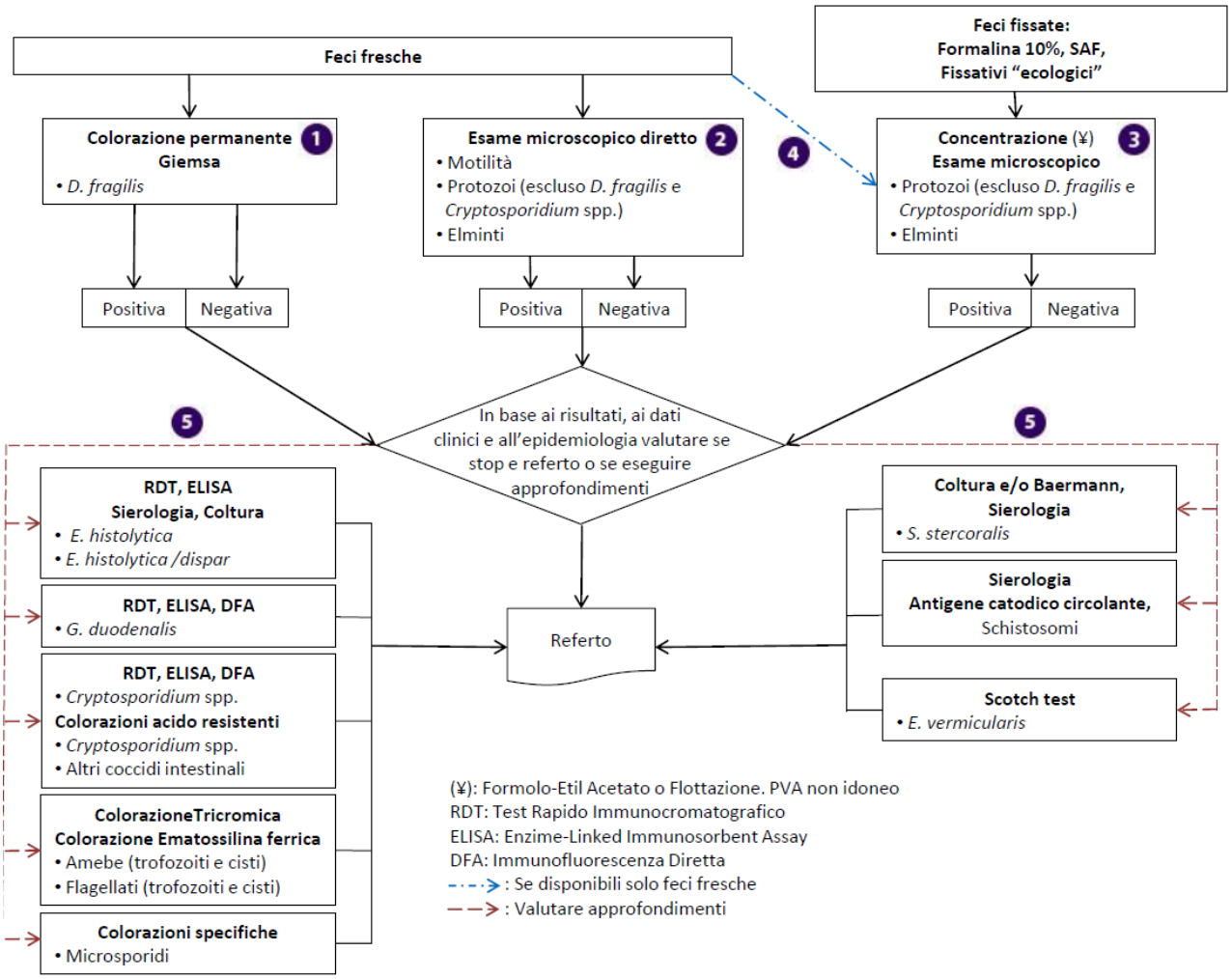
Infine negli algoritmi qui presentati non si è considerato l'uso routinario della biologia molecolare per la ricerca degli elminti in conseguenza a quanto già riportato nel paragrafo dedicato alla Biologia Molecolare.

12.1 ALGORITMO A. USO DI TECNICHE TRADIZIONALI (A PARTIRE DA FECI FRESCHE O DA FECI FRESCHE + FECI FISSATE)

1. A partire da feci fresche allestire uno striscio fecale per effettuare una colorazione permanente (Giemsa) per la ricerca di *D. fragilis*. Si può non eseguire la colorazione di Giemsa unicamente se si effettua, come indicato al punto 5, o una colorazione Tricromica da feci fissate con Zn-PVA o con alcuni fissativi "Ecologici" o una colorazione con Ematossilina ferrica da feci fissate con Zn-PVA o con SAF (vedi testo e "Appendice Tecnica").
2. Ancora a partire da feci fresche eseguire un esame microscopico diretto. Nelle feci da poco emesse (max 30-60 minuti) è possibile rilevare la mobilità dei trofozoiti di amebe e flagellati e di larve di nematodi. Sia pur con scarsa sensibilità possono essere evidenziate anche uova e larve di elminti oltre che cisti e trofozoiti di protozoi. Con l'esame microscopico diretto non sono evidenziabili *D. fragilis* e *Cryptosporidium* spp.; solo microscopisti estremamente esperti riescono a intuire la loro presenza che è comunque necessario confermare con altra tecnica.

3. A partire dalle feci conservate in fissativo (Formalina 10%, SAF, Fissativi "Ecologici", ma non da PVA) eseguire una concentrazione (FEA, Flottazione) ed esaminare al microscopio per la ricerca di uova e larve di elminti e trofozoiti e cisti di protozoi. Anche con l'esame microscopico dopo concentrazione non sono evidenziabili *D. fragilis* e *Cryptosporidium* spp.
4. Se il campione è costituito unicamente da feci fresche è possibile eseguire la concentrazione partendo da queste (vedi testo e "Appendice Tecnica").
5. In base ai risultati dei test sopra descritti, ma anche ai dati clinici (es: immunosoppressione, eosinofilia, prurito anale) e/o epidemiologici (es: provenienza da zone di endemia per determinate parassitosi) e/o legati allo stato del paziente (es: età, necessità di terapia cortisonica) si deve valutare se eseguire gli ulteriori approfondimenti indicati in figura. Per il tipo di campione idoneo per queste ricerche vedi testo e "Appendice tecnica".

Fig. 33. Algoritmo A: tecniche tradizionali



12.2 ALGORITMO B. USO DI TECNICHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE PER PROTOZOI (A PARTIRE DA FECI FRESCHE O DA FECI FRESCHE + FECI FISSATE)

L'algoritmo sotto riportato segue essenzialmente le indicazioni fornite da van Gool *et al*. che prevedono l'utilizzo routinario della biologia molecolare con un test Multiplex con Rt-PCR per la ricerca di protozoi intestinali su tutti i campioni fecali. Ciò è reso possibile dal sempre minor costo dei test in biologia molecolare e presenta il vantaggio dell'elevata sensibilità nella ricerca dei principali protozoi patogeni.

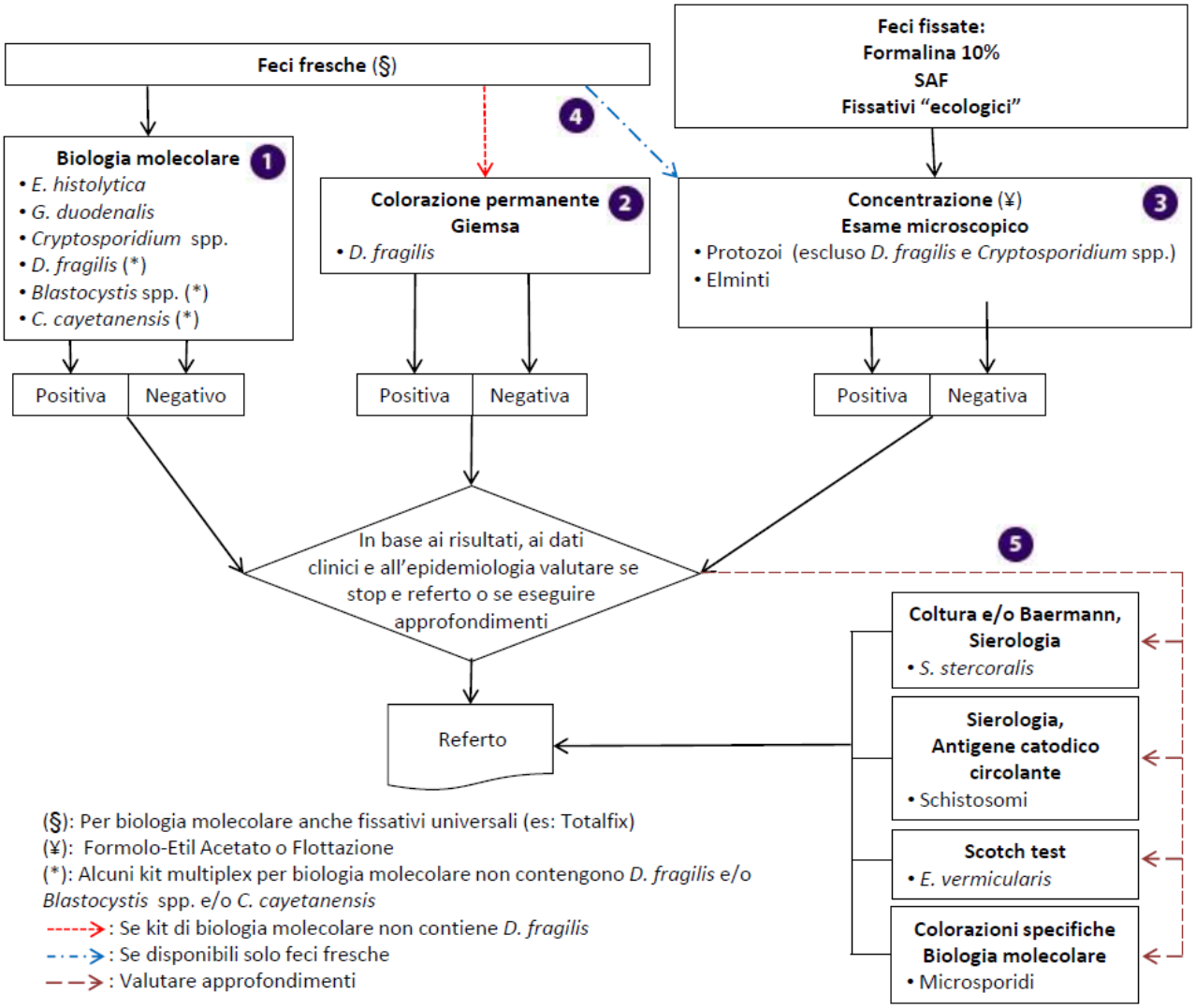
È possibile che alcuni laboratori decidano di utilizzare un tale approccio diagnostico solo per i campioni diarroici o solo in casi selezionati applicando agli altri campioni le tecniche tradizionali.

Altra possibilità è che vengano utilizzati test duplex (es: *D. fragilis-Blastocystis* spp. o *G. duodenalis-Cryptosporidium* spp.) o monoplex (es: solo *E.histolytica*) variamente combinati tra di loro. Riteniamo che questi diversi approcci non inficino lo schema di algoritmo proposto.

Negli ultimi anni, nonostante l'elevato costo, si va sempre più diffondendo l'approccio sindromico con l'utilizzo di *Microarray* per la ricerca dei patogeni intestinali (virus, batteri, parassiti). Anche in questo caso, dal punto di vista parassitologico, si ritiene che lo schema sotto proposto rimanga valido.

1. A partire da feci fresche eseguire la ricerca di *E.histolytica*, *G. duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., *D. fragilis*, *Blastocystis* spp. e *C. cayetanensis* con il test in biologia molecolare. Alcuni kit in commercio non includono la ricerca di *D. fragilis* e/o di *Blastocystis* spp. e/o di *C. cayetanensis*. Per l'esecuzione di test in biologia molecolare a partire da campioni fissati vedi testo.
2. Se il kit a disposizione non include *D. fragilis* allestire uno striscio fecale a partire da feci fresche ed eseguire una colorazione permanente (Giemsa) per ricercare questo flagellato. Le forme di *Blastocystis* spp. eventualmente presenti sono evidenziabili, oltre che con la colorazione di Giemsa, pure con l'esame microscopico dopo concentrazione. Le oocisti di *C. cayetanensis* sono anch'esse evidenziabili con l'esame microscopico dopo concentrazione.
3. A partire dalle feci conservate in fissativo (Formalina 10%, SAF, Fissativi "Ecologici") eseguire una concentrazione (FEA, Flottazione) ed esaminare al microscopio per la ricerca di uova e larve di elminti e di trofozoiti e cisti di protozoi.
4. Se il campione è costituito unicamente da feci fresche è possibile eseguire la concentrazione partendo da queste (vedi testo e "Appendice Tecnica").
   Con la concentrazione oltre che gli elminti possono essere evidenziati altri protozoi patogeni quali *C. cayetanensis*, *C. belli*, *B. coli* e protozoi usualmente non patogeni (*E. coli*, *E. hartmanni*, *C. mesnili* ecc.). In presenza di cisti/trofozoiti riconducibili a *E. histolytica/dispar* e biologia molecolare negativa per *E. histolytica* refertare: *E. dispar* (non patogena). Come già scritto nell'algoritmo A con l'esame microscopico dopo concentrazione non sono evidenziabili *D. fragilis* e *Cryptosporidium* spp.
5. In caso di negatività dei risultati, ma non solo, ove rimanesse un sospetto d'infezione desunto dai dati clinici (es: diarrea, immunosoppressione, eosinofilia, prurito anale) e/o epidemiologici (es: provenienza da zone di endemia per determinate parassitosi) e/o legato allo stato del paziente (es: età, necessità di terapia cortisonica) si deve valutare se eseguire gli ulteriori approfondimenti indicati in figura. Per il tipo di campione idoneo per queste ricerche vedi testo e "Appendice tecnica".

Fig. 34. Algoritmo B: tecniche di biologia molecolare



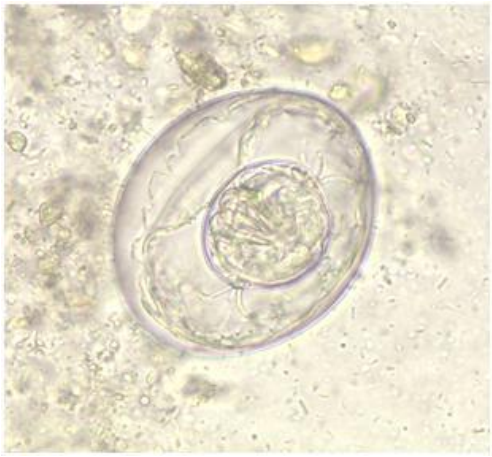
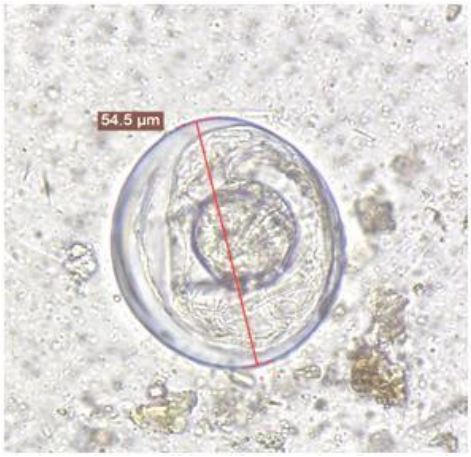
13 APPENDICE A: IMMAGINI DI UOVA E LARVE DI ELMINTI

CESTODI

Uova di *Taenia* spp (250x) (400x)

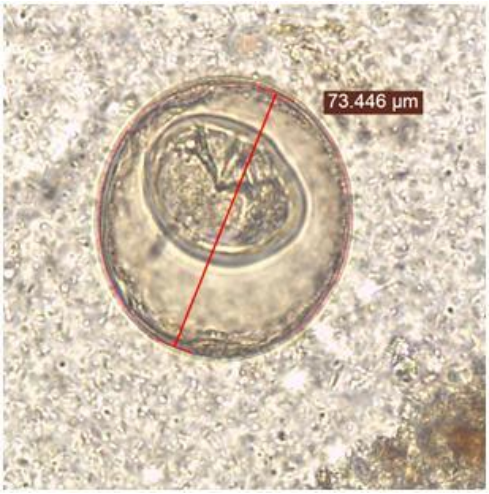
Visibili la corona radiata e gli uncini all'interno dell'uovo (larva esacanta).

Uova di *Hymenolepis nana* (400x)

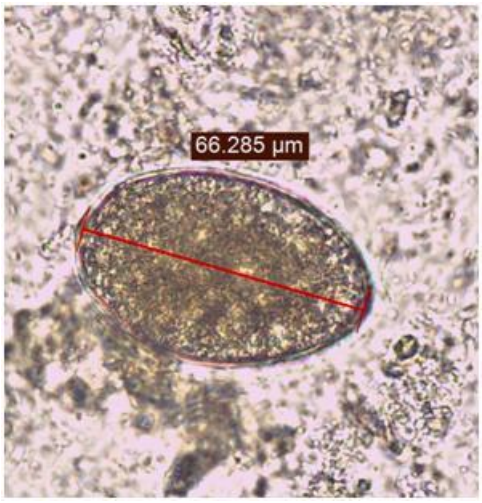
Visibili i filamenti polari e gli uncini all'interno dell'uovo (larva esacanta).

Uova di *Hymenolepis diminuta* (400x)



Assenza dei filamenti polari, visibili gli uncini all'interno dell'uovo (larva esacanta).

Uova di *Dibothriocephalus latus* (400x)



Visibile l'opercolo (freccia).

TREMATODI

Uova di *Opisthorchis/Clonorchis* spp. (1.000x)

Visibile l'opercolo e l'orletto dell'opercolo.

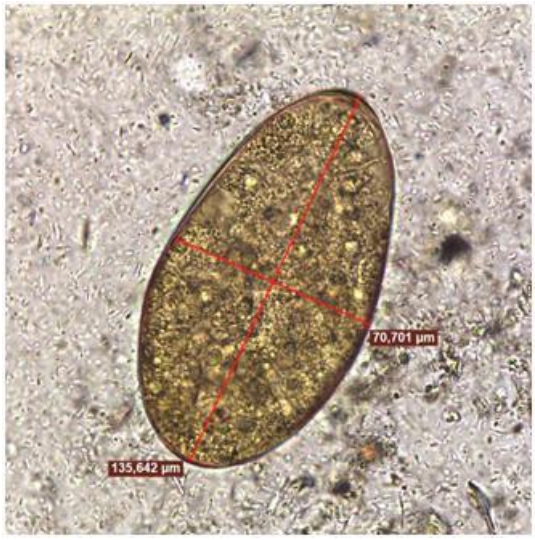
Uova di *Dicrocoelium dendriticum* (1.000x) (400x)

Visibile l'opercolo (freccia).

Uova di *Paragonimus* spp. (400x)

Visibile l'opercolo e la differenza di spessore della parete dell'uovo.

Uova di *Fasciola* spp. (400x)

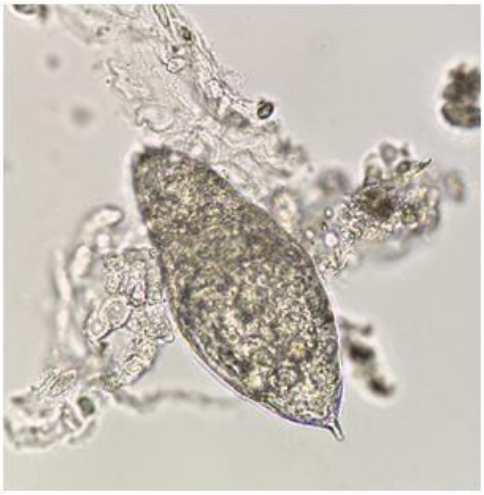


Visibile l'opercolo.

Uova di *Schistosoma mansoni* (400x)

Visibile la spina (mucrone) laterale e il miracidio all'interno dell'uovo.

Uovo di *Schistosoma haematobium* (400x)

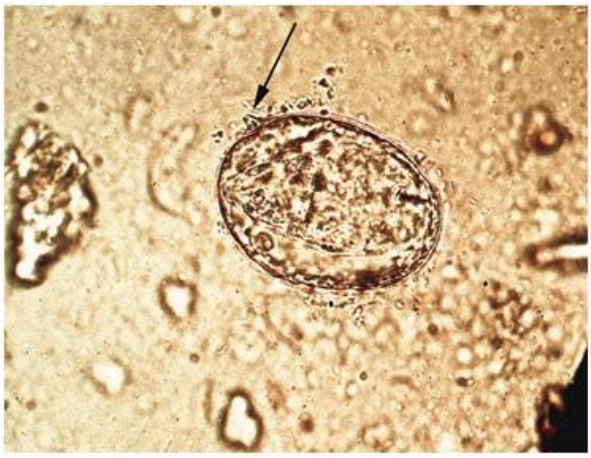


Visibile la spina (mucrone) terminale.

Uova di *Schistosoma intercalatum* (400x)

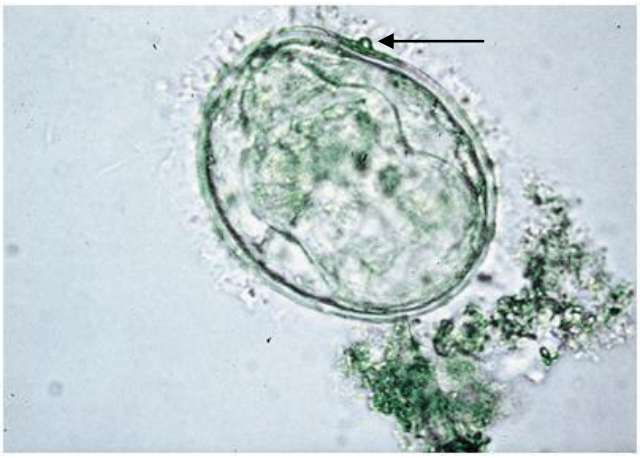
Visibile la spina (mucrone) terminale e il rigonfiamento centrale.

Uovo di *Schistosoma japonicum* (400x)



La freccia indica la piccola spina laterale.

Uovo di *Schistosoma mekongi* (400x)

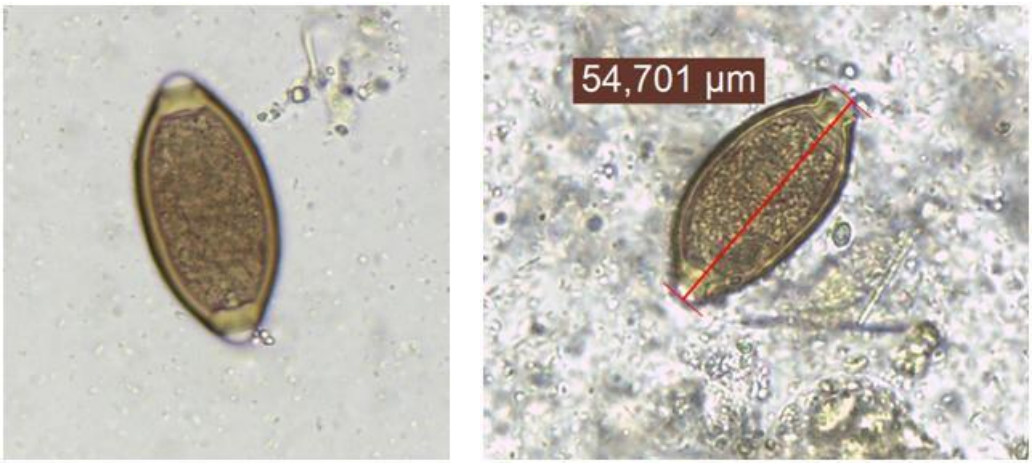


La freccia indica la piccola spina laterale.

Da: CDC-DPDx (modificata)

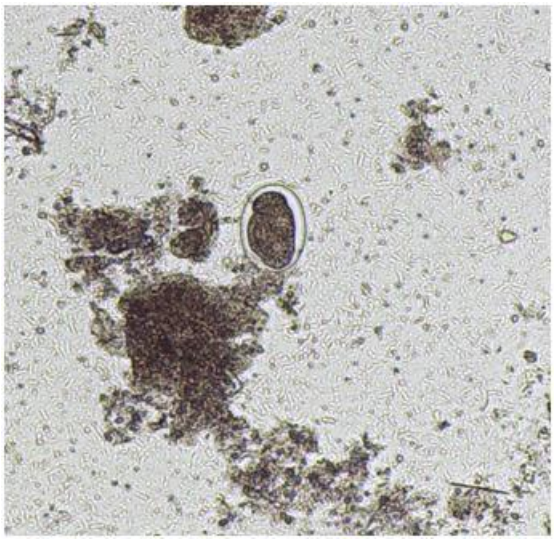
NEMATODI

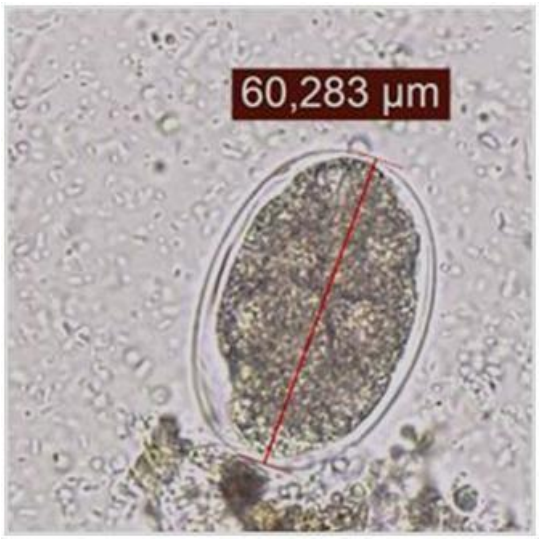
Uova di *Trichuris trichiura* (400x)



Visibili i tappi mucosi ai due poli dell'uovo.

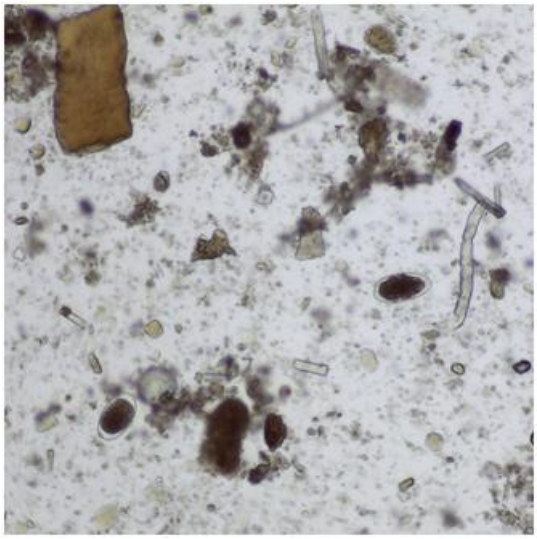
Uova di *Ancylostoma/Necator* spp. (200x) (400x)

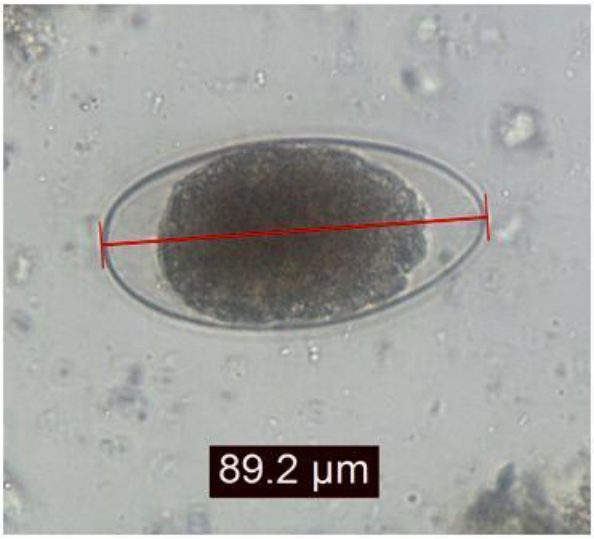




Presenza di una larva all'interno dell'uovo; feci vecchie.

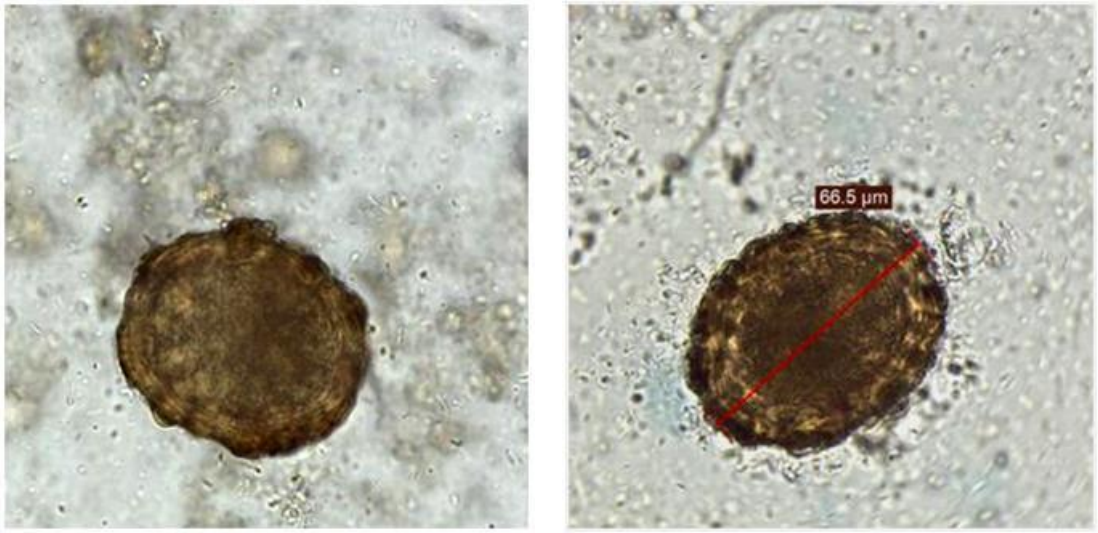
Uova di *Trichostrongylus* spp. (100x) (400x)





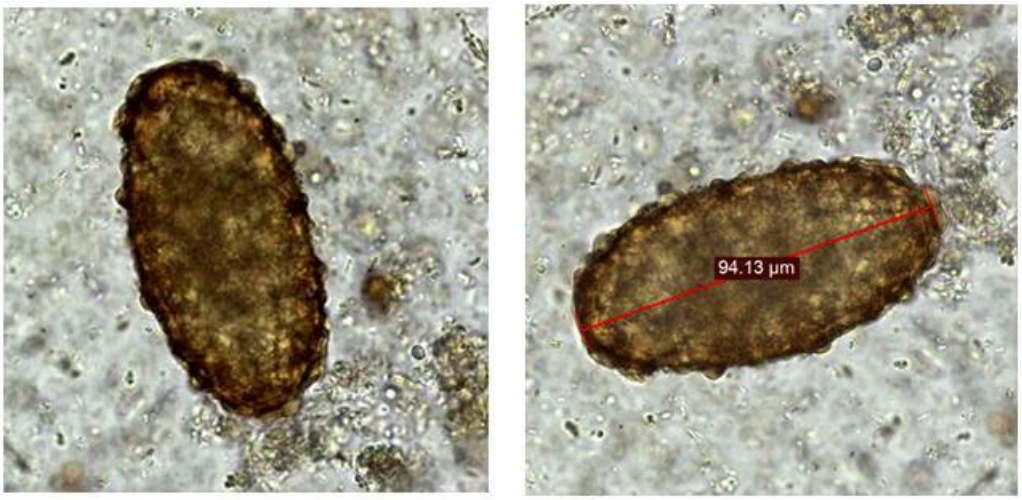
Per la diagnosi differenziale con *Ancylostoma/Necator* spp. è indispensabile misurare.

Uova fertili di *Ascaris lumbricoides* (400x)



Visibile la parete mammellonata.

Uova non fertili di *Ascaris lumbricoides* (400x)



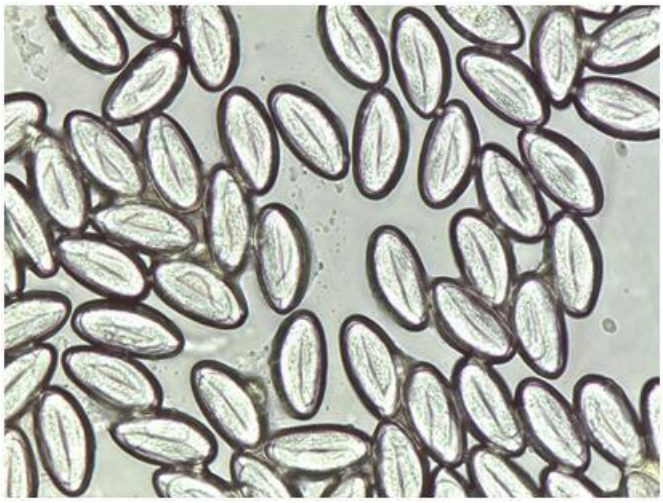
Visibile la parete mammellonata.

Uova decorticate di *Ascaris lumbricoides* (400x)

Uovo fertile decorticato Uovo non fertile decorticato

Da: CDC-DPDx

Uova di *Enterobius vermicularis* (400x) – Scotch test (200x)



Asimmetriche, una parete appiattita.

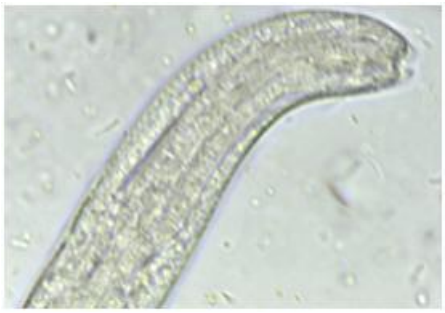
Uova di *Paracapillaria philippinensis* (400x)

Visibili le striature della parete dell'uovo.
Da: CDC-DPDx

Larve rabditoidi di *Strongyloides stercoralis* (100x) (400x)

Le frecce indicano l'esofago con strozzature (rabditoide) e l'abbozzo genitale.

Larve rabditoidi di *Strongyloides stercoralis* (400x) (1.000x)



Lunghezza approssimativa e particolare della cavità buccale corta.

Larve rabditoidi di *Ancylostoma/Necator* spp (400x)

La freccia indica la cavità buccale lunga.

Da: CDC-DPDx

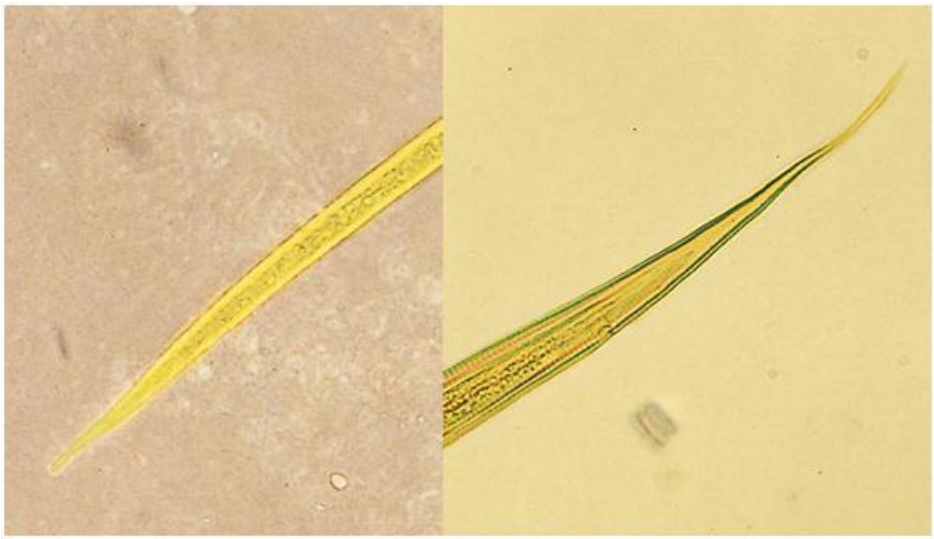
Larva filariforme di *Strongyloides stercoralis* (250x contrasto di fase)

Assenza di guaina, estremità caudale dentellata.

Larva filariforme di *Ancylostoma/Necator* spp. (250x)

Presenza di guaina, estremità caudale appuntita.

Larve filariformi di *S. stercoralis* e di *Ancylostoma/Necator* spp. (1.000x)



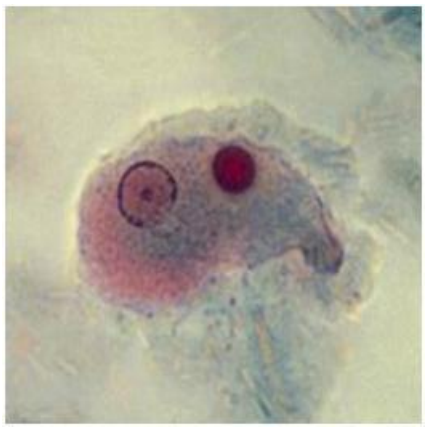
Particolari dell'estremità caudale delle larve filariformi;
a sx dentellata (*S. stercoralis)* a dx appuntita (*Ancylostoma/Necator* spp.)

14 APPENDICE B: IMMAGINI DI PROTOZOI INTESTINALI

TROFOZOITI E CISTI DI AMEBE

Entamoeba hystolytica/dispar

Trofozoite (Dobell 1.000x)



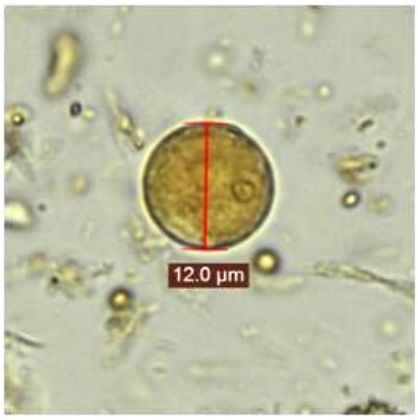
Trofozoiti (Tricromica 1.000x)

Visibile il nucleo con cariosoma centrale (sub centrale a sx) e cromatina periferica uniformemente distribuita.
Il trofozoite nell'immagine a destra contiene un'emazia fagocitata = *E. histolytica* "sensu stricto".

Da: CDC-DPDx

Da: Petithory JC *et al*. *Amibes et Flagellés Intestinaux*

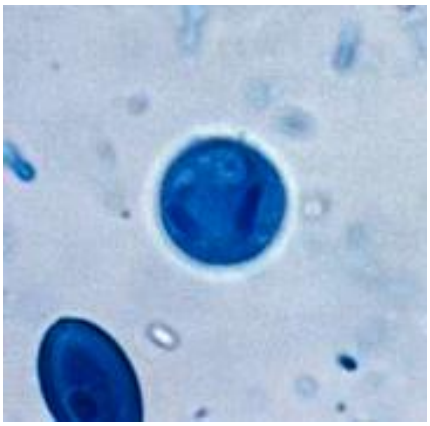
Cisti mononucleata (Dobell 400x)



Cisti mononucleate (Dobell 1.000x)

Nell'immagine centrale visibile una massa di glicogeno che capta lo iodio.

Cisti (Dobell 1.000x)
Visibili un corpo cromatoide e due nuclei.



Cisti (Sargeanut 1.000x)
Visibili due corpi cromatoidi e un nucleo.

Da: Petithory JC *et al*. *Amibes et Flagellés Intestinaux*

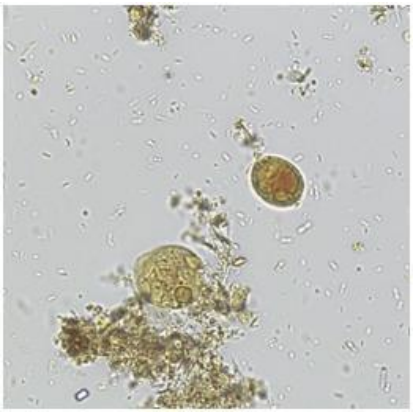
Entamoeba coli

Trofozoite (Dobell 400x)

Trofozoite (S. F. 1.000x)

Trofozoite (Dobell 1.000x)

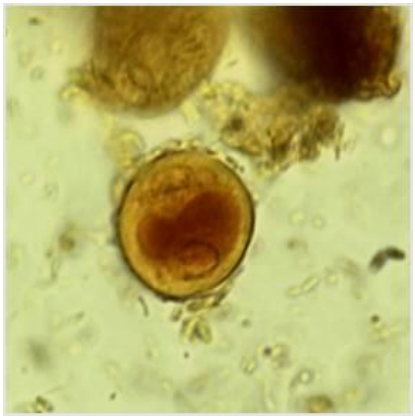
Le frecce indicano il punto di emissione di uno pseudopodio.
Nucleo con cromatina periferica non uniformemente distribuita.



Trofozoite e cisti (Dobell 400x)
Nella cisti, immatura, visibile una massa di glicogeno e un nucleo.

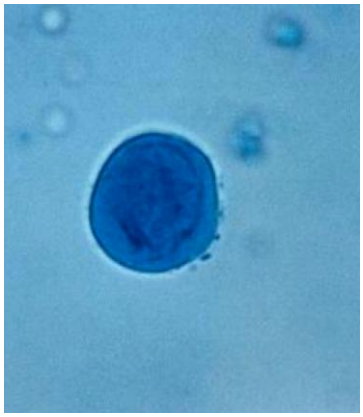
Cisti (Dobell 1.000x)
Visibili 6 nuclei.

Cisti (S. F. 1.000x)
Visibili 5 nuclei.



Cisti immatura (Dobell 1.000x)
Visibile una grande massa di glicogeno e un nucleo.

Cisti (Dobell 1.000x)

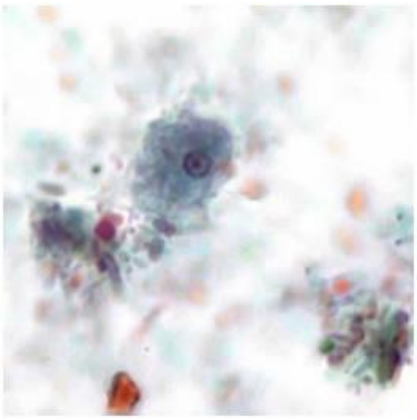


Cisti (Sargeaunt 1.000x)

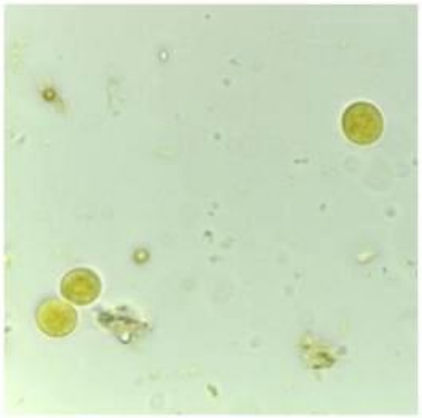
Visibili corpi cromatoidi con estremità appuntite.

Da: Petithory JC *et al. Amibes et Flagellés Intestinaux*

Entamoeba harmanni



Trofozoite (Tricromica 1.000x)



Cisti (Dobell 400x)

Cisti (Dobell 1.000x)

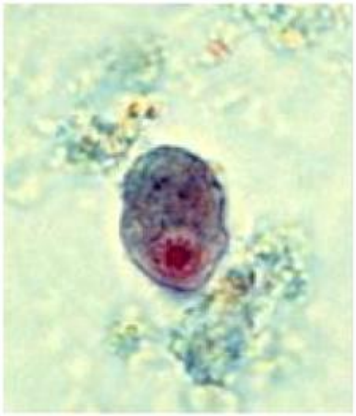
Da: CDC-DPDx

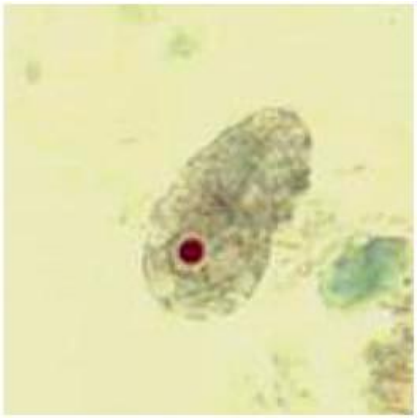
Cisti (Dobell 400x)

Cisti (Dobell 1.000x)

Nell'immagine a destra sono visibili 2 nuclei (frecce).

Iodamoeba bütschlii





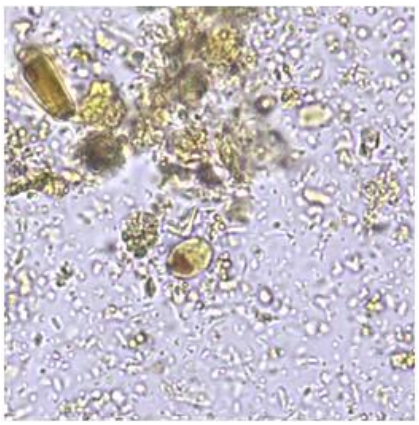
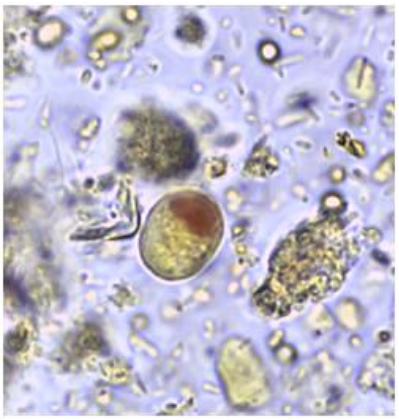
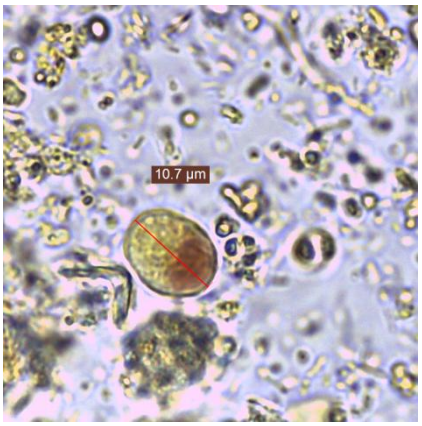
Trofozoiti (Tricromica 1.000x)

Nucleo con grande cariosoma e senza cromatina periferica.

Nell'immagine a sinistra ben visibili i granuli pericariosomici (cromosomi).

Da: Petithory JC *et al. Amibes et Flagellés Intestinaux*

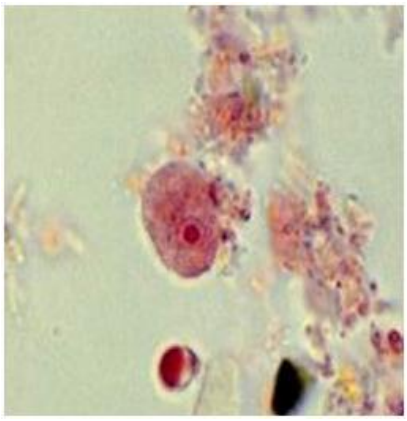
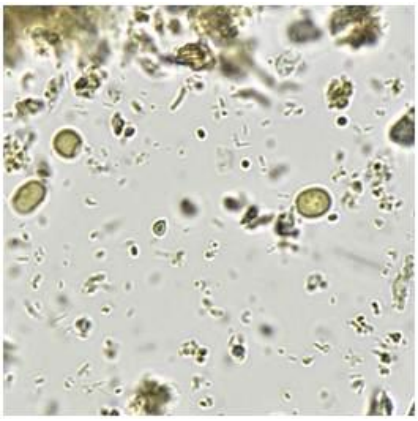
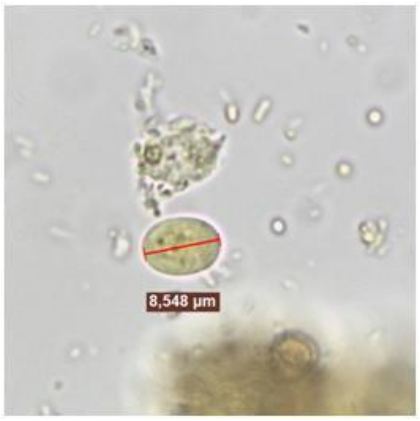
Iodamoeba bütschlii

Cisti (Dobell 400x) Cisti (Dobell 1.000x)

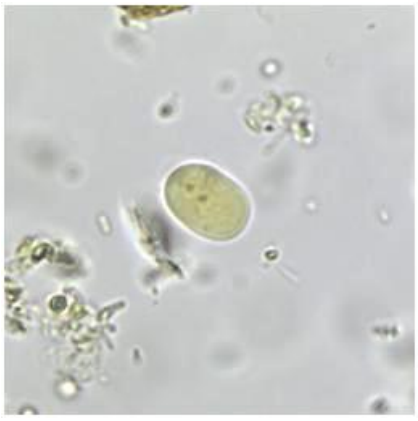
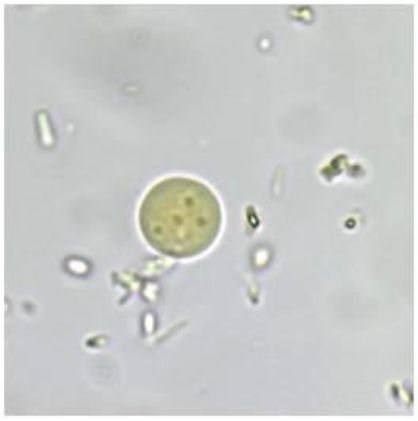
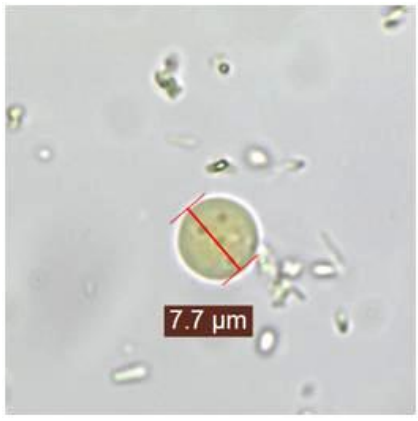
Visibile il cospicuo vacuolo iodofilo (glicogeno); nel piano focale non visibili i nuclei.

Endolimax nana

Trofozoite (Tricromica 1.000x) Cisti (Dobell 400x) Cisti (Dobell 1.000x)

Da: Petithory JC *et al*. *Amibes et Flagellés Intestinaux*

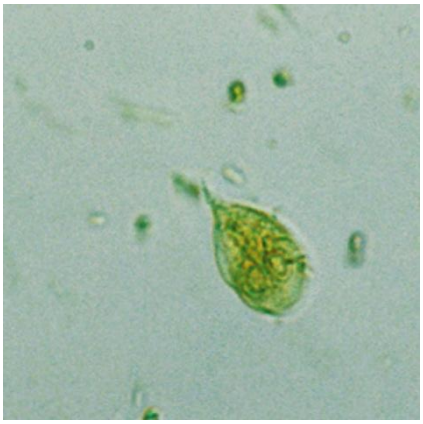




Cisti (Dobell 1.000x)

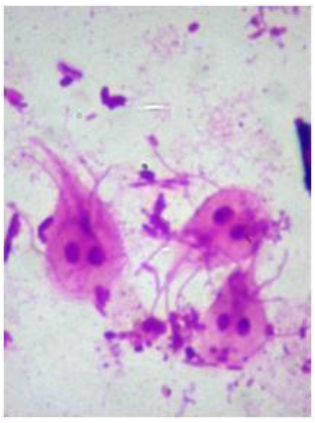
Visibili 2 e 4 nuclei con grande cariosoma ed assenza di cromatina periferica.

TROFOZOITI E CISTI DI FLAGELLATI

Giardia duodenalis



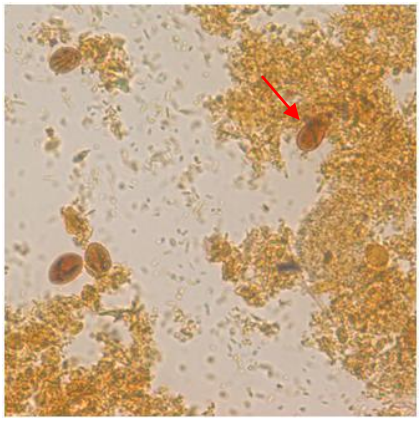
Trofozoite (Dobell 1.000x)



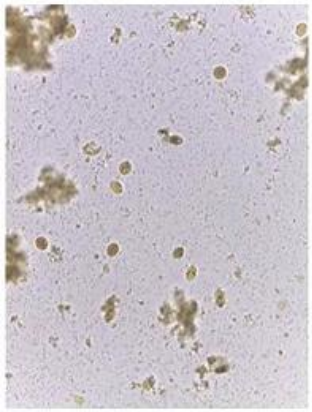
Trofozoite (Giemsa 1.000x)

Cisti e Trofozoite (Dobell 1.000x)

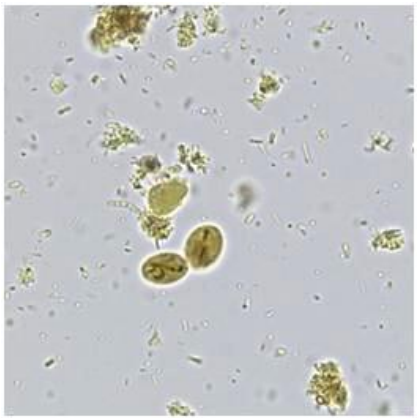
Nelle immagini a sx e al centro visibili i due nuclei posti nella parte anteriore dei trofozoiti.
Nell'immagine a dx il trofozoite, fotografato di profilo, mostra il caratteristico aspetto a "cucchiaio".



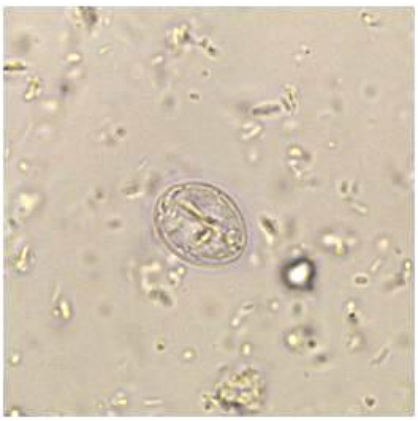
Cisti e Trofozoite (freccia) (Dobell 400x)



Cisti (Dobell 100x)



Cisti (Dobell 400x)

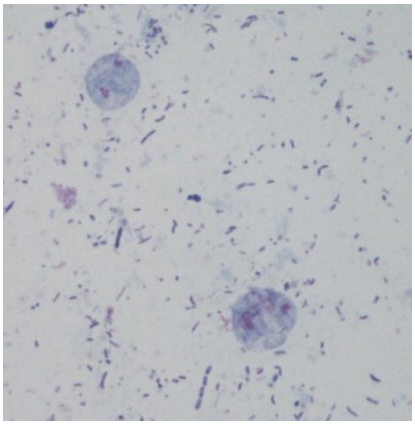


Cisti (S.F. 1.000x)

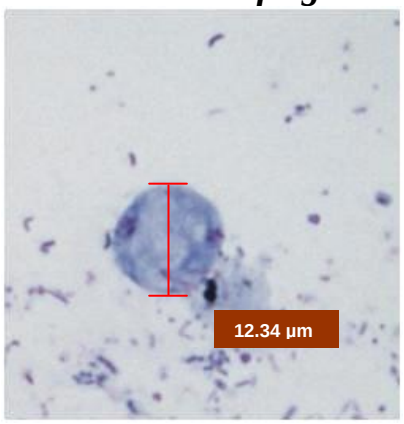
Cisti (Dobell 1.000x)

Sia con S. F., sia con Dobell visibili le strutture interne.

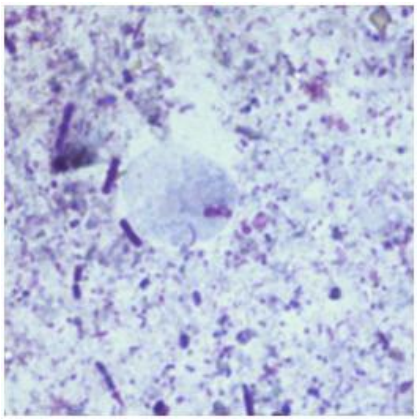
Dientamoeba fragilis



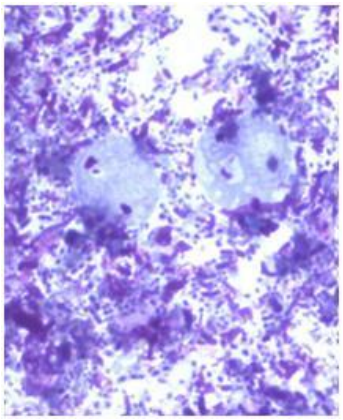
Trofozoiti binucleati
(Giemsa 650x)



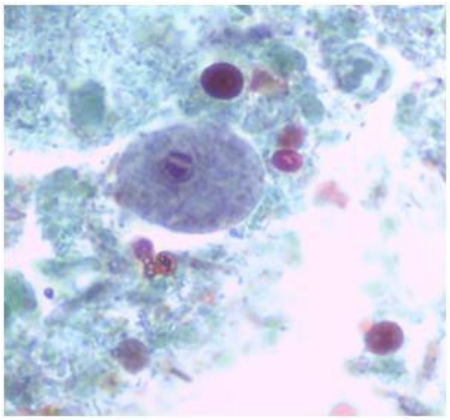
Trofozoite binucleato; nuclei frammentati (Giemsa 1.000x)



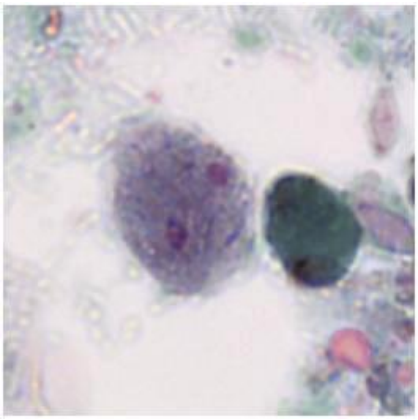
Trofozoite mononucleato; nucleo frammentato (Giemsa 1.000x)



Trofozoiti binucleati
(Giemsa 1.000x)



Trofozoite mononucleata; nucleo frammentato (Tricromica 1.000x)

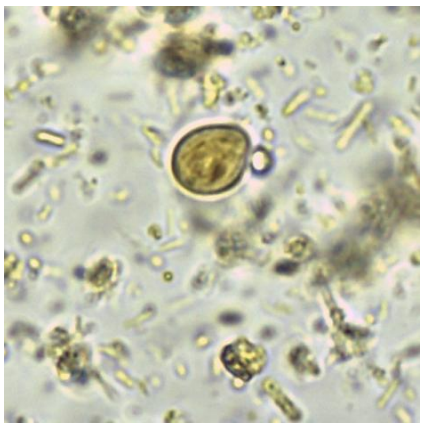


Trofozoite binucleato
(Tricromica 1.000x)

Chilomastix mesnili

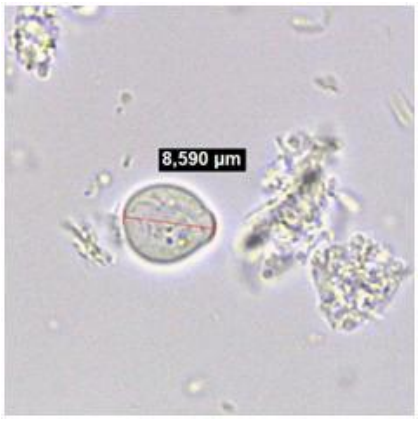
Trofozoite (S. F. 1.000x)
Visibili tre flagelli anteriori.

Cisti (S. F. 1.000x)

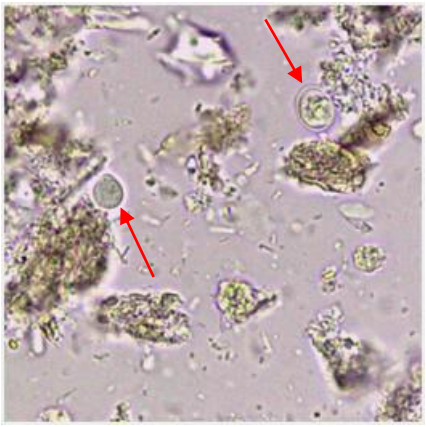


Cisti (Dobell 1.000x)

Chilomastix mesnili

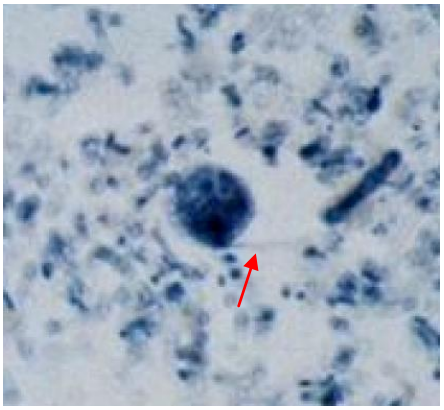


Cisti (S. F. 1.000x)

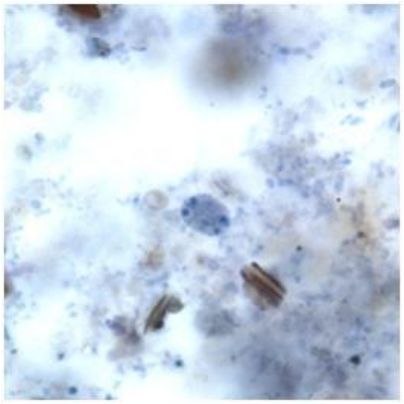


Cisti di *C. mesnili* a sx e cisti di *G. duodenalis* a dx (S. F. 400x)

Enteromonas hominis

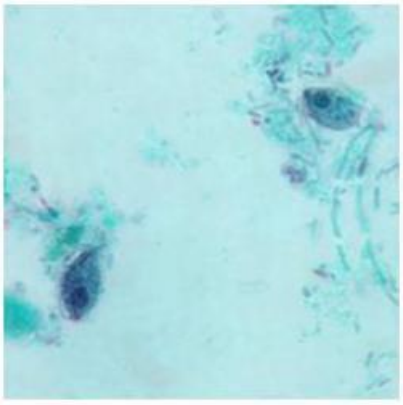


Trofozoite (E. F. 1.000x)
Visibile il flagello posteriore (freccia).
Da: Petithory JC *et al*. *Amibes et Flagellés Intestinaux*



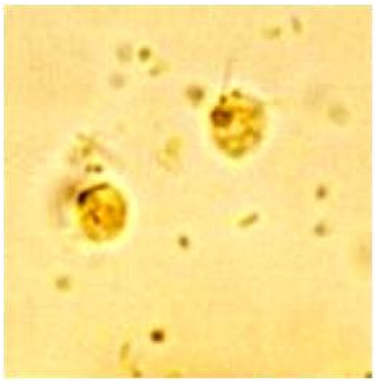
Cisti tetranucleata (E. F. 1.000x)
Nuclei alle estremità della cisti.
Da: CDC-DPDx

Pentatrichomonas hominis

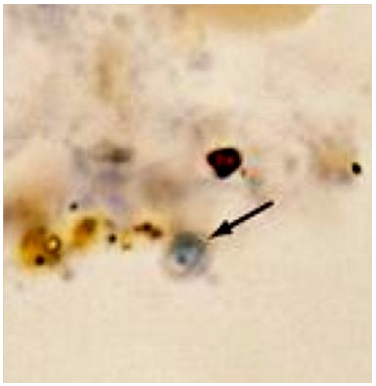


Trofozoiti (Tricromica 1.000x)

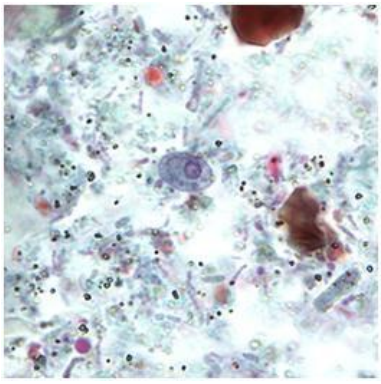
Retortamonas intestinalis



Trofozoite (Dobell 1.000x)



Cisti (E. F. 1.000x)



Cisti (Tricromica 1.000x)

Nelle cisti notare il flagello a forma di U rovesciata (freccia) i cui rami contornano il nucleo.
Da: Petithory JC *et al*. *Amibes et Flagellés Intestinaux*
Da: CDC-DPDx

TROFOZOITI E CISTI DI CILIATI

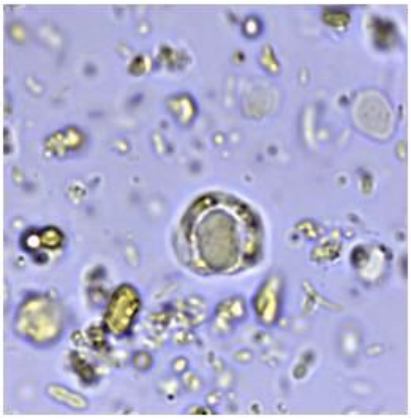
Balantidium coli

Trofozoiti (S. F. 400x)

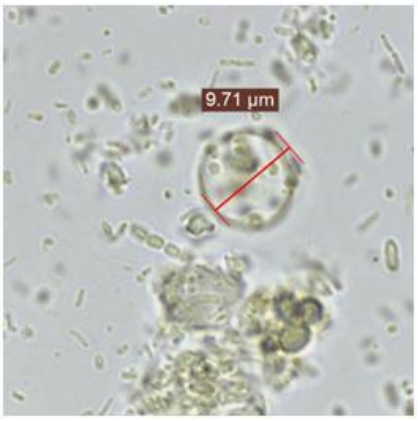
Cisti (S. F. 400x)

STRAMENOPILI

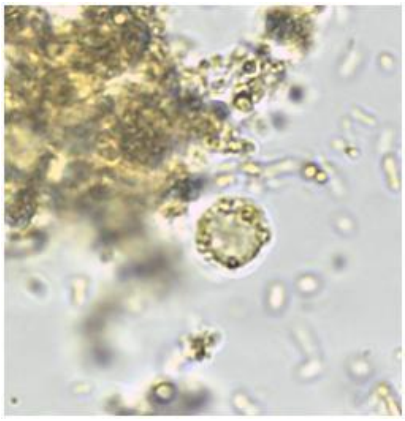
Blastocystis spp.



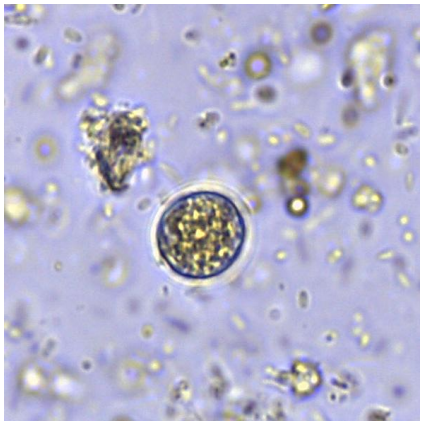
Forme vacuolari (S. F. 1.000x)



Forma vacuolare (S. F. 1.000x)



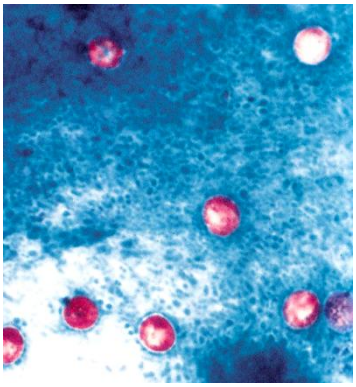
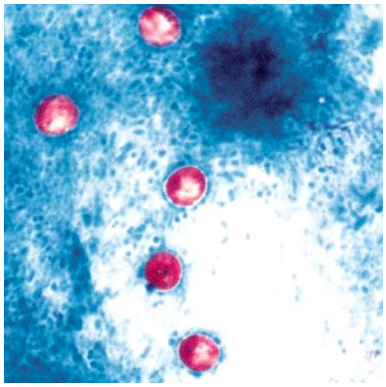
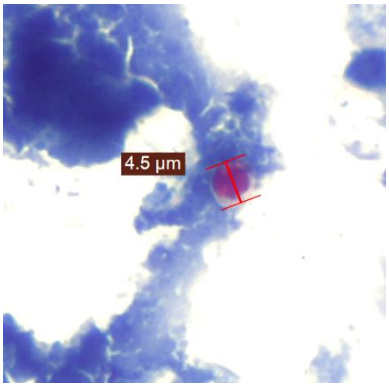
Forma vacuolare (Dobell 1.000x)



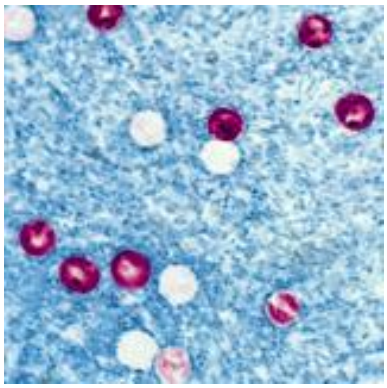
Forma granulare (Dobell 1.000x)

COCCIDI

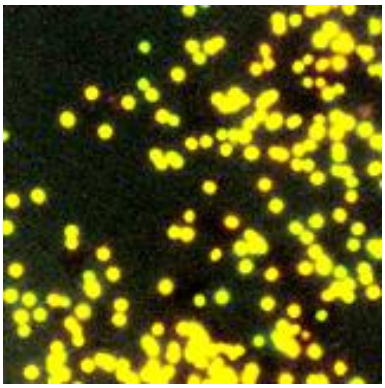
Cryptosporidium spp.

Oocisti (Z-N 1.000x)



Oocisti (Z-N 1.000x)



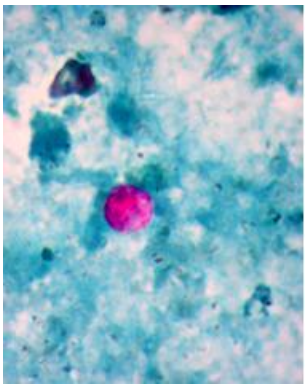
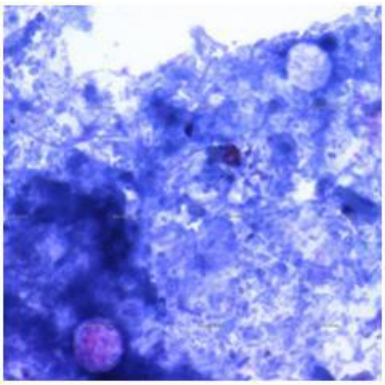
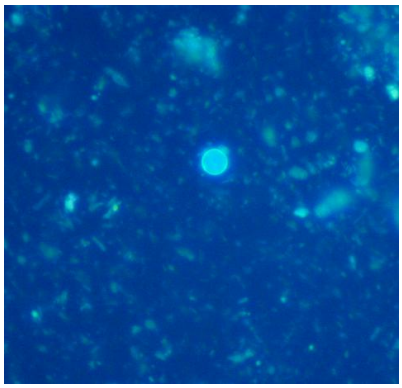
Oocisti (Auramina 400x)

Non tutte le oocisti si colorano uniformemente.

Cyclospora cayetanensis

Oocisti (S.F. 1.000x)

Apparenza a “vetro smerigliato”.

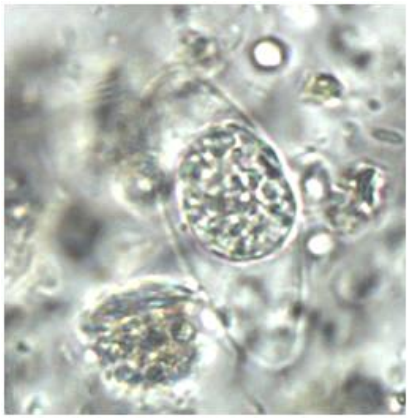
Oocisti (Z-N 1.000x)

Oocisti (Autofluorescenza 400x)

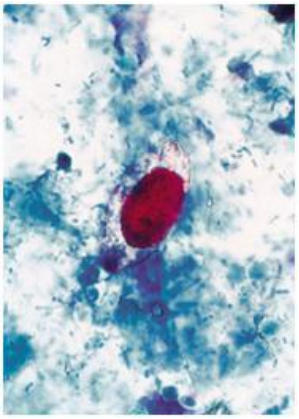
Non tutte le oocisti si colorano uniformemente.

Cystoisospora belli

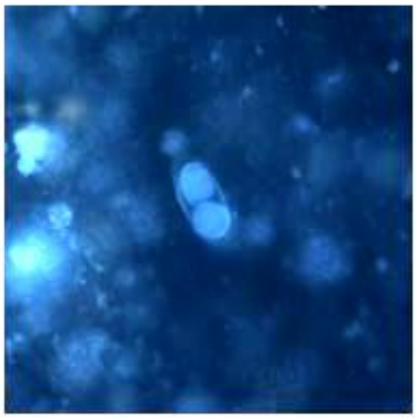
Oocisti immature (S. F. 100x, 250x, 400x)
La freccia indica un cristallo di Charcot-Leyden.



Oocisti immatura (S. F. 1.000x)



Oocisti immatura (Z-N 400x)



Oocisti immatura con due sporoblasti (Autofluorescenza 400x)
Da: CDC-DPDx

Sarcocystis spp

Oocisti matura con due sporocisti (Dobell 400x)
Visibili gli sporozoiti nelle sporocisti.

Legenda dei metodi di colorazione:

S. F.: = Sospensione in Soluzione Fisiologica (nessuna colorazione).
Dobell = Colorazione estemporanea con soluzione di Dobell.
Sargeaunt = Colorazione estemporanea con colorante di Sargeaunt.
Tricromica = Colorazione Tricromica.
E. F. = Colorazione con Ematossilina ferrica.
Giemsa = Colorazione di Giemsa.
Z-N = Colorazione di Ziehl-Neelsen modificata.
Auramina = Colorazione con Auramina-Rhodamina.
Autofluorescenza = Autofluorescenza alla luce ultravioletta.

15 APPENDICE TECNICA

Per la compilazione delle schede dell'Appendice Tecnica sono state utilizzate le seguenti pubblicazioni:

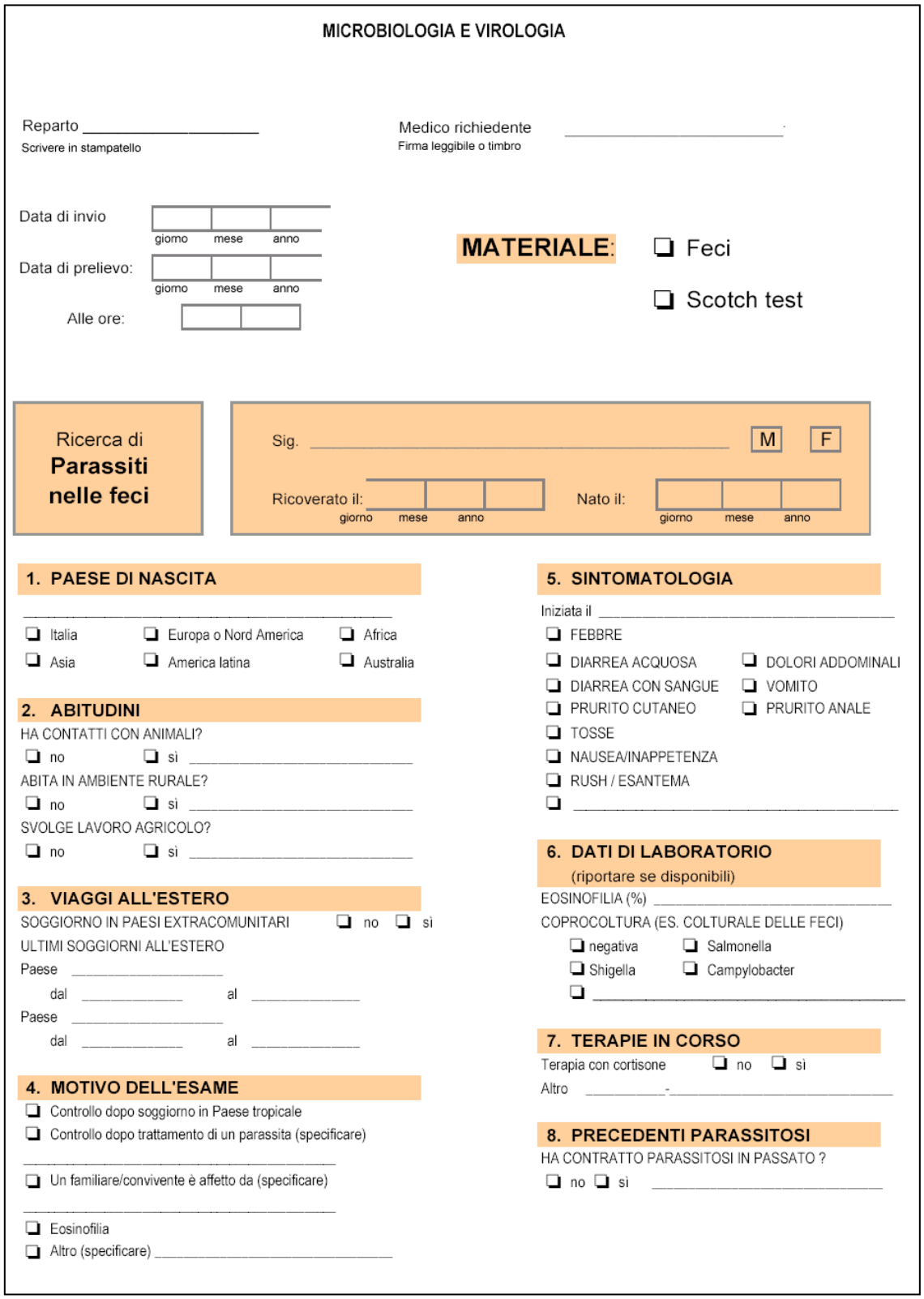
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). **Diagnostic Procedures**.
- World Health Organization. **Bench aids for the diagnosis of intestinal parasites - second edition**.
- UK Standards for Microbiology Investigations. **TP39 - Staining procedures**.
- UK Standards for Microbiology Investigations. **B31 - Investigation of specimens other than blood for parasites.**
- Garcia LS. **Diagnostic Medical Parasitology – 6th Edition**.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. **Procedures for the Recovery and Identification of Parasites from the Intestinal Tract; Approved Guideline - Second Edition**.
- Brandonisio O, Bruschi F, Genchi C, Pozio E *et al*. **de Carneri-Parassitologia Medica e Diagnostica Parassitologica – tredicesima edizione**.
- Bernieri F, Crotti D, Galli D, Raglio A. **Manuale Illustrato di Diagnostica Parassitologica**.
- Petithory JC, Ardoin-Guidon F, Chaumeil C. **Amibes et Flagellés Intestinaux, Amibes Oculaires - Leur Diagnostic Microscopique**.
- Rondanelli EG, Scaglia M. **Atlante dei protozoi umani**.

Per la descrizione completa delle pubblicazioni utilizzate vedi il paragrafo "Fonti Bibliografiche".

15.1 ESEMPIO DI MODULO PER LA RACCOLTA DATI CLINICI E ANAMNESTICO-EPIDEMIOLOGICI

Ogni laboratorio deve produrre un proprio modulo per la raccolta dei dati clinici e anamnestico-epidemiologici semplificando o anche ampliando il modello proposto.

Ad esempio possono essere aggiunti altri materiali (Liquido duodenale ecc.) e/o indicazioni sullo stato immunitario del paziente e/o abitudini alimentari (consumo di carne cruda, consumo di pesce crudo).



MICROBIOLOGIA E VIROLOGIA

Reparto _____
Scrivere in stampatello

Medico richiedente _____
Firma leggibile o timbro

Data di invio ___ ___ ___ (giorno mese anno)

Data di prelievo: ___ ___ ___ (giorno mese anno)

Alle ore: ___ ___

MATERIALE: ❑ Feci ❑ Scotch test

Ricerca di **Parassiti nelle feci**

Sig. _____ M F

Ricoverato il: ___ ___ ___ (giorno mese anno) Nato il: ___ ___ ___ (giorno mese anno)

1. PAESE DI NASCITA

_____

❑ Italia ❑ Europa o Nord America ❑ Africa
❑ Asia ❑ America latina ❑ Australia

2. ABITUDINI

HA CONTATTI CON ANIMALI?
❑ no ❑ si _____

ABITA IN AMBIENTE RURALE?
❑ no ❑ si _____

SVOLGE LAVORO AGRICOLO?
❑ no ❑ si _____

3. VIAGGI ALL'ESTERO

SOGGIORNO IN PAESI EXTRACOMUNITARI ❑ no ❑ si

ULTIMI SOGGIORNI ALL'ESTERO

Paese _____
dal _____ al _____

Paese _____
dal _____ al _____

4. MOTIVO DELL'ESAME

❑ Controllo dopo soggiorno in Paese tropicale
❑ Controllo dopo trattamento di un parassita (specificare)
_____
❑ Un familiare/convivente è affetto da (specificare)
_____
❑ Eosinofilia
❑ Altro (specificare) _____

5. SINTOMATOLOGIA

Iniziata il _____

❑ FEBBRE
❑ DIARREA ACQUOSA ❑ DOLORI ADDOMINALI
❑ DIARREA CON SANGUE ❑ VOMITO
❑ PRURITO CUTANEO ❑ PRURITO ANALE
❑ TOSSE
❑ NAUSEA/INAPPETENZA
❑ RUSH / ESANTEMA
❑ _____

6. DATI DI LABORATORIO
(riportare se disponibili)

EOSINOFILIA (%) _____

COPROCOLTURA (ES. COLTURALE DELLE FECI)
❑ negativa ❑ Salmonella
❑ Shigella ❑ Campylobacter
❑ _____

7. TERAPIE IN CORSO

Terapia con cortisone ❑ no ❑ si

Altro _____

8. PRECEDENTI PARASSITOSI

HA CONTRATTO PARASSITOSI IN PASSATO ?
❑ no ❑ si _____

15.2 ESEMPIO DI ISTRUZIONI PER LA RACCOLTA DELLE FECI

L'esempio di istruzioni sotto riportato fa riferimento alla raccolta di feci fresche in un contenitore senza conservanti/fissativi.
Ogni laboratorio deve produrre proprie istruzioni in relazione alle tecniche in uso e all'utilizzo di feci fresche e/o di feci già fissate.

ESAME COPRO-PARASSITOLOGICO STANDARD

N.B.: si raccomanda di raccogliere 3 campioni di feci emesse a giorni alterni

1) Le feci vanno raccolte su una superficie asciutta e pulita, tipo una padella da letto, oppure un foglio di cartone o giornale ripiegato, o un sacchetto di plastica, posti sotto il sedile copri water.
   N.B.: le feci non vanno contaminate né con le urine né con l'acqua del water.
2) Le feci vanno prelevate in punti diversi dell'intera evacuazione. Trasferire in un adeguato contenitore (di plastica, fornito dal laboratorio o acquistato in farmacia), utilizzando una spatola o una bacchetta di legno o una posata di plastica, circa 7-10 grammi di feci (una quantità di feci pari almeno al volume di una grossa noce).
   N.B.: se le feci sono liquide/diarroiche raccogliere almeno 7-10 ml di materiale fecale.
3) Chiudere molto bene il contenitore ed etichettarlo con cognome e nome, data di nascita, data e ora dell'emissione delle feci.
4) Consegnare il campione al laboratorio entro 2-4 ore dalla raccolta oppure conservarlo in frigorifero per non più di 24-48 ore.

ATTENZIONE: se le feci sono liquide il campione deve pervenire al laboratorio entro 30-60 minuti dalla loro emissione.

PRECAUZIONI IMPORTANTI

a) Alcuni giorni prima e durante il periodo della raccolta delle feci non fare uso di lassativi, antidiarroici, antimicrobici, o di altre sostanze interferenti come bario, bismuto, oli minerali.
b) Alcuni giorni prima e durante il periodo della raccolta delle feci si consiglia di seguire un regime dietetico che prevede di evitare: legumi e frutta secca, frutti e verdure a cuticola resistente (pesche, albicocche, pomodori, pere, fragole, fichi), carote e banane.

RICERCA MIRATA DI *STRONGYLOIDES STERCORALIS*
(Metodo di Baermann – Coltura su agar)

N.B.: si raccomanda di raccogliere 3 campioni di feci emesse a giorni alterni

La modalità di raccolta sono le stesse che per l'esame copro-parassitologico standard, ma la quantità di feci necessaria è superiore.

- Trasferire in un adeguato contenitore (di plastica, fornito dal laboratorio o acquistato in farmacia), utilizzando una spatola o una bacchetta di legno o una posata di plastica, circa 30-40 grammi di feci (una quantità di feci pari almeno al volume di un mandarino).

15.3 SOLUZIONI IODATE PER PARASSITOLOGIA

SOLUZIONE DI DOBELL O LUGOL 1:5

Preparazione diretta

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

1. Sciogliere il potassio ioduro in una fiasca o bottiglia scura agitando in continuazione su un agitatore magnetico o meccanico.
2. Sciolto il potassio ioduro, aggiungere lo iodio in cristalli e continuare l'agitazione. Al termine sul fondo della bottiglia potrebbero rimanere alcuni cristalli di iodio in eccesso.
3. Conservare la soluzione in un contenitore scuro ben tappato in luogo asciutto e al riparo dalla luce. Si conserva a temperatura ambiente per un anno. Etichettare con la data di scadenza.
4. Per l'uso quotidiano, trasferire un po' di soluzione in un flacone scuro più piccolo preferibilmente munito di un gocciolatore. La soluzione dovrebbe avere il colore di un tè molto forte; scartare quando si schiarisce. Etichettare con la data di preparazione della soluzione di lavoro.

Preparazione da soluzione madre

- Potassio ioduro 10 g
- Iodio in cristalli 5 g
- Acqua distillata 100 ml

Preparare e conservare la soluzione madre come indicato per la "Preparazione diretta" ai punti da 1 a 3.

4. Diluire 1:5 con acqua distillata un po' di soluzione madre.
5. Conservare in un flacone scuro preferibilmente munito di un gocciolatore. La soluzione dovrebbe avere il colore di un tè molto forte; scartare quando si schiarisce, in genere dopo 10-14 giorni. Etichettare con la data di preparazione della soluzione di lavoro.

La soluzione di Dobell pronta per l'uso è disponibile in commercio.

SOLUZIONE DI D'ANTONI

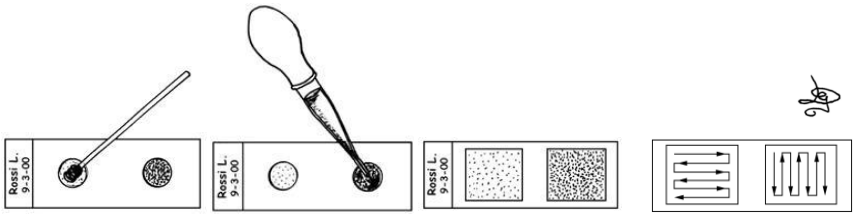
- Potassio ioduro 1 g
- Iodio in cristalli 1,5 g
- Acqua distillata 100 ml

Preparare e conservare come indicato per la "Preparazione diretta" della soluzione di Dobell.

15.4 ESAME MICROSCOPICO DIRETTO

1. Porre una goccia di soluzione fisiologica al centro della metà sinistra di un vetrino portaoggetto e una goccia di soluzione di soluzione di Dobell al centro della metà destra.
2. Utilizzando una bacchettina di legno, stemperare una piccola porzione di feci (la grandezza di una capocchia di fiammifero) nella goccia di soluzione fisiologica.
3. Nella stessa maniera stemperare una seconda porzione nella soluzione di Dobell.
4. Coprire le gocce con vetrini coprioggetto da 22 x 22 o 24 x 24 mm o anche di dimensioni maggiori e leggere al microscopio.
5. Esaminare sistematicamente tutto il preparato a 100x come indicato in figura. In presenza di elementi sospetti passare a 400x per uno studio più dettagliato.
   Esaminare almeno un terzo del preparato a 400x anche se a 100x non si è osservato nulla di sospetto.

   Nota: Per alcuni potrebbe essere preferibile utilizzare due diversi vetrini, uno con la soluzione fisiologica e l'altro con la soluzione di Dobell.



Da: Bernieri F, Crotti D, Galli D, Raglio A. Manuale Illustrato di Diagnostica Parassitologica (modificata)

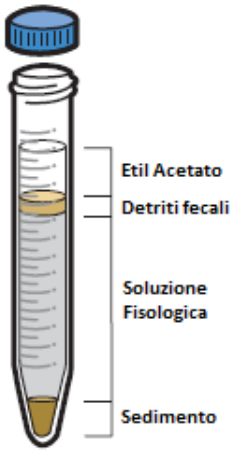
15.5 CONCENTRAZIONE FORMOLO-ETIL ACETATO

A partire da feci fresche

1. Per mezzo di una palettina di legno, stemperare 1 grammo di feci in una provetta contenente 10 ml di formalina al 10% fino ad ottenere una sospensione omogenea e lasciare riposare per almeno 30 minuti.
2. Aggiungere 100 µL (4 gocce) di Triton X 100 e agitare per mescolare il detergente.
3. Filtrare la sospensione in una provetta conica da 15 ml con un filtro con pori da 425 µm o con un doppio strato di garza inumidita posto su un imbutino.

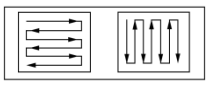
A partire da feci in fissativo

1. Risospendere accuratamente la miscela fissativo/feci.
2. Aggiungere 100 µL (4 gocce) di Triton X 100 e agitare per mescolare il detergente.
3. Filtrare 3-4 mL della miscela fissativo/feci in una provetta conica da 15 ml con un filtro con pori da 425 µm o con un doppio strato di garza inumidita posto su un imbutino e portare a circa 10 mL aggiungendo soluzione fisiologica.
4. Centrifugare a 500 g per 10 minuti. Il sedimento dovrebbe essere di 0,5-1 mL; nel caso fosse di più eliminare parte del sedimento, se di meno aggiungere altro materiale dopo averlo filtrato e centrifugare nuovamente. Un sedimento eccessivo o insufficiente determina una concentrazione inefficace.
5. Eliminare il surnatante e rompere il sedimento con un bastoncino di legno.
6. Aggiungere al sedimento 7 ml di soluzione fisiologica, tappare e miscelare.
7. Aggiungere 3 ml di etil acetato, tappare la provetta e agitarla vigorosamente per 30 secondi (su Vortex per almeno 10-15 secondi).
8. Attendere 15-30 secondi e allentare i tappi.
9. Centrifugare a 1200 g per 3 minuti.
10. Al termine della centrifugazione si formeranno 4 strati: a) il solvente; b) i detriti fecali; c) la soluzione fisiologica; d) il sedimento contenente i parassiti.
11. Con l'ausilio di una bacchettina di legno, staccare delicatamente il tappo di detriti fecali dal bordo della provetta.



Da: *Bench aids for the diagnosis of intestinal parasites*. WHO 2019

12. Con un movimento rapido rovesciare la provetta ed eliminare il surnatante.
13. Prima di riportare la provetta in posizione verticale, pulirne molto bene le pareti con un tamponcino di cotone per eliminare l'etil acetato rimasto adeso.
14. Miscelare il sedimento con il liquido rimasto (aggiungere, se necessario, 2-3 gocce di soluzione fisiologica).
15. Allestire su uno stesso vetrino (o su due vetrini) due preparati, uno con una goccia di sedimento, l'altro con una piccola goccia di sedimento e una goccia di soluzione di Dobell.
16. Coprire i preparati con vetrini coprioggetto e esaminare sistematicamente tutto il preparato a 100x come indicato in figura. In presenza di elementi sospetti passare a 400x per uno studio più dettagliato.



17. Esaminare anche almeno un terzo del preparato a 400x anche se a 100x non si è osservato nulla di sospetto.

15.6 CONCENTRAZIONE CON FLOTTAZIONE

- Soluzione satura di cloruro di sodio: peso specifico 1,20.
  NaCl 500 g + Acqua calda 1.000 mL.
- Soluzione di Zinco solfato ($ZnSO_4$ $7H_2O$): peso specifico 1,20.
  Zinco solfato 330 g + Acqua 500 mL. Dopo aver sciolto portare a 1.000 mL.
- Soluzione di Zinco solfato ($ZnSO_4$ $7H_2O$): peso specifico 1,35.
  Zinco solfato 685 g + Acqua 685 mL.

  Sciogliere i sali (NaCl o $ZnSO_4$) in acqua agitando la miscela su un agitatore magnetico o meccanico per una notte. Verificare il peso specifico con un densimetro.

A partire da feci fresche

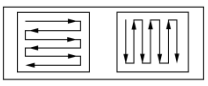
1. Per mezzo di una palettina di legno, stemperare 3 grammi di feci in una provetta contenente 10 ml di formalina al 10% fino ad ottenere una sospensione omogenea e lasciare riposare per almeno 30 minuti.
2. Filtrare la sospensione in una provetta a fondo conico per mezzo di un filtro con pori da 425 µm o con un doppio strato di garza inumidita posto su un imbutino; lasciare almeno un cm di vuoto sopra la sospensione.

A partire da feci in fissativo

1. Risospendere accuratamente la miscela fissativo/feci.
2. Filtrare 3-4 mL della miscela fissativo/feci in una provetta a fondo conico per mezzo di un filtro con un filtro con pori da 425 µm o con un doppio strato di garza inumidita posto su un imbutino e portare a circa 10 ml aggiungendo soluzione fisiologica; lasciare almeno un cm di vuoto sopra la sospensione.
3. Centrifugare a 500 g per 10 minuti o a 1.500 g per 3 minuti. Il sedimento dovrebbe essere di 0,5-1 mL, nel caso fosse di più eliminare parte del sedimento, se di meno aggiungere altro materiale dopo averlo filtrato e centrifugare nuovamente. Un sedimento eccessivo o insufficiente determina una concentrazione inefficace.
4. Scartare il surnatante. Con una pipetta risospendere il sedimento in soluzione fisiologica e centrifugare come al punto 3.
5. Con una pipetta risospendere il sedimento in 10 ml di soluzione di flottazione e centrifugare per 5 minuti a 800-1.000 g.
6. Rimuovere molto delicatamente la provetta dalla centrifuga e aggiungere alcune gocce di soluzione di flottazione in modo da formare un menisco (vedi figura).

Da: *Bench aids for the diagnosis of intestinal parasites*. WHO 2019

7. Dopo circa 10 minuti raccogliere la parte superiore del menisco ponendo un vetrino coprioggetto sopra di esso, quindi appoggiare il vetrino a faccia in giù su un vetrino portaoggetto.
   In alternativa con una pipetta Pasteur o con un'ansa da batteriologia prelevare una o due gocce dalla pellicola di superficie e depositarle su un vetrino portaoggetto. Non utilizzare l'ansa come un mestolo, toccare semplicemente la superficie facendo in modo che l'anello sia parallelo alla superficie del liquido. Assicurarsi che la punta della pipetta o l'ansa non siano al di sotto della pellicola superficiale.
8. È possibile allestire un secondo preparato con l'aggiunta di una goccia di soluzione di Dobell.
9. Esaminare sistematicamente tutto il preparato a 100x come indicato in figura. In presenza di elementi sospetti passare a 400x per uno studio più dettagliato.



10. Esaminare anche almeno un terzo del preparato a 400x anche se a 100x non si è osservato nulla di sospetto.

Nota: dato l'elevato peso specifico diverse uova di elminti (uova opercolate e uova non fertili di *Ascaris*) non flottano e si possono trovare al fondo della provetta tra i detriti fecali; pertanto di deve esaminare a 100x anche il sedimento.

15.7 MINI-FLOTAC

Procedura a partire da feci fresche

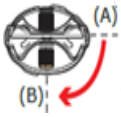
1. Aggiungere 38 mL di soluzione di flottazione (rapporto di diluizione 1:20) nel contenitore Fill-FLOTAC. Il contenitore Fill-FLOTAC ha una scala graduata.

2. Omogeneizzare accuratamente il campione fecale mescolando con una spatola di legno, quindi riempire il raccoglitore conico (2 g di feci) del Fill-FLOTAC e livellare la superficie.

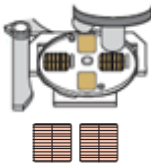
3. Chiudere il Fill-FLOTAC e omogeneizzare la sospensione fecale pompando il collettore conico su e giù (10 volte) nel contenitore, ruotando a destra e sinistra.

4. Posizionare il puntale fornito col kit sul foro laterale del Fill-FLOTAC. Invertire 5 volte il Fill-FLOTAC per miscelare il campione e riempire le camere di flottazione del Mini-FLOTAC con la sospensione fecale fino a formare un piccolo menisco. Per evitare la formazione di bolle d'aria, le camere devono essere riempite con l'apparato Mini-FLOTAC tenuto in pendenza.

5. Dopo 10 minuti, utilizzando la chiave fornita con il kit, effettuare la traslazione, ovvero ruotare il disco di lettura in senso orario (circa 90°) fino all'arresto del disco di lettura (da A a B). Questa operazione permette di separare i parassiti che flottano dai detriti fecali.



6. Rimuovere la chiave ed esaminare il Mini-FLOTAC al microscopio.



7. Contare gli elementi parassitari (trofozoiti, cisti, oocisti uova, larve) osservati nelle griglie del vetrino Mini-FLOTAC. Moltiplicando per 10 si ottiene il numero di parassiti per grammo di feci.

Il Kit Mini-FLOTAC è reperibile in commercio.

Da: *Bench aids for the diagnosis of intestinal parasites*. WHO 2019 (modificata)

15.8 MINI-FLOTAC

Procedura a partire da feci in formalina 5-10% fissate in laboratorio

1. Omogeneizzare accuratamente il campione fecale mescolando con una spatola di legno, quindi riempire il raccoglitore conico (2 g di feci) del Fill-FLOTAC e livellare la superficie.

2. Aggiungere 2 mL di formalina al 5-10%.

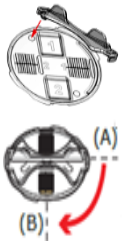
3. Chiudere il Fill-FLOTAC e omogeneizzare la sospensione fecale pompando il collettore conico su e giù (10 volte) nel contenitore, ruotando a destra e sinistra.

4. Aggiungere soluzione di flottazione nel contenitore Fill-FLOTAC fino a 40 mL (rapporto di diluizione 1:20). Il contenitore Fill-FLOTAC ha una scala graduata.

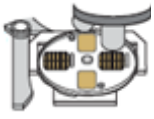
5. Posizionare il puntale fornito col kit sul foro laterale del Fill-FLOTAC. Invertire 5 volte il Fill-FLOTAC per miscelare il campione e riempire le camere di flottazione del Mini-FLOTAC con la sospensione fecale fino a formare un piccolo menisco. Per evitare la formazione di bolle d'aria, le camere devono essere riempite con l'apparato Mini-FLOTAC tenuto in pendenza.

6. Omogeneizzare la sospensione fecale pompando il collettore conico su e giù (10 volte) nel contenitore, ruotando a destra e sinistra.

3. Dopo 10 minuti, utilizzando la chiave fornita con il kit, effettuare la traslazione, ovvero ruotare il disco di lettura in senso orario (circa 90°) fino all'arresto del disco di lettura (da A a B). Questa operazione permette di separare i parassiti che flottano dai detriti fecali.



4. Rimuovere la chiave ed esaminare il Mini-FLOTAC al microscopio.



5. Contare gli elementi parassitari (trofozoiti, cisti, oocisti uova, larve), osservati nelle griglie del vetrino Mini-FLOTAC. Moltiplicando per 10 si ottiene il numero di parassiti per grammo di feci.

Il Kit Mini-FLOTAC è reperibile in commercio.

Da: *Bench aids for the diagnosis of intestinal parasites*. WHO 2019 (modificata)

15.9 SCOTCH TEST (TEST DI GRAHAM)

Questa tecnica è il metodo di scelta per la ricerca di uova di *Enterobius vermicularis* (ossiuri) e occasionalmente vermi adulti e uova di *Taenia* spp.
Lo Scotch test deve essere eseguito al mattino prima che il paziente defechi e/o si lavi.

1. Tagliare un pezzo di nastro adesivo trasparente e porlo su un abbassalingua (la parte adesiva all'esterno); premere il nastro adesivo sulle pliche perianali sia a destra che a sinistra. Le uova e/o i vermi presenti sulla cute aderiranno al nastro.
2. Porre la parte adesiva del nastro su un vetrino portaoggetto facendolo aderire perfettamente.
3. Osservare al microscopio a 100x, 200x, 400x per cercare e identificare le uova e/o i vermi.

Per facilitare la lettura, chiarificando il preparato, è possibile staccare lo scotch dal vetrino, mettere una goccia di toluene o di Hemo-De® e reincollare il nastro adesivo sul vetrino.

Da: *Bench aids for the diagnosis of intestinal parasites*. WHO 2019

Attenzione
Le uova di *E. vermicularis* sono infettive già al momento dell'emissione. Indossare sempre guanti monouso sia per il prelievo che per l'analisi.

15.10 TAMPONE PERIANALE

È una tecnica alternativa per la ricerca di uova di *Enterobius vermicularis* (ossiuri), ma lo Scotch test rimane la tecnica d'elezione.
Il tampone perianale deve essere eseguito al mattino prima che il paziente defechi e/o si lavi.

Per la raccolta deve essere utilizzato un tampone di cotone contenuto in una provetta asciutta munita di un tappo.

1. Inumidire il batuffolo di cotone con qualche goccia di acqua o soluzione fisiologica.
2. Allargare i glutei e strofinare il batuffolo di cotone inumidito sull'area intorno all'ano, ma NON inserirlo nell'ano.
3. Riporre il tampone nella provetta, tappare ed inviare al laboratorio.

In laboratorio

1. Aggiungere 2-3 mL di soluzione fisiologica nella provetta con il tampone.
2. Spremere molto bene il tampone, anche aiutandosi con un Vortex, nella soluzione fisiologica per liberare le uova nel liquido.
3. Eliminare il tampone e centrifugare a 500 g per 3-5 minuti.
4. Prelevare una o due gocce dal fondo della provetta e osservare al microscopio a 100x, 200x, 400x.

Attenzione
Le uova di *E. vermicularis* sono infettive già al momento dell'emissione. Indossare sempre guanti monouso sia per il prelievo che per l'analisi.

15.11 IDENTIFICAZIONE DELLE PROGLOTTIDI DI *TAENIA* SPP.

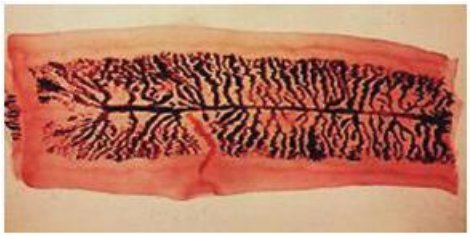
ATTENZIONE: le proglottidi gravide contengono uova, quelle di *Taenia solium* rappresentano un potenziale pericolo in termini di possibile ingestione/inalazione/deglutizione che può causare cisticercosi. Indossare maschera e guanti quando si eseguono le procedure sotto riportate.

15.11.1 INIEZIONE DI COLORANTI NELLE PROGLOTTIDI

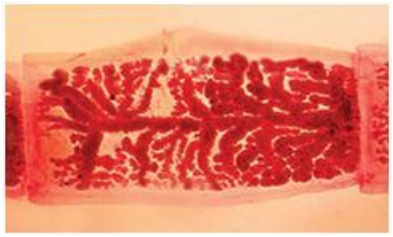
1. Recuperare le proglottidi dalle feci e lavarle con acqua.
2. Lasciarle in acqua per diverse ore al fine di ammorbidirle.
3. Individuare il poro genitale della proglottide da esaminare.
4. Per mezzo di una siringa da insulina iniettare lentamente nel poro il colorante (es. inchiostro di china o altro colorante).
5. Dopo l'iniezione, sciacquare la proglottide gravida con acqua di rubinetto, asciugare con carta assorbente e posizionare la proglottide colorata tra due vetrini portaoggetto.
6. Fissare tra di loro i due vetrini con elastici posti a ciascuna estremità o con nastro adesivo.
7. Esaminare il preparato osservando la conformazione dell'utero.

Identificazione

- *Taenia saginata*: utero con una cavità centrale e con 18-30 ramificazioni principali.
- *Taenia solium*: utero con una cavità centrale e con fino a 13 (in media 9) ramificazioni principali.



T. saginata



T. solium

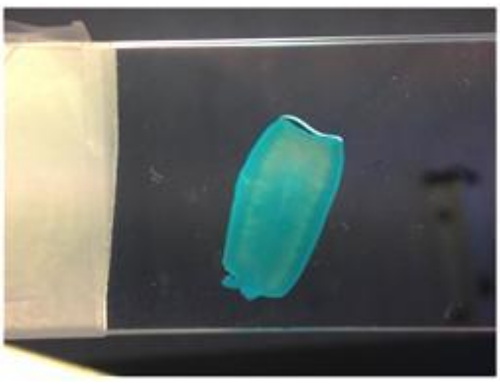
Da: L. S. Garcia. *Diagnostic Medical Parasitology*

15.11.2 CHIARIFICAZIONE DELLE PROGLOTTIDI CON ACIDO ACETICO

1. Recuperare le proglottidi dalle feci e lavarle con acqua.
2. Immergerle per almeno 4-5 ore in acido acetico (meglio *overnigth*).
3. Estrarre la proglottide da esaminare e porla tra due vetrini copri oggetto.
4. Comprimere con forza la proglottide tra i vetrini ed osservare controluce la conformazione dell'utero.

Identificazione

Vedi i criteri indicati in "Iniezione di coloranti nelle proglottidi"



T. saginata

La proglottide della figura sopra riportata, dopo la chiarificazione con acido acetico, è stata messa in una soluzione di verde malachite al 5% per 30' per permettere l'esecuzione della fotografia (di difficile esecuzione contro luce).

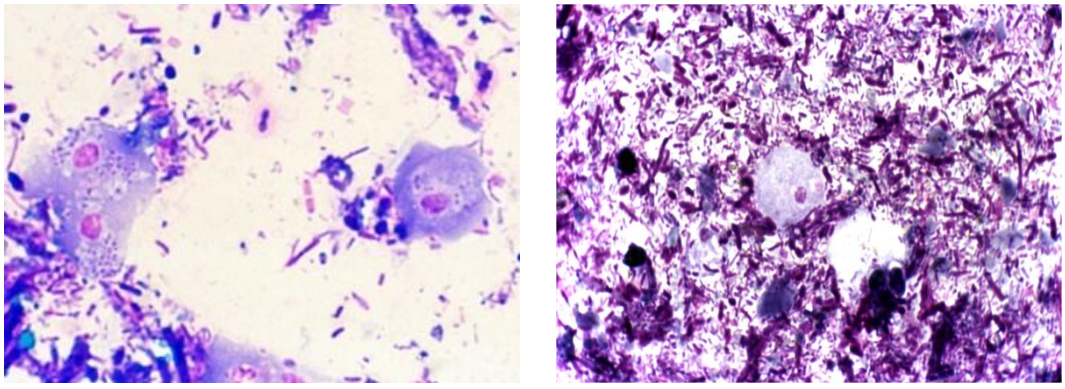
15.12 COLORAZIONE DI GIEMSA PER *DIENTAMOEBA FRAGILIS*

È la colorazione permanente raccomandata dal Comitato per lo Studio della Parassitologia dell'AMCLI (CoSP) per la ricerca di routine di *Dientamoeba fragilis.*
Possono essere facilmente trovate e identificate anche *Blastocystis* spp. e *G. duodenalis*, ma per questi due protozoi la tecnica microscopica d'elezione è la ricerca dopo concentrazione.

Per questa colorazione sono necessarie feci fresche, anche refrigerate.

1. Strisciare una piccola porzione di feci su un vetrino portaoggetto in modo da ottenere un preparato sottile; se le feci sono troppo dure ammorbidirle con un po' di soluzione fisiologica (mai con acqua), se sono liquide o semi liquide miscelarle con carbone vegetale in proporzione 1:1.
2. Far asciugare all'aria.
3. Fissare con metanolo per 1 minuto.
4. Eliminare il metanolo e far asciugare all'aria.
5. Immergere il preparato in soluzione di Giemsa al 10% e colorarlo per 20-25 minuti.
6. Lavare bene con acqua di fonte.
7. Far asciugare all'aria.
8. Leggere con microscopio ottico a 1.000x in immersione.

I nuclei (1 o 2) e la cromatina dei parassiti si colorano in rosso, il citoplasma in azzurro, azzurro chiaro, grigio-azzurro.



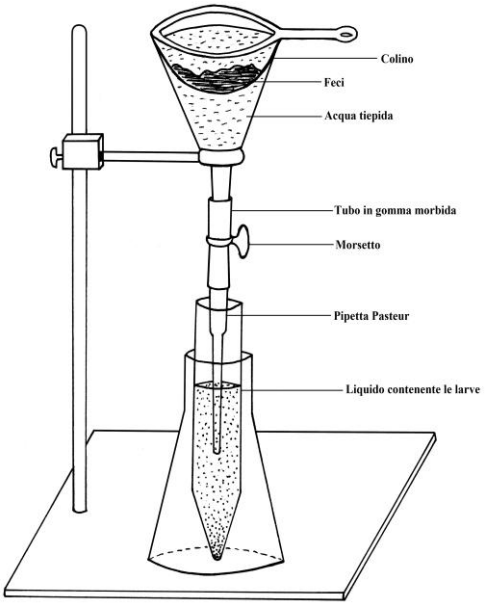
Trofozoiti di *D. fragilis* 1.000x

15.13 METODO DI BAERMANN

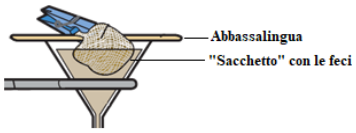
È una tecnica di concentrazione per le larve di *Strongyloides stercoralis*. Sfrutta la termotassi positiva e la idrofilia delle larve che presentano anche una fototassi positiva.

Con il metodo di Baermann è possibile concentrare anche i trofozoiti di *Balantidium coli*.
Possono essere utilizzate solo feci fresche, non refrigerate o congelate.

1. Omogeneizzare il campione fecale; se le feci sono troppo dure ammorbidirle con un poco di soluzione fisiologica. Se le feci sono diarroiche porre un disco di carta da filtro sopra la garza di cui al punto 2.
2. Porre circa 10 g di feci all'interno di un doppio strato di garze in modo da formare un "sacchetto".
3. Sistemare il "sacchetto" nell'imbuto assicurandosi che rimanga sospeso utilizzando come supporto un abbassalingua o mettendolo in un colino da tè.
4. Riempire l'imbuto fino all'orlo con acqua tiepida (o soluzione fisiologica tiepida).
5. Una sorgente luminosa può essere posizionata sotto l'apparecchio Baermann per favorire la migrazione delle larve (questo passaggio non è essenziale).
6. Dopo circa 2-3 ore, allentare il morsetto all'estremità del tubo e trasferire circa 10 ml del liquido sedimentato in una provetta conica.
7. Centrifugare la provetta a 500 g per 3-5 minuti.
8. Eliminare il surnatante.
9. Trasferire alcune gocce del sedimento su un vetrino portaoggetto, coprire con un coprioggetto ed esaminare al microscopio per la presenza di larve mobili.



Apparato di Baermann



Da: *Bench aids for the diagnosis of intestinal parasites*. WHO 2019

Larve di *S. stercoralis*

<u>Attenzione</u>
Il campione ottenuto con il metodo di Baermann può contenere larve filariformi L3 trasmissibili al contatto con la cute e con le mucose; indossare sempre guanti monouso e dispositivi per la protezione facciale (aerosol).

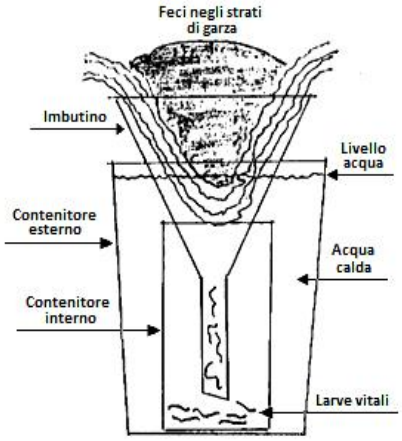
15.14 MODIFICHE AL METODO DI BAERMANN

Il metodo di Baermann è alquanto macchinoso per cui sono state proposte diverse modifiche per renderlo più agevole. Qui ne presentiamo tre.

Prima modifica

Materiale occorrente: garze, un imbutino metallico o in plastica, un contenitore grande tipo un vasetto per urine (contenitore esterno) e un contenitore più piccolo tipo contenitore per feci (contenitore interno).

1. Filtrare circa 20 g di feci con acqua calda attraverso un quadruplo strato di garza posto in un imbutino che sbocca nel contenitore interno.
2. Aggiungere acqua calda nel contenitore esterno in modo da garantire una temperatura adeguata e omogenea.
3. A filtrazione avvenuta il dispositivo è messo in termostato a 37° C per 2-3 ore.
4. Con una pipetta Pasteur raccogliere almeno 10 mL del sedimento al fondo del contenitore interno, trasferirlo in una provetta conica e centrifugare a 500 g per 3-5 minuti.
5. Trasferire alcune gocce del sedimento della provetta su un vetrino portaoggetto, coprire con un coprioggetto e esaminare al microscopio per la presenza di larve mobili.

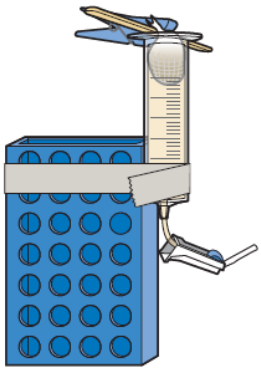


Da: Del Sante M, Fonzo G, Crotti D. Microbiologia Medica Vol 12, N. 3, 1997

Seconda modifica

Materiale occorrente: garze, una siringa da 50 mL, una cannula con deflussore per endovena.

1. Porre il "sacchetto" con le feci nella siringa assicurandosi che rimanga sospeso utilizzando come supporto un abbassalingua.
2. Riempire la siringa fino all'orlo con acqua tiepida (o soluzione fisiologica tiepida).
3. Dopo circa 2-3 ore, allentare il deflussore e trasferire circa 10 ml di sedimento in una provetta conica.
4. Centrifugare la provetta per centrifugare a 500 g per 3-5 minuti.
5. Eliminare il surnatante.
6. Trasferire alcune gocce del sedimento su un vetrino portaoggetto, coprire con un coprioggetto ed esaminare al microscopio per la presenza di larve mobili.



Da: *Bench aids for the diagnosis of intestinal parasites*. WHO 2019

Terza modifica

Materiale occorrente: garze, un bicchiere conico per sedimentazione.

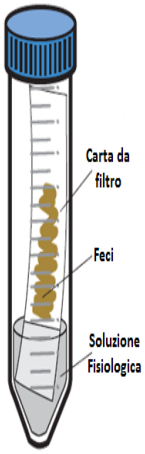
1. Fissare con una molletta il "sacchetto" con le feci alla parete del bicchiere.
2. Riempire il bicchiere con acqua tiepida (o soluzione fisiologica tiepida) fino a coprire quasi completamente il "sacchetto".
3. Dopo 2-3 ore, con una pipetta, raccogliere almeno 10 mL del liquido sedimentato al fondo del bicchiere, trasferirlo in una provetta conica e centrifugare per centrifugare a 500 g per 3-5 minuti.
4. Trasferire alcune gocce del sedimento della provetta su un vetrino portaoggetto, coprire con un coprioggetto e esaminare al microscopio per la presenza di larve mobili.

Da: *Bench aids for the diagnosis of intestinal parasites*. WHO 2019

15.15 COLTURA SU CARTA DA FILTRO SECONDO HARADA-MORI

Questa tecnica è utilizzata per la ricerca di larve di Ancilostomidi (*Ancylostoma/Necator* spp.) di *Stongyloides stercoralis* e di *Trichostrongylus* spp.
Possono essere utilizzate solo feci fresche, non refrigerate o congelate.

1. Tagliare una striscia di carta da filtro di circa 13 x 1,2 cm.
2. Porre in una provetta da 15 ml con fondo conico 3-4 ml di acqua distillata.
3. Omogeneizzare il campione fecale; se le feci sono troppo dure, ammorbidirle con un po' di soluzione fisiologica o di acqua; se sono liquide o semi liquide miscelarle con carbone vegetale in proporzione 1:1.
4. Con una spatolina di legno spargere circa 0,5-1 grammi di feci al centro della striscia di carta.
5. Introdurre la striscia con il materiale fecale nella provetta, curando che la parte terminale peschi nell'acqua senza toccare il fondo della provetta e che le feci siano leggermente sopra il livello dell'acqua (circa 0,5-1 cm).
6. Tappare le provette con un tappo di sughero o con un tampone di cotone; se si usa un tappo a vite tenerlo allentato, l'aria deve poter entrare nella provetta.
7. Incubare fino a 10 giorni a 24-28° C o a temperatura ambiente al riparo dalla luce. Aggiungere soluzione fisiologica per mantenere il livello originale (di solito l'evaporazione avviene nei primi due giorni, poi la coltura si stabilizza)(*).
8. Al decimo giorno aprire la provetta, gettare la striscia di carta e aggiungere 10-12 ml di formalina al 10%.
9. Attendere 30-60 minuti per permettere la devitalizzazione delle larve, quindi centrifugare a 500 g per 3-5 minuti e eliminare il surnatante.
10. Risospendere il sedimento e porne una goccia su un vetrino portaoggetto, coprire con un coprioggetto ed esaminare al microscopio per la presenza di larve.



Da: *Bench aids for the diagnosis of intestinal parasites*. WHO 2019

(*) Prelevare quotidianamente 1-2 gocce di liquido dal fondo della provetta ed esaminare al microscopio per la presenza di larve.

Attenzione
A partire dal terzo giorno della coltura possono essere presenti larve filariformi L3 infestanti. Poiché le larve possono migrare anche verso l'alto della striscia di carta da filtro, per prevenire infezioni accidentali è necessario prestare attenzione nel maneggiare sia la fase liquida che la striscia di carta; indossare sempre guanti monouso e dispositivi per la protezione facciale (aerosol).

15.16 COLTURA SU AGAR PER *STRONGYLOIDES STERCORALIS*

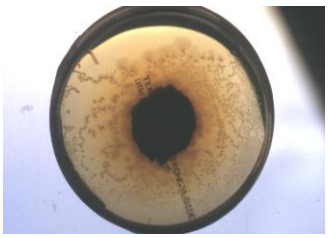
La coltura su agar è considerato il metodo più efficiente per la ricerca diretta delle larve di *Strongyloides stercoralis*, in particolare nei pazienti immunodepressi.
Viene utilizzato un terreno specifico facilmente preparabile in laboratorio (Agar 1,5%, Peptone 1%, Estratto di carne 0.5%, NaCl 0,5%), ma che è anche reperibile in commercio pronto per l'uso.
Le piastre, da 90 mm di diametro, contengono al massimo 10 mL di terreno; lo spessore dell'agar è quindi inferiore a quello di un normale terreno batteriologico, ciò facilita la lettura al microscopio.
Se presenti, le larve migrano nell'agar trascinando con sé batteri creando così delle tracce visibili al microscopio, ma anche a occhio nudo.
Nota: la formazione di tracce dovute alla migrazione delle larve è stata segnalata anche con altri tipi di agar nutrienti non selettivi, tuttavia la formula del terreno sopra indicata è la più appropriata se si vuole garantire l'elevata sensibilità della tecnica.
Insemenzare almeno tre piastre per ciascun campione fecale.

1. Porre al centro dell'agar 6-7 grammi di feci; se le feci sono troppo dure ammorbidirle con un po' di soluzione fisiologica o di acqua, se sono liquide o semi liquide miscelarle con carbone vegetale in proporzione 1:1.
2. Chiudere la piastra e sigillare il coperchio con nastro adesivo o con Parafilm®.
3. Incubare la piastra (lato con agar rivolto verso l'alto) per 2 giorni a 24-28° C o a temperatura ambiente, al riparo dalla luce.
4. Dopo 2 giorni esaminare la piastra al microscopio utilizzando, se possibile, uno stereomicroscopio (obiettivi 5x, 10x). In presenza di tracce o di larve, in genere reperibili all'estremità delle tracce lontano dalle feci, procedere come indicato al punto successivo. In caso di negatività prolungare l'incubazione fino a 7 giorni controllando giornalmente la coltura.
5. Forare il coperchio della piastra utilizzando le punte riscaldate di una pinzetta.
6. Attraverso l'apertura effettuata irrorare la superficie dell'agar con 5-10 ml di formalina al 10% e lasciar agire per 30-60 minuti.
7. Trasferire, con una pipetta Pasteur o servendosi di un imbutino, il liquido in una provetta da 15 ml con fondo conico. Non tentare di versare la formalina direttamente nella provetta da centrifuga; la dimensione dell'apertura della provetta è troppo piccola e la formalina potrebbe essere versata sul piano di lavoro.
8. Centrifugare a 500 g per 3-5 minuti, eliminare il sovranatante ed esaminare il sedimento al microscopio a 100x e a 400X per confermare l'identificazione.

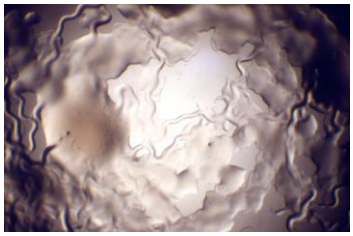
Se è presente *S. stercoralis*, dopo diversi giorni, si possono trovare oltre che le larve anche vermi adulti allo stadio di vita libera.

Possono essere trovate anche larve di Ancilostomidi e di *Trichostrongylus* spp.; è quindi necessario saper distinguere i vari tipi di larve.

Inoculo
Da: *Bench aids for the diagnosis of intestinal parasites*. WHO 2019



Piastra dopo 2 giorni di incubazione
Sono visibili le tracce causate dalla migrazione delle larve (linee di batteri)



Esame microscopico della piastra
Sono visibili le larve

Attenzione
Il campione ottenuto può contenere larve filariformi L3 trasmissibili al contatto con la cute e con le mucose; indossare sempre guanti monouso e dispositivi per la protezione facciale (aerosol).

15.17 METODO DI KATO-KATZ

La tecnica di Kato-Katz è il metodo diagnostico raccomandato dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) per il monitoraggio di programmi di trattamento su larga scala implementati per il controllo delle infezioni da geoelminti, grazie al suo semplice formato e alla sua facilità d'uso nel campo. È anche la tecnica elettiva per la diagnosi e il monitoraggio delle schistosomiasi intestinali.

Devono essere utilizzate feci fresche, formate o semi formate, anche refrigerate. In alternativa è possibile utilizzare feci conservate con l'aggiunta di sodio azide in polvere.

È un metodo quantitativo che permette di calcolare il numero di uova per grammo di feci (UPG) e quindi la carica infestante.

Per poter calcolare il numero di uova per grammo di feci/die vanno raccolte le feci delle 24 ore (in genere una defecazione).

Le uova di *A. lumbricoides*, *T. trichiura* e degli Schistosomi sono visibili e riconoscibili per parecchi mesi, mentre le uova degli Ancilostomidi (*A. duodenale* e *N. americanus*) diafanizzano rapidamente e non sono più visibili (o mal visibili) dopo 30-60 minuti. Non è tecnica idonea per le larve di Nematodi.

La metodica qui presentata è quella proposta dall'OMS, che fornisce un kit per i paesi a basso reddito. Sono anche disponibili kit commerciali.

Materiali occorrenti

- Spatoline di plastica (Fig a).
- Filtri di nylon con pori da 60-105 µm (Fig a).
- Mascherine (*templates*) di plastica o di acciaio o di cartone monouso (Fig a), che possono avere diversi spessori e fori contenendo quindi diverse quantità di feci: spessore di 1,5 mm, con un foro di 6 mm di diametro (contiene 41,7 mg di feci); spessore di 1 mm, con un foro di 9 mm di diametro (contiene 50 mg di feci); spessore di 0,5 mm, con un foro di 6,5 mm di diametro (contiene 20 mg di feci).
- Vetrini portaoggetto (Fig a).
- Rettangoli di cellofan idrofilo da circa 25 x 30 mm. Il cellofan può essere fornito in nastro da cui vanno ritagliati i rettangoli (Fig. b).
  I rettangoli di cellofan, vanno preparati per l'uso e conservati immergendoli in una soluzione di glicerina al 50% contenente verde malachite (100 mL di acqua distillata + 100 mL di glicerina + 1 mL di soluzione acquosa al 3% di verde malachite).
- Carta da filtro.
- Pinzette

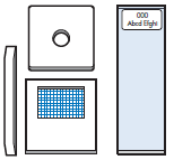


Fig. a
Da: *Bench aids for the diagnosis of intestinal parasites*. WHO 2019

Fig. b
Da: *Bench aids for the diagnosis of intestinal parasites*. WHO 1994

Esecuzione

1. Con una spatola o un abbassalingua in legno mescolare e omogeneizzare le feci.
2. Porre una piccola quantità di feci su un foglio di carta da filtro e coprirla con un filtro di nylon.
3. Utilizzando la spatolina fornita con il kit forzare il materiale attraverso il filtro (Fig 1).
4. Raccogliere il materiale fecale filtrato e trasferirlo nel foro della mascherina posta al centro di un vetrino portaoggetto, livellando il materiale fecale alla superficie della mascherina (Fig 2).

Fig. 1

Fig. 2
Da: *Bench aids for the diagnosis of intestinal parasites*. WHO 2019

5. Con una pinzetta porre un rettangolino di cellofan imbibito di glicerolo sul campione fecale (Fig 3).

Fig. 3

6. Capovolgere il vetrino (Fig. 4) e premerlo su una superficie piana e liscia (Fig 5), in modo da allargare il materiale formando un cerchietto (Fig 6).

Fig. 4

7. Rigirare il vetrino ed attendere circa 45-60 minuti prima di leggerlo per permettere l'evaporazione dell'acqua della soluzione di glicerolo e quindi la diafanizzazione delle feci(§).

Fig. 5

8. Leggere sistematicamente tutto il preparato e contare tutte le uova osservate.

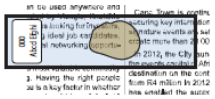


Fig 6

Da: *Bench aids for the diagnosis of intestinal parasites*. WHO 2019

9. Per ottenere il numero di uova per grammo moltiplicare il numero delle uova osservate come indicato in tabella:

Quantità di feci esaminate	**Fattore di moltiplicazione**
41,7 mg (*template* 1,5 mm x 6 mm)	Moltiplicare per 24
50 mg (*template* 1 mm x 9 mm)	Moltiplicare per 20
20 mg (*template* 0,5 mm x 6,5 mm)	Moltiplicare per 50

(§) Per la ricerca di uova di Ancilostomidi leggere il vetrino dopo pochi minuti dalla preparazione.

Nota: nel caso non fosse disponibile un kit contenente le mascherine (*templates*), i filtri e il cellofan:

1. Con una spatola o un abbassalingua in legno mescolare e omogeneizzare le feci.
2. Con una spatolina forzare il materiale fecale attraverso un filtro metallico o di nylon con pori non superiori a 150 µm(*).
3. Pesare 50 mg di feci filtrate e porle al centro di un vetrino portaoggetto.

Da: *Bench aids for the diagnosis of intestinal parasites*. WHO 2019

4. Proseguire come indicato dal punto 5 in poi.

(*) I filtri con pori da 100-150 µm sono reperibili in commercio. Anche il cellofan idrofilo (*wettable cellophane*) è reperibile in commercio.

15.18 METODO DI STOLL PER IL CONTEGGIO DELLE UOVA

Con questa tecnica si può determinare il numero di uova per grammo di feci.
Devono esser utilizzate feci fresche anche refrigerate. Vanno raccolte le feci delle 24 ore (in genere una defecazione, di più se presente diarrea).

Il metodo originale prevede l'utilizzo di 56 mL di idrato sodico 0,1 N e 4 g di feci messi di una fiasca con collo lungo sul quale sono marcati i livelli 56 mL e 60 mL. Dato che è molto difficile che un laboratorio sia in possesso di una fiasca di Stoll, si presenta una modifica che prevede l'uso di un cilindro graduato. Le proporzioni tra idrato sodico e feci sono le stesse del metodo di Stoll originale. Si presenta anche un'ulteriore modifica eseguibile in provetta.

Materiali occorrenti:
Un cilindro graduato da 50 ml, preferibilmente in plastica e senza beccuccio; idrato sodico 0,1 N (4 g di NaOH in 1 litro di acqua distillata); alcune palline di vetro; un tappo di gomma o del Parafilm®; pipette graduate.

1. Con una spatola o un abbassalingua in legno mescolare e omogeneizzare le feci.
2. Mettere nel cilindro 42 mL di idrato sodico.
3. Aggiungere una quantità di feci tale da portare il livello del liquido a 45 mL (circa 3 g di feci).
4. Inserire nel cilindro 4 o 5 di palline di vetro.
5. Chiudere il cilindro con un tappo di gomma o del Parafilm® e lasciarlo per alcune ore a temperatura ambiente scuotendolo vigorosamente di tanto in tanto in modo da lisare le feci e favorire la liberazione delle uova dai detriti fecali.
6. Agitare vigorosamente per 1-2 minuti fino ad ottenere una sospensione omogenea.

7. Con una pipetta graduata prelevare 0,15 mL di sospensione dal centro del cilindro, porla su un vetrino portaoggetto e coprire con un vetrino coprioggetto da 24 x 60.
8. Esaminare sistematicamente tutto il preparato a 100x, contando tutte le uova presenti. Prestare attenzione a non contare lo stesso uovo due volte. A 100x è possibile esaminare il preparato anche senza vetrino coprioggetto.
9. In 0,15 mL di sospensione sono presenti 0,01 mL di feci (3 mL di feci in 45 mL di sospensione); pertanto moltiplicando il numero di uova contate per 100 si ottiene il numero di uova per mL di feci delle 24 ore. Il risultato è: Nr uova per mL di feci.

   Nota: 1 mL di feci formate pesa 1,05-1,07 grammi mentre la stessa quantità feci semi formate pesa da 1,03-1,04. Quindi, nella routine, il risultato può essere espresso come Nr uova per grammo di feci.

La stima del numero di uova per grammo di feci può variare in base alla consistenza delle feci.
Il conteggio è sufficientemente accurato per feci formate e semi formate, mentre negli altri casi alcuni autori hanno proposto dei fattori di correzione.

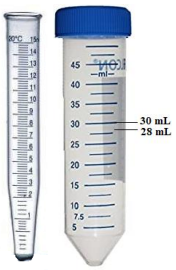
Consistenza delle feci	Fattore di correzione
Molli, ma quasi formate	Nr uova contate X 1,5
Molli	Nr uova contate X 2
Molto molli, ma non liquide	Nr uova contate X 3
Diarroiche	Nr uova contate X 4

METODO DI STOLL

MODIFICA IN PROVETTA

Vengono utilizzate provette graduate da 15 mL o, meglio, da 50 mL. Le proporzioni tra idrato sodico e feci sono le stesse del metodo di Stoll originale.

1. Con una spatola o un abbassalingua in legno mescolare e omogeneizzare le feci.
2. Mettere 14 mL di idrato sodico nella provetta da 15 mL (28 mL nella provetta da 50 mL).
3. Aggiungere una quantità di feci tale da portare il livello del liquido a 15 mL (30 mL nella provetta da 50 mL).
4. Miscelare accuratamente le feci aiutandosi con bastoncino di legno o di plastica. Se le feci sono molto dure lasciare la miscela a temperatura ambiente per alcune ore, agitando di tanto in tanto.
5. Procedere come ai punti da 5 a 8 della metodica sopra riportata.
6. Valutare come al punto 9 della metodica sopra riportata.



15.19 METODO DI McMASTER

La tecnica McMaster permette l'identificazione e la quantificazione del numero di elementi parassiti per grammo di feci. Questo test utilizza uno speciale vetrino con una griglia (camera di conteggio di McMaster)[§].

La metodica sotto riportata si riferisce unicamente al conteggio delle uova di elminti a partire da feci fresche delle 24 ore (in genere una defecazione, di più se presente diarrea).

1. Con una spatola o un abbassalingua in legno mescolare e omogeneizzare le feci.
2. Pesare 2 g di feci in un contenitore becher su una bilancia e diluirli in 28 mL di acqua di fonte. In alternativa, ma con minor precisione, misurare in un becher o in un cilindro graduati 28 mL di acqua e aggiungere feci fino a portare il livello a 30 mL (circa 2 g di feci).
3. Filtrare tutta la sospensione attraverso un colino da tè o un doppio strato di garza inumidita in un secondo becher.
4. Mescolare la sospensione versandola da un becher all'altro per 10 volte, quindi versare circa 13-14 mL di sospensione fecale in una provetta da 15 mL.
5. Centrifugare a 1.500 g per 3 minuti.
6. Scartare il surnatante e risospendere il sedimento con 13-14 mL di soluzione di flottazione (vedi "Concentrazione con Flottazione" a pag. 87).
7. Miscelare accuratamente la sospensione e con una pipetta Pasteur riempire la prima camera del vetrino di McMaster.
8. Miscelare nuovamente la sospensione e con un'altra pipetta riempire la seconda camera del vetrino.

Vetrino di McMaster

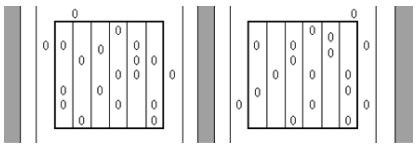
9. Attendere 2-5 minuti. È importante lasciar riposare la sospensione nella camera per permettere alle uova di flottare verso la superficie e ai detriti di sedimentare.
10. Esaminare al microscopio a 100x.

Calcolo del numero di uova per grammo di feci

Ogni camera può contenere 0,15 mL di sospensione fecale.

1. Contare le uova all'interno della griglia di ciascuna camera. Non contare le uova al di fuori dei quadrati.
2. Con un fattore di diluizione delle feci 1:15 (2 g + 28 mL), come nella metodica sopra illustrata, moltiplicare per 50 il numero delle uova contate nelle due camere; si ottiene il "Nr di uova per grammo di feci".

Esempio:


16 uova nella prima camera e 14 nella seconda
(16 + 14) x 50 = 1.500 uova per grammo di feci

La stima del numero di uova per grammo di feci può variare in base alla consistenza delle feci.
Il conteggio è sufficientemente accurato per feci formate e semi formate, mentre negli altri casi alcuni autori hanno proposto dei fattori di correzione.

Consistenza delle feci	Fattore di correzione
Molli, ma quasi formate	Nr uova contate X 1,5
Molli	Nr uova contate X 2
Molto molli, ma non liquide	Nr uova contate X 3
Diarroiche	Nr uova contate X 4

§ I vetrini di McMaster sono reperibili in commercio e sono riutilizzabili mettendoli, dopo l'uso, in una soluzione saponosa con disinfettante, poi sciacquare e asciugare.

15.20 COLORAZIONI ALCOOL-ACIDO RESISTENTI PER COCCIDI

Il campione migliore per le colorazioni dei coccidi è il sedimento dopo concentrazione ottenuto a partire da feci fresche o conservate in fissativi con l'esclusione del PVA e del Zn-PVA.

15.20.1 COLORAZIONE DI ZIEHL-NEELSEN MODIFICATA

1. Con una o due gocce di sedimento allestire su un vetrino portaoggetto uno striscio non troppo spesso e farlo asciugare all'aria. Deve essere possibile leggere caratteri a stampa attraverso il preparato.
2. Fissare il preparato con Metanolo per circa 1 minuto. Eliminare l'eccesso di alcool e far asciugare.
3. Colorare con Carbol Fucsina al 3 o 4% per 5 minuti.
4. Sciacquare con Etanolo al 50% per 3-5 secondi.
5. Sciacquare con acqua di fonte.
6. Decolorare con Acido Solforico al 1% per 1-2 minuti o finché non scorre più colore dal vetrino(*).
7. Sciacquare il vetrino con acqua di fonte e eliminare l'eccesso d'acqua.
8. Contrastare con Verde Malachite al 3% o Blu di Metilene allo 0,3% per 1 minuto.
9. Sciacquare con acqua di fonte e far asciugare il vetrino.
10. Esaminare al microscopio a 400x e a 1.000x in immersione.

(*) Per decolorare invece dell'Acido Solforico al 1% è possibile usare Acido Cloridrico al 3%.
È anche possibile utilizzare una soluzione alcool-acida composta da Acido Cloridico (3 mL) e Etanolo al 95% (97 mL). In questo caso saltare il punto 4 della procedura.
Con l'uso dell'Acido Cloridrico le oocisti di *Cyclospora cayetanensis*, che sono variabilmente alcool-acido resistenti, possono perdere maggiormente il colore.

I reagenti sono disponibili in commercio; se utilizzati è necessario attenersi alle istruzioni dei produttori.

15.20.2 COLORAZIONE CON AURAMINA

1. Con una o due gocce di sedimento allestire su un vetrino portaoggetto uno striscio non troppo spesso e farlo asciugare all'aria. Deve essere possibile leggere caratteri a stampa attraverso il preparato.
2. Fissare il preparato con Metanolo per circa 1 minuto. Eliminare l'eccesso di alcool e far asciugare.
3. Colorare per 15-20 minuti ricoprendo i vetrini con soluzione di Auramina Fenolo(§).
4. Lavare a lungo con acqua.
5. Decolorare con soluzione alcool-acida (Acido Cloridrico al 3%) per 2-3 minuti.
6. Lavare a lungo con acqua.
7. Contrastare ricoprendo i vetrini con soluzione al Permanganato di Potassio allo 0,1% per 2-3 minuti.
8. Lavare a lungo con acqua, far asciugare all'aria e pulire il retro del vetrino con un batuffolo di cotone imbevuto di alcool.
9. Esaminare al microscopio a fluorescenza a 200-250x e a 400x.

(§) Auramina 0,3 g, Fenolo 3 g, Acqua distillata 97 mL. È possibile colorare anche con soluzione di Auramina-Rhodamina in genere utilizzata per la colorazione dei Micobatteri.

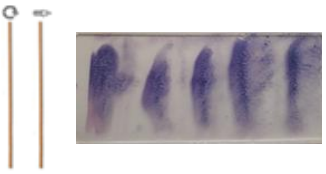
I reagenti sono disponibili in commercio; se utilizzati è necessario attenersi alle istruzioni dei produttori.

15.21 PREPARAZIONE DI STRISCI FECALI PER COLORAZIONI PERMANENTI

Con feci fresche o conservate in PVA o Zn-PVA è possibile eseguire la colorazione Tricromica di Wheatley e con Ematossilina ferrica.
Con feci conservate in SAF è possibile eseguire unicamente la colorazione con Ematossilina ferrica.
Con feci conservate in Fissativi "Ecologici" *One-Vial* seguire le indicazioni del produttore sia per il tipo di colorazione consentita sia per l'esecuzione della colorazione.

A PARTIRE DA FECI FRESCHE

1. Porre una goccia di albumina di Mayer(§) su un vetrino portaoggetto.
2. Con un bastoncino applicatore prelevare una piccola porzione di materiale fecale e stemperarla nell'albumina. NON FAR ASCIUGARE IL PREPARATO.
3. Utilizzando un bastoncino applicatore stendere la miscela sul vetrino in modo da ottenere alternativamente zone spesse e zone sottili. Le aree più spesse possono essere ottenute facendo rotolare il bastoncino, quelle più sottili spingendolo. NON FAR ASCIUGARE IL PREPARATO.



4. Immergere il vetrino in soluzione di Schaudinn e lasciarvelo per 30-60 minuti.
5. Procedere con la colorazione SENZA FAR ASCIUGARE IL PREPARATO.

In alternativa fissare le feci in PVA o Zn-PVA (1 parte di feci + 3 parti di fissativo). In questo caso procedere come sotto indicato.

A PARTIRE DA FECI CONSERVATE IN PVA O ZN-PVA

1. Porre una goccia di materiale fecale su un vetrino portaoggetto.
2. Utilizzando un bastoncino applicatore stendere la miscela sul vetrino in modo da ottenere alternativamente zone spesse e zone sottili. Le aree più spesse possono essere ottenute facendo rotolare il bastoncino, quelle più sottili spingendolo.
3. Far ASCIUGARE PERFETTAMENTE per 8-10 ore (preferibilmente una notte) il vetrino a temperatura ambiente o per 2-3 ore a 37° C.
4. Procedere con la colorazione.

A PARTIRE DA FECI CONSERVATE IN SAF

Per ottenere buoni risultati con la colorazione è consigliabile rimuovere il più possibile la formalina contenuta nel SAF con uno o più lavaggi in soluzione fisiologica.

1. Porre 3-4 mL di materiale da SAF in una provetta da centrifuga (non è necessario filtrarlo) e aggiungere 10 mL di soluzione fisiologica. Miscelare accuratamente.
2. Centrifugare a 500 g per 3-5 minuti e scartare il surnatante.
3. Ripetere il lavaggio per altre 2-3 volte.
4. Porre una goccia di albumina di Mayer(§) su un vetrino portaoggetto.
5. Prelevare una o due gocce del sedimento fecale lavato e miscelarlo bene con la goccia di albumina.
6. Utilizzando un bastoncino applicatore stendere la miscela sul vetrino in modo da ottenere alternativamente zone spesse e zone sottili. Le aree più spesse possono essere ottenute facendo rotolare il bastoncino, quelle più spesse spingendolo.
7. Far ASCIUGARE PERFETTAMENTE per 8-10 ore (preferibilmente una notte) il vetrino a temperatura ambiente o per 2-3 ore a 37° C.
8. Procedere con la colorazione con Ematossilina ferrica a partire dal punto 3 della metodica riportata a pag. 106.

(§) Albumina di Mayer

1. Miscelare delicatamente e accuratamente un albume d'uovo con un'uguale parte di Glicerina.
2. Filtrare la miscela attraverso una garza.
3. Se disponibili, aggiungere alcuni cristalli di Timolo come conservante.
4. Conservare a 4-8° C in una bottiglia scura fino a tre mesi. Etichettare con la data di preparazione.

L'albumina di Mayer pronta per l'uso è disponibile in commercio.

15.22 COLORAZIONE TRICROMICA DI WHEATLEY

Reagenti

Nella procedura per la colorazione il termine xilene è usato in senso generico. Per motivi di sicurezza si raccomandano i sostituti dello xilene tipo Hemo-De®.

1. Colorante tricromico (reperibile in commercio pronto per l'uso)
   - Chromotrope 2R 6 g
   - Light green SF 3 g
   - Acido fosfotungstico 7 g
   - Acido acetico glaciale 10 mL
   - Acqua distillata 1.000 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 per 24 mesi, al buio.
   Sostituire il colorante messo nella vaschetta per colorazioni solo quando questo tende a diventare di colore verde. Agitare delicatamente la vaschetta ed osservare il colorante sulle pareti, se è verde invece che blu-porpora, sostituire.
2. Etanolo 70%
   Sostituire l'alcool messo nelle vaschette per colorazioni ogni 3 settimane o prima se si sono colorati circa 30 vetrini.
3. Soluzione iodio-alcoolica
   - Etanolo al 70% 50 mL
   - Iodio in cristalli 1-2 g

   Sciogliere nell'alcool i cristalli di iodio fino ad ottenere una soluzione satura di colore scuro.
   Diluire parte della soluzione concentrata in alcool etilico al 70% fino ad ottenere la soluzione di lavoro che deve essere di colore scuro rossastro marrone come "tè carico" (soluzione di lavoro).
   Sostituire la soluzione di lavoro messa nella vaschetta per colorazioni quando la soluzione diventa troppo chiara (da 1 a più settimane a seconda del numero di vetrini colorati).
4. Soluzione decolorante alcool-acida
   - Etanolo al 90% 995 mL
   - Acido acetico glaciale 5 mL

   Aggiungere lentamente l'acido acetico all'alcool. Agitare bene.
   Sostituire la soluzione alcool-acida messa nella vaschetta per colorazioni ogni settimana o prima se si sono colorati circa 20 vetrini.
5. Etanolo 100%
   Sostituire l'alcool messo nelle vaschette per colorazioni ogni 2 settimane.
6. Xilene
   Sostituire lo xilene messo nelle vaschette per colorazioni ogni mese.

Tutte le vaschette per colorazione contenenti i reagenti in uso devono essere conservate sotto una cappa chimica e munite di coperchio; quando non in uso sigillare con Parafilm® le vaschette contenenti etanolo, in particolare l'etanolo al 100%, per evitare l'evaporazione.

Esecuzione della colorazione

Per l'allestimento dei vetrini vedi "Preparazione di Strisci Fecali" a pag. 103.

1. Immergere i vetrini in etanolo al 70% per 5 minuti per rimuovere il fissativo di Schaudinn. Questo passaggio può essere evitato per gli strisci da PVA o Zn-PVA. Scolare l'eccesso di liquido appoggiando per 1-2 secondi il bordo di ciascun vetrino su un foglio di carta bibula.
2. Immergere i vetrini nella soluzione iodio-alcoolica per 1 minuto per gli strisci da feci fresche fissate con Schaudinn e 5-10 minuti per gli strisci da PVA o Zn-PVA Scolare l'eccesso di liquido.
3. Immergere i vetrini in etanolo al 70% per 5 minuti. Scolare l'eccesso di liquido.

4. Immergere i vetrini in una seconda vaschetta contenente etanolo al 70% per 3 minuti. Scolare l'eccesso di liquido. I passaggi nell'etanolo al 70% rimuovono lo iodio.
5. Immergere i vetrini nel colorante tricromico per 10 minuti. Scolare l'eccesso di liquido da un vetrino per volta. Se i vetrini sono più di uno, lasciare gli altri nel colorante e decolorarne uno per volta.
6. Immergere il vetrino nella soluzione decolorante per 2-3 secondi. Scolare rapidamente (1 secondo) l'eccesso di liquido e passare al punto successivo. La soluzione decolora per tutto il tempo che rimane a contatto con la superficie del vetrino quindi l'operazione di decolorazione deve essere effettuata al massimo in 3-4 secondi.
7. Immergere due volte i vetrini per 2-3 volte in etanolo al 95%. Questo passaggio serve per sciacquare il vetrino.
8. Immergere i vetrini in una vaschetta contenente etanolo al 100%. per 3 minuti. Scolare l'eccesso di liquido.
9. Immergere i vetrini in una seconda vaschetta contenente etanolo al 100% per altri 3 minuti. Scolare l'eccesso di liquido. I passaggi in etanolo 100% disidratano i preparati.
10. Immergere i vetrini nello xilene per 5-10 minuti. Scolare l'eccesso di liquido.
11. Immergere i vetrini in una seconda vaschetta contenente xilene per 5-10 minuti. Scolare l'eccesso di liquido. I passaggi nello xilene completano la disidratazione.
12. Senza far asciugare porre 2-3 gocce di liquido di montaggio per ciascun vetrino e coprire con un coprioggetto.
13. Lasciare asciugare gli strisci montati per una notte a temperatura ambiente o per un'ora a 37° C.

Nota: se non si vuole montare permanentemente i preparati lasciare asciugare per almeno 15 minuti prima di leggere al microscopio.

Lettura ed interpretazione

1. Leggere al microscopio cominciando ad osservare il vetrino a piccolo ingrandimento per cercare un'area né troppo spessa né troppo sottile. Se il preparato appare troppo spesso cercare un'area un po' più sottile, viceversa se il preparato è troppo sottile cercare un'area un po'più spessa.
2. Mettere una goccia di olio da immersione sul punto prescelto e passare a 1.000 ingrandimenti. Non usare obiettivi a secco. Esaminare almeno 200-300 campi in immersione.

Quando lo striscio è stato ben fissato e la colorazione correttamente effettuata il citoplasma dei trofozoiti si colora in verde-azzurro a volte con sfumature violacee. Le cisti tendono ad essere leggermente più violacee. I nuclei, le inclusioni come emazie e batteri, i corpi cromatoidi si colorano in rosso o rosso-porpora. I lieviti, in genere, si colorano in verde, così come *Blastocystis* spp. Il glicogeno contenuto in alcune cisti si dissolve durante la colorazione. Si vedrà quindi una zona chiara dove era presente.

La fissazione dei campioni è importante. I campioni fissati in modo errato daranno luogo a forme di protozoi che non si colorano o sono prevalentemente rosse.

L'inadeguata rimozione dello iodio con l'etanolo al 70% (punti 3 e 4 della colorazione) causa degli strisci prevalentemente verdi. La colorazione verdastra può essere anche originata da un'eccessiva decolorazione (punto 6 della colorazione).

15.23 COLORAZIONE CON EMATOSSILINA FERRICA

Vi sono numerose modificazioni per il metodo di colorazione con Ematossilina ferrica. Qui viene presentato il metodo modificato secondo Spencer-Monroe che è uno dei più semplici e che, se correttamente eseguito, dà buoni risultati.

Reagenti

Nella procedura per la colorazione il termine xilene è usato in senso generico. Per motivi di sicurezza si raccomandano i sostituti dello xilene tipo Hemo-De®.

1. Ematossilina ferrica
   - Soluzione A
     - Ematossilina in polvere o in cristalli 10 g
     - Etanolo assoluto 1.000 mL

     Sciogliere la polvere nell'alcool in una bottiglia di vetro trasparente. Tappare ermeticamente la bottiglia e porla in un luogo soleggiato (vicino ad una finestra). Far maturare la soluzione per almeno 1 settimana. Di tanto in tanto agitare la bottiglia.

     Conservare a temperatura ambiente e al riparo dalla luce in una bottiglia scura ben chiusa. La soluzione A si conserva per almeno 5 anni.
   - Soluzione B
     - Ammonio ferroso solfato 10 g
     - Ammonio ferrico solfato 10 g
     - Acido Cloridrico 10 ml
     - Acqua distillata 1.000 ml

     Sciogliere l'ammonio solfato ferroso e ferrico nell'acqua. Aggiungere goccia a goccia l'acido cloridrico alla soluzione.

     Conservare a temperatura ambiente e al riparo dalla luce in una bottiglia scura ben chiusa. La soluzione B si conserva per almeno 1 anno.

     Le soluzioni A e B sono reperibili in commercio pronte per l'uso.
   - Soluzione di lavoro
     - Soluzione A 100 ml
     - Soluzione B 100 ml

     Miscelare le due soluzioni e attendere almeno 2 ore prima di usare la soluzione di lavoro (meglio attendere una notte intera).

     Se la soluzione di lavoro viene usata immediatamente i parassiti si colorano di blu intenso rendendo difficile la differenziazione dei dettagli nucleari.

     Sostituire la soluzione di lavoro ogni settimana.
2. Soluzione iodio-alcoolica
   - Etanolo al 70% 50 mL
   - Iodio in cristalli 1-2 g

   Sciogliere nell'alcool i cristalli di iodio fino ad ottenere una soluzione satura di colore scuro. Diluire parte della soluzione concentrata in alcool etilico al 70% fino ad ottenere la soluzione di lavoro che deve essere di colore scuro rossastro marrone come "tè carico" (soluzione di lavoro).

   Sostituire la soluzione di lavoro messa nella vaschetta per colorazioni quando la soluzione diventa troppo chiara (da 1 a più settimane a seconda del numero di vetrini colorati).
3. Etanolo al 70%, al 95% e al 100%.

   Sostituire l'alcool messo nelle vaschette per colorazioni ogni 3 settimane o prima se si sono colorati circa 30 vetrini.
5. Xilene

   Sostituire lo xilene messo nelle vaschette per colorazioni ogni mese.

Tutte le vaschette per colorazione contenenti i reagenti in uso devono essere conservate sotto una cappa chimica e munite di coperchio; quando non in uso sigillare con Parafilm® le vaschette contenenti etanolo, in particolare l'etanolo al 100%, per evitare l'evaporazione.

Esecuzione della colorazione

Per l'allestimento dei vetrini vedi "Preparazione di Strisci Fecali" a pag.103.

1. Immergere i vetrini in etanolo al 70% per 5 minuti per rimuovere il fissativo di Schaudinn. Questo passaggio può essere evitato per gli strisci da PVA o Zn-PVA. Scolare l'eccesso di liquido appoggiando per 1-2 secondi il bordo di ciascun vetrino su un foglio di carta bibula.
2. Immergere i vetrini nella soluzione iodio-alcoolica per 1 minuto per gli strisci da feci fresche fissate con Schaudinn e 5-10 minuti per gli strisci da PVA o Zn-PVA. Scolare l'eccesso di liquido.
   Per gli strisci da SAF iniziare dal punto 3.
3. Immergere i vetrini in etanolo al 70% per 5 minuti. Scolare l'eccesso di liquido.
   Il passaggio nell'etanolo al 70% rimuove lo iodio.
4. Lavare per 10 minuti ponendo la vaschetta sotto acqua corrente con flusso costante non troppo forte.
5. Immergere nella soluzione di lavoro di Ematossilina ferrica per 4-5 minuti.
6. Lavare per 10 minuti ponendo la vaschetta sotto acqua corrente con flusso costante non troppo forte(*).
7. Immergere i vetrini in etanolo al 70% per 5 minuti. Scolare l'eccesso di liquido(*).
8. Immergere i vetrini in etanolo al 95% per 5 minuti. Scolare l'eccesso di liquido.
9. Immergere i vetrini in etanolo al 100% per 5 minuti. Scolare l'eccesso di liquido.
10. Immergere i vetrini in una seconda vaschetta contenente etanolo al 100% per 5 minuti. Scolare l'eccesso di liquido. I passaggi in etanolo disidratano i preparati.
11. Immergere i vetrini nello xilene per 5 minuti. Scolare l'eccesso di liquido.
12. Immergere i vetrini in una seconda vaschetta contenente xilene per 5 minuti. Scolare l'eccesso di liquido. I passaggi nello xilene completano la disidratazione.
13. Senza far asciugare porre 2-3 gocce di liquido di montaggio per ciascun vetrino e coprire con un coprioggetto.
14. Lasciare asciugare gli strisci montati per una notte a temperatura ambiente o per un'ora a 37° C.

Nota: se non si vuole montare permanentemente i preparati lasciare asciugare per almeno 15 minuti prima di leggere al microscopio.

(*) Sebbene la metodica originale non lo preveda, tra il lavaggio al punto 6 e il bagno in etanolo al punto 7 è possibile inserire un passaggio in acido picrico per differenziare maggiormente lo sfondo dai microrganismi.

Immergere i vetrini nella soluzione di acido picrico per 5 minuti.

- Lavare per 10 minuti ponendo la vaschetta sotto acqua corrente con flusso costante non troppo forte.
- Proseguire come indicato al punto 7.

Soluzione di acido picrico

– Acido picrico in soluzione satura	100 ml
– Acqua distillata	100 ml

Aggiungere, goccia a goccia, l'acido picrico all'acqua

Lettura ed interpretazione

1. Leggere al microscopio cominciando ad osservare il vetrino a piccolo ingrandimento per cercare un'area né troppo spessa né troppo sottile. Se il preparato appare troppo spesso cercare un'area un po' più sottile, viceversa se il preparato è troppo sottile cercare un'area un po'più spessa.
2. Mettere una goccia di olio da immersione sul punto prescelto e passare a 1.000 ingrandimenti. Non usare obiettivi a secco. Esaminare almeno 200-300 campi in immersione.

Il colore di fondo dei preparati assume colore blu-grigio scuro. Il citoplasma dei trofozoiti e delle cisti si colora in grigio-blu. I nuclei, le inclusioni come emazie e batteri e i corpi cromatoidi hanno un colore grigio-blu più scuro di quello del citoplasma.

15.24 COLORAZIONE DI SARGEAUNT (PER I CORPI CROMATOIDI DI AMEBA)

N.B. Questa colorazione può essere effettuata solo su sedimento fecale ottenuto per concentrazione con Formolo-Etil Acetato. Non possono essere utilizzate feci non concentrate.

Reagenti

- Verde malachite 0,2 g
- Alcool etilico al 95% 3 ml
- Acido acetico (CH3COOH) 3 ml
- Acqua distillata 94 ml

Sciogliere il verde malachite nell'alcool, aggiungere l'acido acetico, aggiungere l'acqua distillata. Conservare a temperatura ambiente al riparo dalla luce. Il reagente è stabile per diversi mesi.

Esecuzione

1. Porre una goccia di sedimento fecale su un vetrino portaoggetto.
2. Aggiungere una goccia di colorante di Sargeaunt, miscelare le due gocce e coprire con un coprioggetto.

Lettura

Esaminare a 400x.

Le cisti di ameba appariranno come sotto riportato.

- Citoplasma delle cisti Verde pallido.
- Nuclei delle cisti Verde pallido (ben distinti dal citoplasma).
- Corpi cromatoidi Verde scuro.

Interpretazione

- Corpi cromatoidi di *E. histolytica/dispar* e *E. hartmanni*: estremità arrotondate (a forma di sigaro).
- Corpi cromatoidi di *E. coli*: estremità sfrangiate e appuntite, a volte riuniti in fascio.

15.25 COLORAZIONI PER MICROSPORIDI

Sebbene per la ricerca di Microsporidi sia possibile utilizzare campioni non concentrati, il campione migliore è il sedimento dopo concentrazione da feci fresche, o conservate in Formalina 10%, SAF, e diversi Fissativi "Ecologici" *One-Vial* (verificare le istruzioni del produttore).

15.25.1. COLORAZIONE TRICROMICA MODIFICATA DI WEBER O DI RYAN

1. Preparare su un vetrino portaoggetto uno striscio molto sottile (lo striscio deve essere sottile a causa della difficoltà della penetrazione del colorante nella parete delle spore).
2. Fissare lo striscio con metanolo per 5-10 minuti.
3. Colorare, per immersione, con il colorante Tricromico modificato(*) per 90 minuti.
4. Sciacquare delicatamente con acqua di fonte per eliminare l'eccesso di colorante.
5. Decolorare con soluzione alcool-acida(§) per 2-3 secondi, al massimo10 secondi.
6. Sciacquare immergendo brevemente il vetrino in etanolo al 95%.
7. Immergere il vetrino in una seconda vaschetta contenente etanolo al 95% per 5 minuti.
8. Immergere i vetrini in alcool assoluto per 10 minuti.
9. Immergere i vetrini in una seconda vaschetta con alcool assoluto per 10 minuti(¥).
10. Immergere il vetrino in una vaschetta contenente xilene (o Hemo-De®) per 10 minuti.
11. Immergere il vetrino in una seconda vaschetta con xilene (o Hemo-De®) per altri 10 minuti (¥).
12. Scolare l'eccesso di xilene, adagiare il vetrino su carta bibula, porre 2-3 gocce di liquido di montaggio e coprire con un vetrino coprioggetto.
13. Far asciugare il liquido di montaggio e leggere il preparato a 1.000 ingrandimenti in immersione; esaminare almeno 300 campi.

(*) Chromotrope 2R 6 grammi, Fast Green 0,15 grammi (modifica di Weber) o Blu di Anilina 0,5 grammi (modifica di Ryan), Acido Fosfotungstico 0,25 grammi, Acido Acetico Glaciale 3 mL.
Far riposare la miscela per 30 minuti, quindi aggiungere 100 mL di acqua distillata.
Il colorante dovrà essere di colore blu scuro. Conservare in una bottiglia scura fino a 24 mesi. Etichettare con la data di preparazione.

(§) Composizione: Etanolo al 90% 995,5 mL + Acido acetico Glaciale 4,5 mL.

(¥) La metodica presentata è quella consigliata da CLSI. Nelle metodiche originali di Weber e di Ryan è previto un solo passaggio in alcool assoluto e in xilene (o Hemo-De®).

15.25.2. COLORAZIONE CALCOFLUOR-WHITE

Il colorante Calcofluor si lega alla chitina contenuta nella parete spore dei microsporidi ed emette una fluorescenza azzurro-bianca brillante.
Anche i lieviti hanno un anello fluorescente azzurro ma, a differenza dei microsporidi, spesso si colorano in arancione nel citoplasma.
Le spore fungine possono contenere chitina; è pertanto necessaria una certa esperienza per differenziare le spore dei microsporidi da quelle dei funghi.

Vetrino per citocentrifuga

1. Preparare su un vetrino portaoggetto tipo vetrino per citocentrifuga uno striscio molto sottile e farlo asciugare all'aria.
2. Fissare lo striscio con metanolo per 5 minuti.
3. Colorare aggiungendo allo striscio 1-3 gocce di soluzione Calcofluor-White 0,5% per 2-3 minuti.
4. Sciacquare delicatamente con acqua di fonte.
5. Contrastare con soluzione di Blu di Evans 0,1% per 1 minuto.
6. Sciacquare delicatamente con acqua di fonte e far asciugare completamente.
7. Aggiungere 1-2 gocce di liquido di montaggio e coprire con un vetrino copri oggetto.
8. Far asciugare il liquido di montaggio e leggere il preparato a 1.000x in immersione.

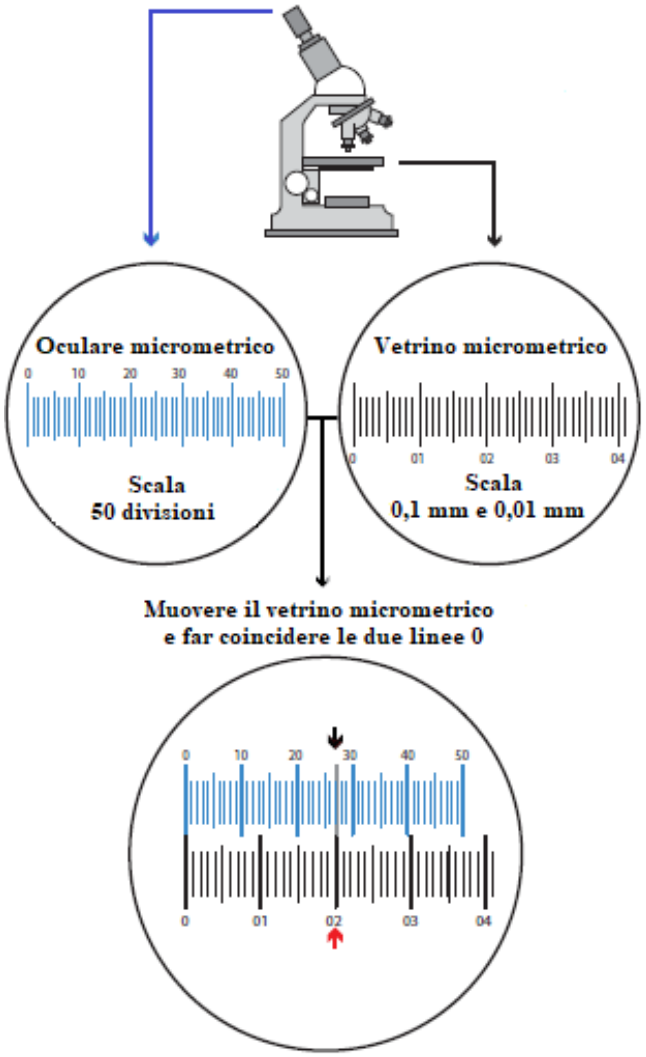
Il Calcoflur-White e il Blu di Evans pronti per l'uso sono reperibili in commercio.

Nota: questa colorazione può essere anche usata per evidenziare le cisti di *Acanthamoeba* spp. e di *Pneumocystis jiroveci* da campioni clinici.

15.26 OCULARE MICROMETRICO

L'impiego di un oculare micrometrico è indispensabile per la diagnostica parassitologica. Prima di usarlo è necessario calibrarlo.
Sono necessari un oculare che sulla lente ha incisa una serie di linee uniformemente spaziate (usualmente con 10 o 50 suddivisioni) e un vetrino con incisa una linea, lunga 1 o 2 mm, suddivisa in segmenti da 0,01 mm.

1. Togliere uno dei due oculari del microscopio e sostituirlo con l'oculare micrometrico.
2. Porre il vetrino micrometrico sul piano traslatore del microscopio.
3. Utilizzando l'obiettivo a piccolo ingrandimento (10x) mettere a fuoco la scala micrometrica incisa sul vetrino.
4. Agendo sul piano traslatore far coincidere la linea 0 del vetrino micrometrico con la linea 0 dell'oculare micrometrico.
5. Senza spostare il vetrino micrometro del tavolino, individuare un altro punto, a destra delle linee 0, dove altre due linee sono esattamente sovrapposte.
   Per aumentare la precisione questa seconda serie di linee sovrapposte dovrebbe essere il più lontano possibile dalle linee 0.
6. Contare il numero di linee di divisione sull'oculare micrometrico tra la linea 0 e il punto in cui è sovrapposta la seconda serie di linee. Nell'esempio in figura questo numero corrisponde a 27 divisioni dell'oculare (freccia nera).
7. Quindi contare il numero di linee di divisione di 0,1 mm che vi sono tra la linea 0 e la seconda linea sovrapposta sul vetrino micrometrico. Nell'esempio in figura, questo numero corrisponde a 0,2 mm (freccia rossa).



Da: Bench aids for the diagnosis of intestinal parasites. WHO 2019

8. Per calcolare la lunghezza rappresentata da una unità oculare (ovvero una linea di divisione dell'oculare micrometrico): 1 unità oculare = (0,2 mm / 27) x 1.000 = 7,4 µm.
   Quindi per questo specifico obiettivo a 10x, 1 unità oculare è pari a 7,4 µm.
9. Ripete la calibrazione per ciascun obiettivo del microscopio.
10. Registrare su una tabellina i valori di 1 unità oculare per ciascun obiettivo.

16 APPENDICE ETIMOLOGICA

In questa appendice vengono proposti l'origine e il significato dei termini che descrivono i materiali biologici analizzati e alcuni parassiti delineati nel testo, senza peraltro volere essere esaustivi, bensì offrire al lettore, al professionista, allo studioso indicazioni utili ed esplicative in un contesto non soltanto strettamente diagnostico.

In alcuni casi il significato dei termini utilizzati e dei nomi scientifici è intuitivo, ma in altri meno.

Se una parola deriva dal greco antico e anche in latino esiste il corrispondente termine (ad esempio: "νάνος " = "nanus" = nano), si è indicato solo il termine greco.

Per i sostantivi sono riportati il nominativo e la desinenza del genitivo (es. "lumbricus -i", "εἶδος -ους"); solo in alcuni casi il genitivo è riportato per esteso (es. "faex, faecis", "θρίξ, τριχός").
Per i verbi sono riportate la prima persona dell'indicativo presente e la desinenza dell'infinito (es. "sagino -are", "λύω -ειν").
Per gli aggettivi sono riportate le uscite del maschile, del femminile e del neutro (es. "latus -a, -um", "μόνος -η, -ον").
Gli avverbi e le proposizioni (es. "ἔνδω", "παρά") sono indeclinabili.

Nella traduzione dal greco antico e dal latino sono stati riportati i termini attinenti all'argomento trattato. In altri contesti gli stessi vocaboli, in particolare gli avverbi, possono assumere un diverso significato.

Le parole greche sono anche translitterate. Si è seguito un criterio molto semplificato che non tiene conto degli spiriti (aspro: ̔, dolce: ̓) né dei diversi tipi di accenti (acuto: ́, grave: ̀, circonflesso: ͂); nella traslitterazione l'accento è sempre grave. Non si è tenuto conto neanche della lunghezza delle vocali: quindi: ε/η = e; o/ω = o. Nella tabella 11 a pag. 118 è riportato l'alfabeto greco e la relativa translitterazione.

ESAME COPRO-PARASSITOLOGICO

Copro. Dal greco "κόπρος -ου [kòpros -ou]" = escrementi, sterco.

Parassitologico. Dal greco "παράσιτος -ου [paràsitos -ou]" = che mangia presso un altro, parassita + "λογικός -ή, -όν [logikòs è, òn]" derivato da "λόγος -ου [lògos -ou]" = dottrina, argomento (studio).

MATERIALI BIOLOGICI

Feci. Dal latino "faex, faecis" = feccia, sedimento, deposito, residuo, impurità.

In epoca posteriore il termine ha poi assunto anche il significato di prodotti della digestione espulsi dall'intestino.

È interessante notare che termini che si riferiscono alle feci, oggi ritenuti volgari o infantili, abbiano comunque un'origine che tale non era e che in alcuni casi vengono utilizzati anche nella terminologia scientifica.

- Merda. Dal latino merda -ae = escremento, sterco. Nella tassonomia batterica è presente *Parabacteroides merdae*.
- Cacca. Dal greco "κάκκη -ης [kàkke -es]" = cacca, sterco. Nella tassonomia batterica è presente *Bacteroides caccae*.
- Stronzo. Inteso come escremento solido cilindrico, deriva dal longobardo "strunz" = sterco.

Liquido duodenale

Duodeno. Dal latino "duodeni" aggettivo distributivo di "duodecim" = dodici: riferimento alla lunghezza che è di circa 12 dita trasverse.

Sigmoidoscopia

Sigma. Dal greco "σίγμα [sìgma]" = esse (s). Dalla conformazione della parte dell'intestino che segue il colon.

PROTOZOI

Amebe

Endolimax. Presumibilmente dall'avverbio greco "ἔνδω [èndo]" = dentro + "λῦμα -ατος [lỳma -tos]" = acqua sporca, sozzura, sudiciume.

- *E. nana*. Dal greco "νάνος -ου [nànos -ou]" = nano: riferimento alle piccole dimensioni.

Entamoeba. Dall'avverbio greco "ἔντος [èntos]" = entro, all'interno + "ἀμοιβή -ῆς [amoibè -ès]" = cambio, mutamento, trasformazione: che cambia forma all'interno.

- *E. histolytica*. Dal gerco "ἱστός -οῦ [istòs -où]" = tessuto + "λύω -ειν [lỳo -ein]" = sciolgo: che scioglie (lisa) i tessuti.
- *E. dispar*. Dal latino "dispar -aris" = differente, diverso: che è diversa da *E. histolytica*.
- *E. moshkovskii*. Di Moshkovski: in onore del medico e parassitologo sovietico Shabsai Davidovich Moshkovski (1895 – 1982).
- *E. bangladeshi*. Del Bangladesh: luogo della prima identificazione.
- *E. coli*. Del colon, dal greco "κόλον -ου [kòlon -ou]" = budello, colon.
- *E. hartamanni*. Di Hartmann: in onore del biologo tedesco Max Hartmann (1876 – 1962).
- *E. polecki*. Di Polek: attribuzione incerta, presumibilmente in onore del medico polacco Erwin Poleck (1871 – data ignota).

Iodamoeba. Nel 1812 il chimico francese Joseph Louis Gay-Lussac coniò la parola iode (iodio) dal greco ἰοειδής -ές [ioeidès -ès] = violaceo + "ἀμοιβή -ῆς [amoibè -ès]" = cambio, mutamento, trasformazione: ameba che cattura lo iodio, riferimento al cospicuo vacuolo iodofili delle cisti.

- *I. bütschlii*. Di Bütschli: in onore del biologo tedesco Otto Bütschli (1848 – 1920).

Ciliati

Balantidium. Dal greco "βαλαντίδιον -ου [balantìdion -ou]" = piccola borsa, a forma di borsa: riferimento alla morfologia.

- *B. coli*. Del colon, dal greco "κόλον -ου [kòlon -ou]" = colon, budello.

Flagellati

Chilomastix. Dal greco "χεῖλος -εος [chèilos -eos]" = labbro + "μάστιξ -ιγος [màstix -igos]" = flagello: riferimento al flagello posizionato nel citostoma.

- *C. mesnili*. Di Mesnil: in onore dello zoologo francese Félix Mesnil (1868 – 1938).

Dientamoeba. Dall'avverbio greco "δίς [dìs]" = due volte, doppio + "ἀμοιβή -ῆς [amoibè -ès]" = cambio, mutamento, trasformazione: riferimento alla forma ameboide del trofozoita e alla presenza di due nuclei.

- *D. fragilis*. Dal latino "fragilis -is, -e" = fragile, caduco, debole.

Enteromonas. Dal greco "ἔντερον -ου [ènteron -ou]" = intestino + "μόνος -η, -ον [mònos -e, on]" = unico, solo: organismo unicellulare che vive nell'intestino.

- *E. hominis*. Dell'uomo, dal latino "homo -minis".

Giardia. Di Giard: in onore dello zoologo francese Alfred Mathieu Giard (1846 – 1908).

- *G. duodenalis*. Del duodeno, dal latino "duodeni" aggettivo distributivo di "duodecim" = dodici: riferimento alla lunghezza che è di circa 12 dita trasverse.
- *G. intestinalis* (sinonimo di *G. duodenalis*). Dell'intestino, dal latino "intestinum -i" = interno, interiore.
- *G. lamblia* (sinonimo di *G. duodenalis*). Di Lambl: in onore del medico ceco Vilém Dušan Lambl (1824 – 1895).

Pentatrichomonas. Dal latino "penta" = cinque + dal greco "θρίξ, τριχός [thrìx, trichòs] = pelo, capello + "μόνος -η –ον [mònos -e, -on]" = unico, solo: organismo unicellulare con 5 flagelli.

- *P. hominis*. Dell'uomo, dal latino "homo -minis".

Retortamonas. Dal latino "retorqueo -ere" = ritorcere, piegare all'indietro + dal greco "μόνος -η -ον" [mònos -e, -on] = unico, solo: riferimento alla particolare modalità di locomozione per cui spesso l'organismo unicellulare appare contorto.

- *R. intestinalis*. Dell'intestino, dal latino "intestinum -i" = interno, interiore.

Coccidi

Coccidio. Dal greco "κόκκος -ου [kokkos -ou]" = granello, chicco + "εἶδος -ους [èidos -ous]" = aspetto, forma, figura: riferimento alla forma di questi protozoi.

Cryptosporidium. Dal greco κρυπτός -ή, -όν [kryptòs -è, òn]" = nascosto + "σπορά -ᾶς [sporà -às]" = seme: riferimento alla difficoltà nell'evidenziare questo protozoo.

- *C. felis*. Del gatto, dal latino "feles, felis": riferimento all'ospite principale.
- *C. hominis*. Dell'uomo, dal latino "homo -minis": riferimento all'essere riconosciuto come specie specifico dell'uomo.
- *C. meleagridis*. Del tacchino, dal greco "μελεαγρίς -ίδος [meleagrìs -ìdis]": riferimento all'animale nel quale è stato descritto per la prima volta. Le Meleagridi sono personaggi della mitologia greca trasformate da Artemide in galline faraone.
- *C. parvum*. Dal latino "parvus -a, -um" = piccolo: riferimento alle dimensioni del protozoo.

Cyclospora. Dal gerco: “κύκλος -ου [kỳklos -ou]” = cerchio, anello + “σπορά -ᾶς [sporà -às]” = seme: riferimento alla forma arrotondata.

- *C. cayetanensis*. Di Cayetano: riferimento all’Università “Cayetano Heredia” di Lima (Perù) ove fu effettuata la prima completa descrizione del protozoo.

Cystoisospora. Dal greco + “κύστις -εως [kỳstis -eos]” = vescica, cisti + “ἴσος -η, -ον [ìsos -e, -on]” = uguale + “σπορά -ᾶς [sporà -às]” = seme: riferimento ai due sporoblasti contenuti in ciascuna sporocisti.

- *C. belli*. Di Bell: presumibilmente in onore del medico e zoologo inglese Thomas Bell (1792 – 1880).

Sarcocystis spp. Dal greco “σάρξ, σαρκός [sàrx, sarkòs]” = carne + “κύστις -εως [kỳstis -eos]” = vescica, cisti: riferimento alla localizzazione muscolare.

Microsporidi

Microsporidi. Dal greco “μικρός -ά, -όν [mikròs -à, -òn]” = piccolo + “σπορά -ᾶς [sporà -às]” = seme: riferimento alle piccole dimensioni.

- *Encephalitozoon* spp. Dal greco “εγκέφαλος -ου [enkèphalos -ou]” = che si trova nel cranio (encefalo) + “ζώον -ου [zòon -ou]” = essere vivente: riferimento alla capacità di invadere l’encealo da parte di alcune specie.
- E*nterocytozoon* spp. Dal greco “ἔντερον -ου [ènteron -ou]” = intestino + “κύτος -εος [kỳtos -ou]” = cavità (cellula) + “ζώον-ου [zòon -ou]” = essere vivente: riferimento alla prevalente localizzazione intestinale.

Stramenopili

Stramenopili. Dal latino “stramen -minis" = paglia, strame + “pilus -i" = pelo: riferimento al flagello con piccoli peli tubulari posseduto da molti membri di questo gruppo di protozoi.

Blastocystis spp. Dal greco “βλαστός -οῦ” [blastòs -où] = germe, germoglio + “κύστις -εως [kỳstis -eos]” = vescica, cisti.

ELMINTI

Acantocefali

Acanthocephalus spp. Dal greco “ἄκανθα -ης [àkantha -es]” = spina, aculeo + “κεφαλή -ῆς [kephalè -ès]” = testa, capo: riferimento alla presenza di spine nella parte cefalica.

Macracanthorynchus spp. Dal greco “μακρός -ά -όν [makròs -à -òn]” = grande, lungo + “ἄκανθα -ης [àkantha -es]” = spina, aculeo + “ῥύγχος -εος [rỳnchos -eos]” = muso becco (proboscide): riferimento alla conformazione della parte cefalica.

Moniliformis spp. Dal latino “monile -is” = monile, collana + suffisso “-formis” (derivato da “forma -ae”) = a forma di: riferimento alle strie trasversali del corpo che conferiscono al verme un aspetto segmentato simile a una collana.

Pseudoacanthocephalus spp. Dal greco “ψευδής -ές [pseydès -ès]” = non vero, falso + “ἄκανθα -ης [àkantha -es]” = spina, aculeo = spina, aculeo + “κεφαλή -ῆς [kephalè -ès]” = testa, capo: che non è un vero *Acanthocephalus*.

Cestodi

Cestode. Dal greco "κεστός -ή, -όν [kestòs -è -òn]" = cucito, ricamato + "εἶδος -ους [èidos -ous]" = aspetto, forma, figura: riferimento alla morfologia, le proglottidi sembrano tra loro cucite a formare un nastro.

Adenocephalus. Dal greco "ἀδήν -δένος [adèn -dènos]" = ghiandola + "κεφαλή -ῆς [kephalè -ès]" = testa, capo: riferimento alla presenza nello scolice di numerose ghiandole unicellulari.

- *A. pacificus*. Del Pacifico: riferimento alla diffusione lungo le coste Sud Americane dell'oceano Pacifico.

Bertiella spp. Di Bert: in onore del fisiologo francese Paul Bert (1833 – 1886).

Dibothriocephalus. Dal greco "δίς [dìs]" = due volte, doppio + "βοθρίον -ου [bothrìon -ou]" = fossetta + "κεφαλή -ῆς [kephalè -ès]" = testa, capo: riferimento all'aspetto dello scolice.

- *D. dendriticus*. Dal greco "δενδρίτης -ου [dendrìtes -ou]" = di albero, arboreo (ramificato): riferimento alle diramazioni dell'utero (peraltro presenti in tutte le tenie).
- *D. latus*. Dal latino "latus -a, -um" = largo, esteso: riferimento alle dimensioni.
- *D. nihonkaiensis*. Del Nihonkai (Mar del Giappone): riferimento alla zona di primo reperimento della specie.

Diphyllobothrium. Dal greco "δίς [dìs]" = due volte, doppio + "φύλλον -ου [phỳllon -ou]" = foglia + "βοθρίον -ου [bothrìon -ou]" = fossetta: riferimento all'aspetto dello scolice.

- *D. balaenopterae*. Della balenottera: riferimento al tipo di cetacei nel quale può essere ospite.
- *D. stemmacephalum*. Dal greco "στέμμα -τος [stèmma -tos]" = corona, ghirlanda + "κεφαλή -ῆς [kephalè -ès]" = testa, capo: presumibile riferimento alla forma dello scolice.

Hymenolepis. Dal greco "υμήν -ένος [ymèn -ènos]" = membrana + "λεπίς -ίδος [lepìs -ìdos]" = squama: le sue proglottidi le conferiscono l'aspetto di una membrana squamosa.

- *H. nana*. Dal gerco "νάνος -ου [nànos -ou]" = nano: riferimento alle piccole dimensioni.
- *H. diminuta*. Etimologia incerta: forse dal verbo latino "diminuo" = fare a pezzi, fracassare: i "pezzi" probabilmente alludono alle proglottidi.

Mesocestoides spp. Dal greco "μέσος -η [mèsos -e]" = al centro, nel mezzo + "κεστός -ή, -όν [kestòs -è -òn]" = cucito, ricamato + "εἶδος -ους [èidos -ous]" = aspetto, forma, figura: riferimento alla posizione mediana dei doppi pori genitali del cestode.

Taenia. Dal greco "ταινία -ας [tainìa -as]" = benda, nastro: riferimento alla morfologia.

- *T. asiatica*. Dell'Asia: zona di diffusione di questa specie.
- *T. saginata*. Dal latino "sagino -are" = ingrassare, nutrire abbondantemente: riferimento al fatto che si "ingrassa" a spese dell'ospite.
- *T. solium*. Etimologia incerta: forse dall'arabo "sols" = catena" o dal latino "solus -a, -um" = solo (solitario).

Nematodi

Nematode. Dal greco "νῆμα -ατος [nèma -atos]" = filo + "εἶδος -ους [èidos -ous]" = aspetto, forma, figura: riferimento alla morfologia.

Anatrichosoma spp. Dal greco "ἀνά [anà]" = in alto, sopra + "θρίξ, τριχός [thrix, trichòs] = pelo, capello + "σῶμα -ατος [sòma -atos]" = corpo: riferimento all'aspetto filiforme della parte anteriore del corpo del nematode.

Ancylostoma. Dal greco "ἀγκύλος -η, -ον" [ankỳlos -e, -on] = curvo, adunco + "στόμα -ατος [stòma -atos]" = bocca: riferimento ai "denti" ad uncino (Hookworm degli autori anglosassoni).

- *A. duodenale*. Del duodeno, dal latino "duodeni" aggettivo distributivo di "duodecim" = dodici: riferimento alla lunghezza che è di circa 12 dita trasverse.

Ascaris. Dal greco "ἀσκαρίζω -ειν [askarìzo -ein]" = salto, oscillo. Il termine "ἀσκαρίς [askarìs]" era già utilizzato da Ippocrate (460 – 370 a.C.), però probabilmente in riferimento agli ossiuri.

- *A. lumbricoides*. Dal latino "lumbricus -i" = lombrico + dal greco "εἶδος -ους [èidos -ous]" = aspetto, forma, figura: che ha l'aspetto di un lombrico.

Enterobius. Dal greco "ἔντερον -ου [ènteron -ou]" = intestino + "βίος -ου [bìos -ou]" = vita: che vive nell'intestino.

- *E. vermicularis*. Dal latino "vermiculus -i" = piccolo verme.

Capillaria. Dal latino "capillus -i" = capello: riferimento all'aspetto filiforme del verme (simile a quello di *Trichuris*).

- *C. hepatica. Dal* greco "ἦπαρ -ατος [èpar -atos]" = fegato: riferimento alla localizzazione del verme adulto.

Necator. Dal latino "necator, oris" = uccisore: per il sua patogenicità e virulenza.

- *N. americanus*. Americano: identificato nel 1902 negli Stati Uniti, ma di origine africana e importato nelle americhe con la tratta degli schiavi.
- *Oesophagostomum* spp. Dal greco "οἰσοφάγος -ου [oisophàgos -ou]" = esofago + "στόμα -ατος [stòma -atos]" = bocca: riferimento all'apertura posteriore dell'esofago, che comunica con il tratto intestinale tramite una valvola tricuspide.

Paracapillaria. Dalla preposizione greca "παρά [parà]" = presso, vicino + dal latino "capillus -i" = capello: che è simile a *Capillaria*.

- *P. philippinensis*. Delle Filippine: luogo della prima identificazione.

Strongyloides. Dal greco "στρογγύλος -η, -ον [strongỳlos -e, -on]" = arrotondato, rotondo + "εἶδος -ους [èidos -ous]" = aspetto: riferimento all'aspetto di questi nematodi.

- *S stercoralis*. Delle feci, dal latino "stercus, oris" = escrementi umani o animali, letame, concime: riferimento all'habitat del parassita.
- *S. fülleborni*. Di Fülleborn: in onore del medico tedesco Friedrich Fülleborn (1866 – 1933).

Trichostrongylus spp. Dal greco "θρίξ, τριχός [thrìx, trichòs]" = pelo, capello + "στρογγύλος -η, -ον [strongỳlos -e, -on]" = arrotondato, rotondo: riferimento alla forma affilata della parte caudale del verme.

Trichuris trichiura. Dal greco "θρίξ, τριχός [thrìx, trichòs]" = pelo, capello + "οὐρά -ᾶς [ourà -às]" = coda. In realtà è la parte cefalica ad essere filiforme come ben indica l'altro nome con cui è conosciuto: Tricocefalo.

- Tricocefalo. Dal greco "θρίξ, τριχός [thrìx, trichòs]" = pelo, capello + "κεφαλή -ῆς [kephalè -ès]" = testa, capo.

Trematodi

Trematode. Dal greco "τρῆμα -ατος [trèma -atos]" = foro, orifizio + "εἶδος -ους [èidos -ou]" = aspetto, forma, figura: riferimento alle ventose, in particolare la ventrale, che possono apparire come dei fori.

Clonorchis. Dal greco "κλών -ωνός [klòn -onòs]" = ramo (ramificato) + "ὄρχις -ιος [òrchis -ios]" = testicolo: che ha i testicoli ramificati.

- *C. sinesis*. Della Cina: luogo della prima identificazione.

Dicrocoelium. Dal greco "δίκροος -α, -ον [dìkroos -a, -on]" = bifido, biforcuto + "κοιλίαν -ας [koilìan -as]" = cavità del ventre (intestino): riferimento all'apparato digerente del verme che presenta due intestini ciechi.

- *D. dendriticum*. Dal gerco "δενδρίτης -ου [dendrìtes -ou]" = di albero, arboreo (ramificato): riferimento alle ramificazioni dell'utero.

Echinostoma spp. Dal grevo "ἐχῖνος -ου" [echìnos -ou] = riccio, porcospino + "στόμα -ατος [stòma -atos]" = bocca: riferimento alle spine che circondano la ventosa orale.

Fasciola. Dal latino "fasciola, ae" = piccola fascia.

- *F. hepatica*. Dal greco "ἧπαρ -ατος [èpar -atos]" = fegato: riferimento alla localizzazione nelle vie biliari del verme adulto.

Fasciolopsis. Dal latino "fasciola, ae" = piccola fascia + dal greco "ὄψις -εως [òpsis -eos]" = aspetto, sembianza: che assomiglia a *Fasciola*.

- *F. buski*. Di Busk: in onore del chirurgo e zoologo inglese George Busk (1807 – 1886).

Gastrodiscoides. Dal greco "γαστήρ -στρός [gastèr -stròs]" = ventre, stomaco + "δίσκος -ου" [dìskos-ou] = disco + "εἶδος -ους [èidos -ou]" = aspetto, forma, figura: riferimento alla forma discoide della parte posteriore del corpo.

G. hominis. Dell'uomo, dal latino "homo -minis".

Heterophyes heterophyes. Dal greco "ἕτερος -α, -ον [èteros -a, on]" = altro, differente + "φύη -ῆς [phỳe -ès]" = figura (forma): ha il significato "di forma differente da", così denominato per distinguerlo da *Paragonimus*.

Metagonimus. Dalla preposizione greca "μετά [metà]" = dopo + "γόνιμος -η, -ον [gònimos -e, -ov]" = generativo, atto a generare: che ha l'apparato riproduttivo nella parte posteriore.

- *M. yokogawai*. Di Yokogawa: in onore del medico giapponese Sadamu Yokogawa (1883-1956).

Opisthorchis spp. Dal greco "οπίσθιος -α -ον [opìsthios -a, -on]" = di dietro, posteriore + "ὄρχις -ιος [òrchis -ios]" = testicolo: che ha i testicoli nella parte posteriore.

- *O. felineus*. Dal latino "felineus -a, -um" = felino, del gatto: principale ospite definitivo e serbatoio.
- *O. viverrini*. Dal latino "viverra -ae" = furetto. La Viverra è un carnivoro della famiglia dei Viverridi (civette indiane): i viverridi sono i pricipali ospiti definitivi e serbatoi.

Paragonimus. Dalla preposizione greca "παρά [parà]" = presso, vicino + "γόνιμος -η, -ον [gònimos -e, -ov]" = generativo, atto a generare (genitali): riferimento alla morfologia, l'ovaio e i testicoli sono tra di loro vicini.

- *P. westermani*. Di Westerman: in onore del guardiano dello zoo di Amsterdam Pieter Westerman (1859-1925).

Schistosoma. Dal greco σχιστός -ή [schistòs -è] = diviso, fessurato + "σῶμα -ατος [sòma -atos]" = corpo: riferimento al canale ginecoforo del verme maschio.

- *S. mansoni*. Di Manson: in onore del medico parassitologo scozzese Patrick Manson (1844 1922).
- *S. haematobium*. Dal greco "αἷμα -ατος" [àima -atos] = sangue e "βίος -ου [bìos -ou]" = vita: che vive nel sangue.
- *S. intercalatum*. Dal verbo latino "intercalo -are" = intercalare: il nome deriva dall'osservazione che le uova hanno dimensioni intermedie tra quelle di *S. haematobium* e quelle più grandi di *S. bovis* (schistosoma del bestiame con spina terminale).
- *S. japonicum*. Del Giappone: luogo della prima identificazione.
- *S. mekongi*. Del Mekong: è endemico lungo il corso di questo fiume e di alcuni suoi tributari.

Tabella 11. Alfabeto Greco

Maiuscola	Minuscola	Nome	Translitterazione	Esempio
Α	**α**	alpha	a	**ἀ**γκύλος = curvo
Β	**β**	beta	b	**β**ίος = vita
Γ	**γ**	gamma	g/n	**γ**όνιμος = generativo
Δ	**δ**	delta	d	**δ**ενδρίτης = arboreo
Ε	**ε**	epsilon	e	**ε**ἶδος = aspetto
Ζ	**ζ**	zeta	z	**ζ**ώον = essere vivente
Η	**η**	eta	e	**ἦ**παρ = fegato
Θ	**θ – ϑ**	theta	th	**θ(ϑ)**άνατος = morte
Ι	**ι**	iota	i	**ι**ξώδ**ε**ς = viscoso, tenace
Κ	**κ**	kappa	k	**κ**εφαλή = testa
Λ	**λ**	lambda	l	**λ**επίς = squama
Μ	**μ**	mi	m	**μ**ετά = dopo
Ν	**ν**	ni	n	**ν**άνος = nano
Ξ	**ξ**	xi	x	**ξ**ένος = straniero
Ο	**ο**	omikron	o	**ὄ**ρχις = testicolo
Π	**π**	pi	p	**π**αρά = presso, vicino
Ρ	**ρ**	rho	r	**ῥ**άβδος = bastone
Σ	**σ – ς**	sigma	s	**σ**τρογγύλο**ς** = arrotondato
Τ	**τ**	tau	t	**τ**αινία = benda
Υ	**υ**	hypsilon	y/u	**υ**μήν = membrana
Φ	**φ**	phi	ph	**φ**ύλλον = foglia
Χ	**χ**	chi	ch	**χ**ώρα = regione
Ψ	**ψ**	psi	ps	**ψ**ευδής = falso
Ω	**ω**	omega	o	**ὠ**κύς = veloce

In greco antico, ma non solo, la lettera θ (theta minuscola) può avere la forma grafica: ϑ.
La lettera σ (sigma minuscola) quando al termine di una parola ha la seguente forma grafica: ς.
La lettera **γ** (gamma minuscola) quando precede un'altra **γ** o una κ (kappa) o una ξ (xi) o una χ (chi) è translitterata e pronunciata come: n; esempio: ἄγγελος -ου [àngelos -ou] = messaggero.
La lettera υ (hypsilon minuscola) è translitterata con y tranne quando fa parte di dittonghi; in tal caso è trascritta con u; esempio: αυ, ευ, ου = au, eu, ou.
La lettera **γ** (gamma) è sempre dura come nelle parole italiane: gusto, ghiro.
La lettera **ζ** (zeta) è sempre dolce come nelle parole italiane: pranzo, razzo.

FONTI BIBLIOGRAFICHE

Le citazioni sono presentate in ordine cronologico di pubblicazione.

1. Ritchie LS, Pan C, Hunter GW. **A Comparison of the Zinc Sulfate and the Formalin-Ether (406th MGL) Technic**. Med Bull US. 1953: 1(7): 11-113.
2. Saud EH, Melvin DM. **The probability of detecting infections with *Enterobius vermicularis* by successive examinations**. J Pediatr. 1956: 48(4): 438-441.
3. Ridley DS, Hawgood BC. **The Value of Formol-Ether Concentration of Faecal Cysts and Ova**. J Clin Pathol. 1956: 9(1): 74–76.
4. Allen AV, Ridley DS. **Further observations on the formol-ether concentration technique for faecal parasites**. J Clin Pathol. 1970: 23(6): 545–546.
5. Young KH, Bullock SL, Melvin DM, Spruill CL. **Ethyl Acetate as a Substitute for Diethyl Ether in the Formalin-Ether Sedimentation Technique**. J Clin Microbiol. 1979: 10(6): 852–853.
6. Weber R, Bryan RT, Owen RL, Wilcox CM et al. **Improved light-microscopical detection of microsporidia spores in stool and duodenal aspirates**. N Engl J Med. 1992: 326(3):161-6.
7. Rondanelli EG, Scaglia M. **Atlante dei protozoi umani**. Masson, Milano, 1993.
8. Marti H, Koella JC. **Multiple Stool Examinations for Ova and Parasites and Rate of False-Negative Results**. J Clin Microbiol. 1993: 31(11): 3044–3045.
9. Hiatt RA, Markell EK, Ng E. **How many stool examinations are necessary to detect pathogenic intestinal protozoa?** Am J Trop Med Hyg. 1995: 53(1): 36-399.
10. Petithory JC, Ardoin-Guidon F, Chaumeil C. **Amibes et Flagellés Intestinaux, Amibes Oculaires - Leur Diagnostic Microscopique**. Cahier de Formation N° 11, Bioforma, Paris, 1998.
11. Pampiglione S, Canestri Trotti G. **Guida allo studio della Parassitologia-3^{a} Edizione**. Società Editrice Esculapio, Bologna, 1999.
12. Jensen B, Kepley W, Guarne J, Anderson K *et al*. **Comparison of Polyvinyl Alcohol Fixative with Three Less Hazardous Fixatives for Detection and Identification of Intestinal Parasites**. J Clin Microbiol. 2000: 38(4): 1592–1598.
13. Pietrzak-Johnston SM, Bishop H, Wahlquist S, Moura h *et al*. **Evaluation of Commercially Available Preservatives for Laboratory Detection of Helminths and Protozoa in Human Fecal Specimens**. J Clin Microbiol. 2000: 38(5): 1959–1964.
14. Bernieri F, Crotti D, Galli D, Raglio A. **Manuale Illustrato di Diagnostica Parassitologica**. Selecta Medica, Pavia, 2001.
15. van Gool T, Vetter H, Vervoort T, J. Doenhoff MJ *et al*. **Serodiagnosis of Imported Schistosomiasis by a Combination of a Commercial Indirect Hemagglutination Test with *Schistosoma mansoni* Adult Worm Antigens and an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with *S. mansoni* Egg Antigens.** J Clin Microbiol. 2002: 40(9): 3432–3437.

16. van Gool T, Weijts R, Lommerse E, Mank TG. **Triple Faeces Test an Effective Tool for Detection of Intestinal Parasites in Routine Clinical Practice**. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2003: 22(5): 284–290.

17. Brandonisio O, Bruschi F, Genchi C, Pozio E *et al*. **de Carneri-Parassitologia Medica e Diagnostica Parassitologica – tredicesima edizione**. Casa Editrice Ambrosiana, Milano, 2004.

18. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Procedures for the Recovery and Identification of Parasites from the Intestinal Tract: Approved Guideline - Second Edition**. CLSI, Waine, Pennsylvania, 2005.

19. Fotedar R, Stark D, Beebe N, Marriott D *et al*. **Laboratory Diagnostic Techniques for *Entamoeb*a Species**. Clin Microbiol Rev. 2007: 20(3): 511–532.

20. Stark D, Al-Qassab SE, Barratt JLN, Stanley K, Roberts T *et al*. **Evaluation of Multiplex Tandem Real-Time PCR for Detection of *Cryptosporidium* spp., *Dientamoeba fragilis*, *Entamoeba histolytica*, and *Giardia intestinalis* in Clinical Stool Samples**. J Clin Microbiol. 2011: 49(1): 257–262.

21. Tchuem Tchuenté LA, Kueté Fouodo CJ, Kamwa Ngassam RI, Sumo L *et al*. **Evaluation of Circulating Cathodic Antigen (CCA) Urine-Tests for Diagnosis of *Schistosoma mansoni* Infection in Cameroon**. PLoS Negl Trop Dis. 2012: 6(7): e1758.

22. Requena-Mendez A, Chiodini P, Bisoffi Z, Buonfrate *et al*. **The Laboratory Diagnosis and Follow Up of Strongyloidiasis: A Systematic Review**. PLoS Negl Trop Dis. 2013: 7(1): e2002.

23. Campo Polanco L, Gutierrez LA, Cardona Arias J. **Diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection: meta-analysis on evaluation of conventional parasitological methods (1980–2013)**. Rev Esp Salud Publica. 2014 O: 88(5): 581–600.

24. Raglio A, Cosentino M, Pegoraro M, D'Annibale ML *et al* (AMCLI-CoSP). **Evaluation of a real-time PCR test for the diagnosis of intestinal infection caused by *Giardia lamblia* (*duodenalis*), *Entamoeba histolytica, Dientamoeba fragilis* and *Cryptosporidium* spp.** ECCMID 2014 – Poster, Barcelona. https://www.escmid.org/escmid_publications/escmid_elibrary/.

25. Verweij JJ, Rune Stensvold C, **Molecular Testing for Clinical Diagnosis and Epidemiological Investigations of Intestinal Parasitic Infections**. Clin Microbiol Rev. 2014: 27: 371-418.

26. Stark D, Garcia LS, Barratt JLN, Phillips O *et al*. **Description of *Dientamoeba fragilis* Cyst and Precystic Forms from Human Samples**. J Clin Microbiol. 2014: 52(7): 2680–2683.

27. Verweij JJ. **Application of PCR-based methods for diagnosis of intestinal parasitic infections in the clinical laboratory**. Parasitology. 2014: 141(14): 1863-72.

28. van Gool T, Bart A. **Microscopy and PCR for diagnosis of parasitic infections: a tale of two amazing powerful techniques**. ECCMID 2014 – Oral Presentation, Barcelona. https://www.escmid.org/escmid_publications/escmid_elibrary/.

29. Bisoffi Z, Buonfrate D, Sequi M, Mejia R, Cimino RO *et al*. **Diagnostic Accuracy of Five Serologic Tests for *Strongyloides stercoralis* Infection**. PLoS Negl Trop Dis. 2014: 8(1): e2640.

30. Utzinger J, Becker L, van Lieshout L, van Dam J *et al*. **New diagnostic tools in schistosomiasis**. Clin Microbiol Infect. 2015: 21: 529–542.

31. Buonfrate D, Formenti F, Perandin F, Bisoffi Z. **Novel approaches to the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* infection**. Clin Microbiol Infect. 2015; 21: 543–552.

32. Ryan U, Paparini A, Monis P, Hijjawi N. **It's official - *Cryptosporidium* is a gregarine: What are the implications for the water industry?** Water Res. 2016; 15:105:305-313. doi: 10.1016/j.watres.2016.09.013.

33. Hinz R, Schwarz NG, Hahn A, Frickmann H. **Serological approaches for the diagnosis of schistosomiasis - A review**. Mol. Cell. Probes. 2016: 31: 2-21.

34. Manser MM, Saez ACS, Chiodini PL. **Faecal Parasitology: Concentration Methodology Needs to be Better Standardised**. PLoS Negl Trop Dis. 2016: 10(4): e0004579.

35. Garcia LS. **Diagnostic Medical Parasitology – 6th Edition**. ASM Press, Washington, DC, 2016.

36. Beltrame A, Guerriero M, Angheben A, Gobbi F *et al*. **Accuracy of parasitological and immunological tests for the screening of human schistosomiasis in immigrants and refugees from African countries: An approach with Latent Class Analysis**. PLoS Negl Trop Dis. 2017: 11(6): e0005593.

37. Ferraro S, Macca F, Moroni A, Liguori G *et al*. **Rilevazione di anticorpi anti *Strongyloides*: metodiche a confronto**. XLVI Congresso AMCLI 2017 – E-poster Nr 16312, Rimini.

38. Fradejas Villajos I, Martín Díaz A, Muñoz Gallego, Herrero Martínez JM *et al*. **Comparative analysis of two serological techniques for *Strongyloides stercoralis* antibody detection**. ECCMID 2017 – Poster, Vienna. https://www.escmid.org/escmid_publications/escmid_elibrary/.

39. Cringoli G, Maurelli MP, Levecke B, Bosco A *et* al. **The Mini-FLOTAC technique for the diagnosis of helminth and protozoan infections in humans and animals**. Nat Protoc. 2017: 12(9):1723-1732.

40. GISPI. **Orientamenti Diagnostici e Terapeutici in Patologia di Importazione-3ª Edizione**. SIMET, 2017.

41. UK Standards for Microbiology Investigations. **B31 - Investigation of specimens other than blood for parasites.** Standards Unit, Public Health England, 2017.

42. Laranjo-González M, Devleesschauwer B, Trevisan C, Allepuz A *et al*. **Epidemiology of taeniosis/cysticercosis in Europe, a systematic review: Western Europe**. Parasit Vectors. 2017; 10:349. doi 10.1186/s13071-017-2280-8.

43. Trevisan C, Sotiraki S, Laranjo-González M, Dermauw V *et al*. **Epidemiology of taeniosis/cysticercosis in Europe, a systematic review: eastern Europe**. Parasit Vectors. 2018; 11:569. doi.org/10.1186/s13071-018-3153-5.

44. Garcia LS, Arrowood M, Kokoskin E, Paltridge GP *et al*. **Laboratory Diagnosis of Parasites from the Gastrointestinal Tract**. Clin Microbiol Rev. 2018: 31(2): e00025-17.

45. UK Standards for Microbiology Investigations. **TP39 - Staining procedures**. Standards Unit, Public Health England, 2019.

46. World Health Organization. **Bench aids for the diagnosis of intestinal parasites - second edition**. WHO, 2019.

47. Köller T, Hahna A, Altangerel E, Verweij JJ *et al*. **Comparison of commercial and in-house real-time PCR platforms for 15 parasites and microsporidia in human stool samples without a gold standard**. Acta Tropica. 2020: 207.

48. Oliva E, Raglio A, Varani S, Menegotto N *et al*. (AMCLI-CoSP). **Evaluation of a Multiplex Real Time PCR for the Diagnosis of Intestinal Protozoa**. ECCMID 2020 – Abstract, Paris.

49. Soares FA, Benitez A, dos Santos BM, Loiola SHN *et al*. **A historical review of the techniques of recovery of parasites for their detection in human stools**. JBSTM. 2020: 58.

50. Ryan UM, Feng Y, Fayer R, Xiao L. **Taxonomy and molecular epidemiology of *Cryptosporidium* and *Giardia* - a 50 year perspective (1971-2021)**. Int J Parasitol 2021: doi: 10.1016/j.ijpara.2021.08.007.

51. Cools P, Vlaminck J, Verweij JJ, Levecke B. **Quantitative PCR in soil-transmitted helminth epidemiology and control programs: Toward a universal standard**. PLoS Negl Trop Dis. 2021: Mar 4:15(3): e0009134. Doi.

52. Hoffmann T, Hahn A, Verweij JJ, Leboulle G *et al*. **Differing Effects of Standard and Harsh Nucleic Acid Extraction Procedures on Diagnostic Helminth Real-Time PCRs Applied to Human Stool Samples**. Pathogens 2021, 10: 188.

53. Autier B, Gangneux JP, Robert-Gangneux F. **Evaluation of the Allplex GI-Helminth(I) Assay, the first marketed multiplex PCR for helminth diagnosis**. Parasite. 2021: 28, 33.

54. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). **Diagnostic Procedures-Stool Specimens**. https://www.cdc.gov/dpdx/diagnosticprocedures/stool/index.html. Ultimo accesso 30 novembre 2021.

55. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). **Parasites A-Z Index**. https://www.cdc.gov/dpdx/az.html. Ultimo accesso 30 novembre 2021.