Azienda Ospedaliero Universitaria Careggi

Servizio Sanitario della Toscana

FAD sincrona
DIAGNOSI DIRETTA MORFOLOGICA DELLE PARASSITOSI UMANE
Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi
11, 13, 18 ottobre 2023

Parassitosi intestinali: aspetti preanalitici, metodologie e tecniche diagnostiche per protozoi ed elminti

FRANCESCO BERNIERI

Consulente CRRVEQ, Milano, Italia

Comitato di Studio per la Parassitologia – AMCLI-CoSP

Conflitto di interessi

Dichiaro di non avere alcun conflitto di interesse riguardo all'argomento trattato né di aver ricevuto alcun compenso per questa presentazione.

Contenuti della Relazione

Percorso diagnostico delle Parassitosi Intestinali.

https://www.amcli.it/documenti/percorsi-diagnostici/

https://crrveq.aou-careggi.toscana.it/relazioni/index.php

Attenzione

La presentazione non contiene informazioni riguardo la sicurezza in laboratorio (uso della cappa chimica, uso dei dispositivi di protezione individuali ecc) e lo smaltimento dei rifiuti come rifiuti speciali.

Per tali argomenti si rimanda alla normativa vigente sia europea sia nazionale sia regionale e alle eventuali raccomandazioni/linee guida locali.

Aspetti preanalitici

Punti specifici trattati nella relazione

- **Scheda anamnestica.**
- **Istruzioni per la raccolta.**
- **Numero di campioni.**
- **Conservazione e fissazione dei campioni**

SCHEDA ANAMNESTICA

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.

MICROBIOLOGIA E VIROLOGIA

ESEMPIO

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 _____

AMCLI associazione microbiologi clinici italiani Ente del Terzo Settore

CoSP

ESEMPIO:

ESAME COPROPARASSITOLOGICO

MODALITÀ DI RACCOLTA

PRECAUZIONI IMPORTANTI

Alcuni giorni prima e durante il periodo della raccolta delle feci:

a) non fare uso di lassativi, antidiarroici, antimicrobici, o di altre sostanze interferenti come bario, bismuto, oli minerali;

b) 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.

MODALITÀ DI RACCOLTA

Occorrente

Contenitore con tappo a vite munito di paletta raccoglitrice. Per i pazienti ambulatoriali il contenitore è disponibile gratuitamente presso il Centro Prelievi.

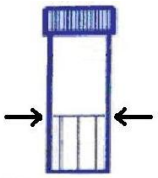
Raccolta campione

a) Raccogliere le feci su una superficie asciutta quale:
   - una padella da letto;
   - un sacchetto di plastica o un foglio di carta posto nel bidet o in un cestino.
   - una scodella.

   Attenzione: NON emettere le feci direttamente nel water.
   NON urinare sul campione di feci durante la raccolta.
   NON urinare nel contenitore.

b) Porre le feci nel contenitore:
   - Feci formate: con il cucchiaino inserito sul coperchio raccogliere circa 5-10 grammi di feci (una porzione delle dimensioni di una noce) e porla nel contenitore.
   - Feci liquide: travasare circa 5-10 ml di feci nel contenitore (circa un terzo del volume del contenitore).

   NON riempire completamente il contenitore. I contenitori non correttamente riempiti (troppo pieni o troppo scarsi) non verranno accettati.



c) Chiudere il contenitore e lavarsi accuratamente le mani.

Conservazione

Consegnare il campione di feci al Centro Prelievi dalle ore 7.30 alle ore 10.00 dal lunedì al venerdì.; se non possibile conservare a 4° C (in frigorifero) per un massimo di 12-24 ore.

ESEMPIO:

RICERCA ENTEROBIUS VERMICULARIS

SCOTCH TEST

Il prelievo deve essere preferibilmente eseguito al mattino prima che il paziente defechi e/o si lavi.

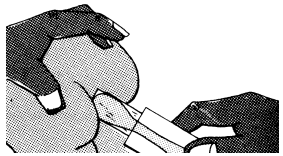
Occorrente

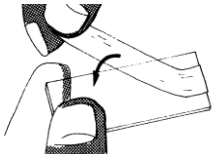
1. Nastro adesivo trasparente.
2. Abbassalingua.
3. Vetrino portaoggetti.

I materiali sono disponibili gratuitamente presso il Centro Prelievi o la Segreteria del laboratorio

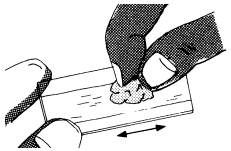
Raccolta campione

- Tagliare un pezzetto di nastro adesivo della lunghezza di un vetrino portaoggetti.
- Porre il nastro adesivo sull'estremità di un abbassalingua avendo cura che la parte gommata sia posizionata all'esterno.
- Tenendo ben fermo il nastro adesivo sull'abbassalingua premere con la parte gommata contro diverse aree della regione perianale. Non introdurre nell'ano.





- Applicare il nastro adesivo sul vetrino.



- Utilizzando una garza o un batuffolo di cotone premere delicatamente in modo da far ben aderire il nastro sul vetrino.

Conservazione

- Consegnare il campione di feci al Centro Prelievi dalle ore 7.30 alle ore 10.00 dal lunedì al venerdì.

Nel caso fosse richiesta la raccolta di più campioni in giorni successivi, conservare i materiali raccolti giornalmente a temperatura ambiente fino alla consegna

AMCLI associazione microbiologi clinici italiani Ente del Terzo Settore

NUMERO DI CAMPIONI
Tecniche tradizionali

- **Abitualmente 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%.**

NUMERO DI CAMPIONI
Tecniche tradizionali

- **È stato proposto un approccio che prevede 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.**

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

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*	

(*) Allo stato esiste un unico kit commerciale per biologia molecolare dei microsporidi.
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".

FECI

In base alle ricerche che esegue, ogni laboratorio deve decidere:

- **se accettare feci fresche senza fissativi e/o già fissate;**
- **quali e quanti fissativi utilizzare.**

I campioni di feci "fresche" devono essere immediatamente processati e/o immediatamente fissati o adeguatamente conservati (eventuale congelamento per biologia molecolare).

I campioni di feci già fissati possono essere processati a distanza di tempo (ore, giorni, settimane).

Feci fresche

- **Le feci fresche permettono di eseguire tutte le tecniche diagnostiche dirette.**
- **Sono indispensabili per la ricerca di:**
  - ***D. fragilis* con la colorazione di Giemsa;**
  - **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";**
  - **per la coltura delle amebe.**
- **Infine, si deve tener presente che le feci fresche sono il <u>campione validato</u> per le tecniche molecolari.**

Raccolta – Feci fresche

Il contenitore deve essere:

- a bocca larga;

- pulito;

- asciutto;

- a tenuta.

AMCLI associazione microbiologi clinici italiani Ente del Terzo Settore

Trasporto – Feci fresche

I campioni di feci "fresche" devono essere processati entro breve tempo dall'arrivo in laboratorio

e/o

immediatamente fissati

- **Feci diarroiche: entro ~ 30 minuti.**
- **Feci poltacee: entro ~ 1 ora.**
- **Feci formate: entro 24 ore (fino a 48 ore se refrigerate).**

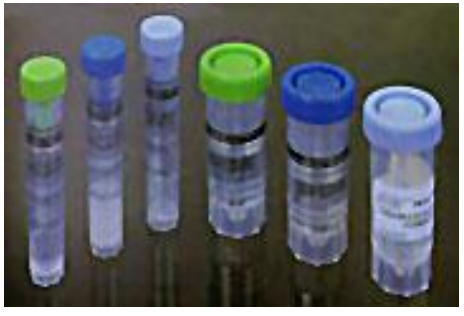
Raccolta – Feci fissate

Formalina tamponata 10%

SAF (Sodio acetato-Acido acetico-Formalina)

ZN-PVA (PoliVinil-Acetato)

Fissativi *One vial* "ecologici"



Trasporto – Feci fissate

- **Feci fissate: giorni, settimane**

AMCLI associazione microbiologi clinici italiani Ente del Terzo Settore

Raccolta – Feci fissate
Formalina al 10% e SAF

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*.

Raccolta – Feci fissate
Fissativo di Schaudinn e ZN-PVA

Conservante/Fissativo	Vantaggi	Svantaggi
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).

Raccolta – Feci fissate
Fissativo *One Vial* (“ecologici”)

Conservante/Fissativo	Vantaggi	Svantaggi
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*.

RACCOLTA ALTRI CAMPIONI

SCELTA DEI MATERIALI D'ELEZIONE

- **Urine per *Schistosoma haematobium* e *Trichomonas vaginalis* (nel maschio).**
- **Escreato per *Paragonimus* spp.**

AMCLI associazione microbiologi clinici italiani Ente del Terzo Settore

CAMPIONI URINARI

- **RICERCA DI UOVA DI *S. haematobium***
  - **Raccolta di almeno 10 ml di urine del <u>mitto terminale</u>, effettuata tra le ore 10 e le ore 14**
  - **Tenere al buio ed esaminare entro un'ora; altrimenti aggiungere 0,1 mL di formalina non diluita**

    oppure
  - **Raccolta di tutti i mitti terminali delle 24 ore; aggiungere 1 mL di formalina non diluita per 100 mL di urina**
- **RICERCA DI *T. vaginalis* NEL MASCHIO**
  - **Raccolta di circa 10 ml di urine del <u>primo mitto</u>**
  - **Centrifugare subito ed esaminare e/o insemenzare il sedimento**

ESSUDATO BRONCOPOLMONARE

- **RICERCA DI UOVA DI *Paragonimus* spp.**

  MATERIALE IDONEO: ESPETTORATO SPONTANEO

  – **Fluidificare e concentrare come per micobatteri**

  L'espettorato francamente salivare deve essere considerato materiale NON IDONEO

Occasionalmente nell'espettorato possono essere ritrovate larve migranti di *A. lumbricoides*, *S. stercoralis*, *Ancylostoma/Necator*.

AMCLI associazione microbiologi clinici italiani Ente del Terzo Settore

CONCLUDENDO

Nelle indagini parassitologiche è:

- **Indispensabile la scheda di accompagnamento per un più mirato processo analitico.**
- **Indispensabile fornire istruzioni scritte per la raccolta dei campioni.**
- **Molto importante il numero di campioni da esaminare.**
- **Fondamentale la scelta dei contenitori ed eventuali fissativi per ottenere qualità nel risultato.**
- **Fondamentale i tempi di trasporto per evitare artefatti e/o falsi negativi.**

DIAGNOSTICA DELLE PARASSITOSI INTESTINALI

Esame Copro-parassitologico

Insieme delle tecniche che si utilizzano per ricercare i parassiti intestinali in campioni di feci.

- Solitamente la ricerca del parassita è effettuata mediante esami microscopici, ma in alcuni casi è utile e/o necessario utilizzare altre teniche:
- EIA, Immunocromatografia, Fluorescenza diretta per antigeni specifici.
- Colture per *Strongyloides stercoralis*, *Entamoeba histolytica*.
- Biologia molecolare (PCR) per alcuni protozoi patogeni o 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.

AMCLI associazione microbiologi clinici italiani Ente del Terzo Settore

Esame Copro-parassitologico Standard (O&P)

Consiste in:

- **Esame microscopico diretto**
  (a fresco e dopo colorazione estemporanea)
- **Esame microscopico dopo concentrazione**
  (a fresco e dopo colorazione estemporanea)
- **Esame microscopico dopo colorazione permanente**

Un laboratorio che vuole cimentarsi nella diagnostica delle parassitosi intestinali deve essere in grado di eseguire almeno:

- **Esame Copro-parassitologico Standard**
- **Scotch Test per la ricerca di *Enterobius vermicularis***

ESAME MACROSCOPICO

- È di guida nella ricerca dei protozoi.
- Può rivelare la presenza di elminti o parti di essi.
- Esaminare le feci per:
  - consistenza;
  - presenza di muco e/o sangue;
  - elminti o parti di essi.

AMCLI associazione microbiologi clinici italiani Ente del Terzo Settore

ESAME MACROSCOPICO

ELMINTI EVIDENZIABILI

- *Enterobius vermicularis*
  (di norma la femmina)

- *Ascaris lumbricoides*

- Proglottidi di Cestodi

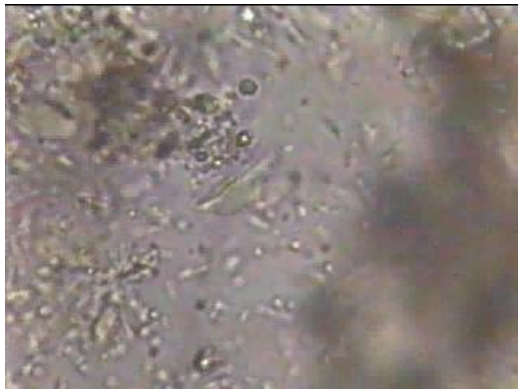
Da: CDC-DPDx - Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern (modificate)

AMCLI associazione microbiologi clinici italiani Ente del Terzo Settore

Esame Diretto

È il primo step dell'esame Copro-parassitologico standard

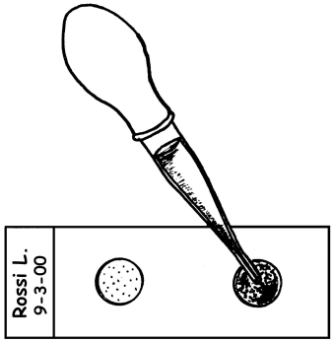
Tecnica poco sensibile, ma va eseguita se si esaminano feci fresche (soprattutto se feci liquide o soffici/molli), indispensabile per rilevare la mobilità di trofozoiti e di larve di nematodi.

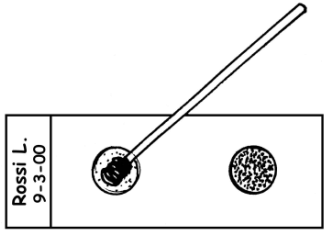


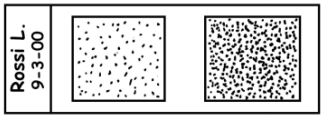
AMCLI associazione microbiologi clinici italiani Ente del Terzo Settore

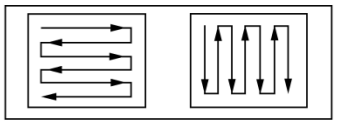
Esame Diretto

1. Porre una goccia di soluzione fisiologica al centro della metà sinistra di un vetrino e una goccia di soluzione di soluzione iodata 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 iodata.
4. Coprire le gocce con vetrini copri oggetto 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.
6. 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.

Soluzioni iodate

Le soluzioni iodate per parassitologia contengono più iodio della soluzione per colorazione di Gram (Gram's iodine).

- La soluzione di Dobell o Lugol 1:5 contiene l'1% di iodio. Usare.
- La soluzione di D'Antoni contiene l'1,5% di iodio. Usare.
- La soluzione di Lugol per la colorazione di Gram contiene lo 0,33-0,5% di iodio. NON usare.

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

TECNICHE DI CONCENTRAZIONE

È il secondo step dell'esame Copro-parassitologico standard

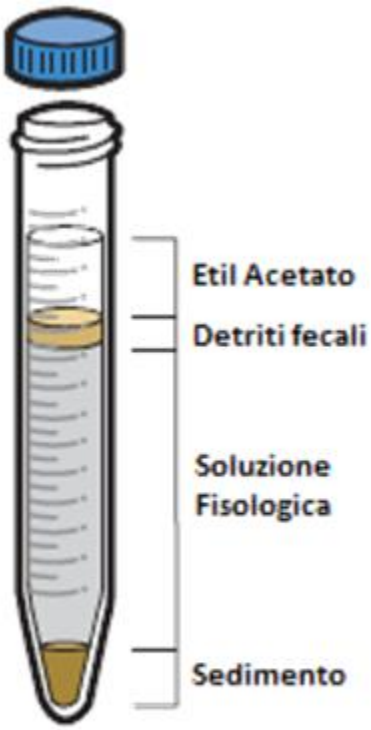
Nella routine di laboratorio vi sono essenzialmente due tecniche di concentrazione fecale:

- **SEDIMENTAZIONE**
  -Formolo-Etile Acetato (FEA)
- **FLOTTAZIONE**
  - Zinco Solfato
  - Cloruro di Sodio

Entrambe possono essere eseguite a partire sia da feci fresche sia da feci conservate in qualunque tipo di fissativo con l'eccezione di LV-PVA, Zn-PVA, Cu-PVA per i quali tali tecniche sono sconsigliabili.

Sedimentazione - Formolo-Etile Acetato

- Questa procedura permette di recuperare le cisti e oocisti dei protozoi, le uova di elminti e, occasionalmente, le larve presenti nel campione fecale.
- È la tecnica raccomanda in quanto è la più facile da eseguire, la meno soggetta ad errori tecnici e consente il recupero della più ampia gamma di elementi parassitari.
- Tale raccomandazione deriva dalle indicazioni di numerosi enti internazionali: OMS, NHS, ASM, CDC, CLSI.



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

<u>Attenzione</u>: questa tecnica non è raccomandata per la ricerca mirata di larve di *Strongyloides stercoralis*.

Sedimentazione - Formolo-Etile Acetato

- In commercio esistono numerosi kits per la concentrazione.
- Devono sempre essere seguite le istruzioni del produttore.
- Non sono tutti uguali.
- **Prima dell'uso devono essere validati.**

Sedimentazione - Formolo-Etile Acetato

PLOS Neglected Tropical Diseases. April 13, 2016

Faecal Parasitology: Concentration Methodology Needs to be Better Standardised

Monika M. Manser, Agatha Christie Santos Saez, Peter L. Chiodini*

UKNEQAS Parasitology, Department of Clinical Parasitology, Hospital for Tropical Diseases, London, United Kingdom

Recommendations

Our recommendation for the concentration method is that approximately 1 gram or a pea-sized amount of faeces should be concentrated and that 10% formalin in water should be used instead of formalin in saline. A surfactant (Triton X 100) should be added when using ethyl acetate as a solvent. The most effective concentration of Triton X 100 is 0.1%. The sample must be sieved after adding it to formalin water using a pore size no greater than 0.5mm. The sample must be vortexed for at least 15 seconds after the addition of ethyl acetate and Triton X. Adequate centrifugal force must be used, i.e. 3000 rpm which equates to 1,200g. This confirms the centrifugal speed recommended in the modified Ridley Allen method [3]. A centrifugal time of 3 minutes is recommended. Three drops of saline should be added to the deposit prior to examination. Failing to do so results in the deposit being too dense to examine.

Sedimentazione - Formolo-Etile Acetato

Tre punti chiave per ottimizzare la ricerca

- Filtrazione: Usare filtri con pori da 425 µm (*).
  - Con pori troppo grandi passeranno cisti, oocisti, uova, e larve, ma anche molti detriti: difficoltà nella lettura, mascheramento delle uova e delle cisti.
  - Con pori troppo piccoli si avrà un preparato "pulito", ma passeranno meno parassiti.
  - I kits commerciali hanno filtri diversi con grandezza dei pori diversa.
- Solvente: Usare un solvente (Etil Acetato).
  - Il ritrovamento dei parassiti diminuisce fortemente se non viene usato un solvente (Etil Acetato) come estrattore dei grassi e dei detriti.
  - Alcuni kits commerciali non prevedono l'uso del solvente.
- Centrifugazione: 1.200 x g (3000 rpm) per 3 minuti.
  - Un giusto equilibrio tra tempo e forza di centrifugazione permetterà di avere preparati con una buona quantità di parassiti e una quantità accettabile di detriti.

(*) In alternativa: doppio strato di garza inumidita (sfasare le due compresse di garza). Le maglie del doppio strato di garza sono larghe circa 0,5 mm.

Sedimentazione - Formolo-Etile Acetato

Kits commerciali

- Ricordarsi che non sempre ciò che sembra più semplice o è più economico è la scelta migliore.
- Nella scelta rammentare i tre punti chiave:
  - Filtrazione
  - Solvente
  - Centrifugazione

Flottazione

- Permette la separazione degli elementi parassitari dai grossolani detriti fecali, usando una soluzione di flottazione con una specifica alta densità.
- Le uova, le cisti e le oocisti, che hanno una gravità specifica inferiore a quello della soluzione di flottazione, saliranno in cima alla sospensione, mentre i detriti fecali con gravità specifica maggiore si troveranno nel sedimento sul fondo.
- Le soluzioni di flottazione più usate sono:
  - Cloruro di Sodio (gravità specifica 1,20 a 20° C)
  - Zinco Solfato (gravità specifica 1,35).

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

Flottazione

- Vantaggi:
  - Il materiale ottenuto è più pulito rispetto alla tecnica di sedimentazione.
- Svantaggi
  - Le uova opercolate e le uova non fertili di *Ascaris* hanno un elevata gravità specifica e non flottano. (*)
  - Si deve, pertanto, esaminare sia la parte superficiale sia il sedimento (NCLSI, L. Garcia).
  - Il preparato deve essere esaminato entro 15-20 minuti dalla centrifugazione finale; oltre questo lasso di tempo, gli organismi iniziano a distorcersi e a disintegrarsi.

(*) Per poter far flottare anche queste uova si dovrebbe utilizzare una soluzione con gravità specifica > 1,35, tipo le soluzioni contenenti Iodio-Mercurato di Potassio (g.s. 1,44-1,45). Queste soluzioni non sono generalmente utilizzate nei laboratori di microbiologia umana.

COLORAZIONI PERMANENTI

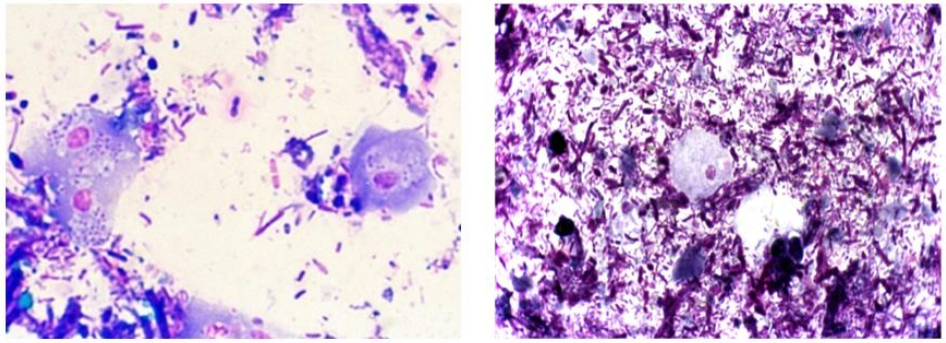
L'esecuzione di una colorazione permanente è il terzo step dell'esame Copro-parassitologico Standard.

- **Giemsa**
  - *Dientamoeba fragilis* e altri flagellati, *Blastocystis* spp
- **Tricromica di Wheatley**
  - Trofozoiti di amebe
- **Ematossilina ferrica**
  - Trofozoiti di amebe

Colorazione di Giemsa

- Molto semplice da eseguire, in tutto simile alla colorazione utilizzata per i Plasmodi.
- Indicata per la diagnosi microscopica di *Dientamoeba fragilis*. Possono essere facilmente identificate anche *Blastocystis* spp e *G. duodenalis*.
- Sono necessarie feci fresche; le feci conservante in qualunque fissativo non sono idonee.

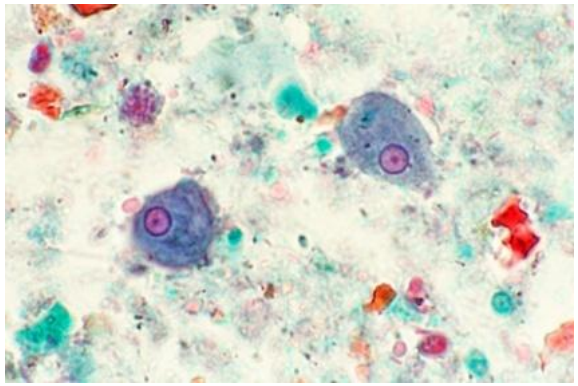
Nota: dato che *D. fragilis* è il protozoo intestinale più diffuso in Italia, come colorazione permanente è raccomandabile la colorazione di Giemsa, anche per la sua semplicità.



Trofozoiti di *D. fragilis* 1.000x

Colorazione Tricromica di Wheatley

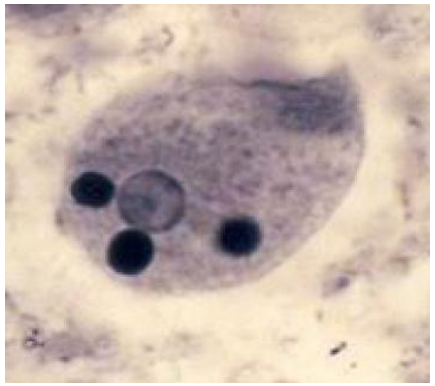
- È una colorazione piuttosto laboriosa, ma semplice.
- Feci fresche immediatamente fissate con fissativo di Schaudinn (contiene mercurio).
- Feci conservate in PVA.
- Feci in fissativi ecologici in genere con colorazioni tricromiche specifiche (tipo Ecostain®).
- Non idonei campioni conservati in Formalina 10%, SAF, MIF. Risultati molto scarsi.
- Identificazione di trofozoiti e cisti di amebe e flagellati grazie alla elevata definizione dei particolari dei nuclei.



Trofozoiti di *E. histolytica/dispar*
Da: Petithory JC *et al*. Amibes et Flagellés Intesinaux. 1998

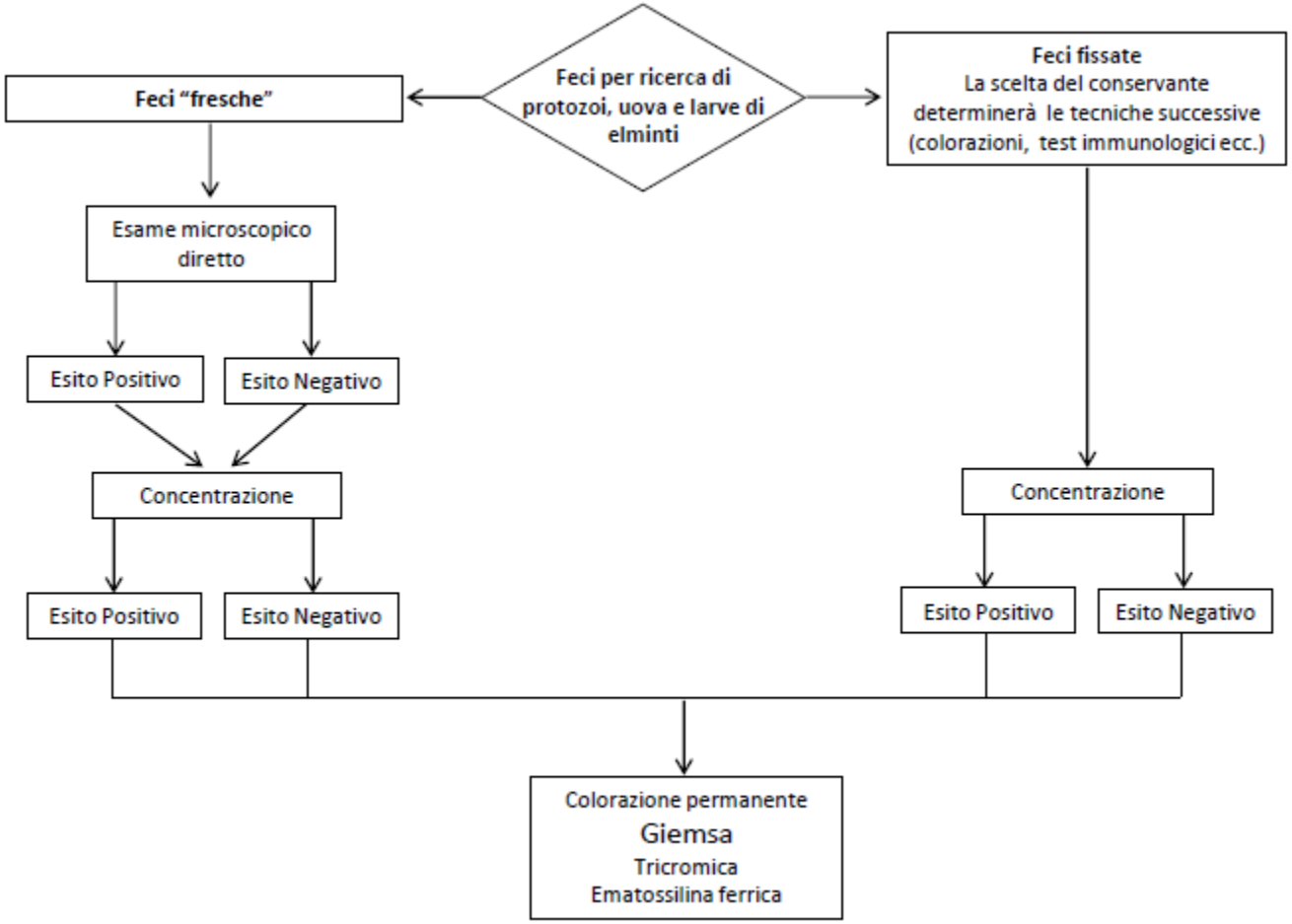
Colorazione con Ematossilina Ferrica

- Feci fresche immediatamente fissate con fissativo di Schaudinn (contiene mercurio).
- Feci conservate in PVA.
- Feci conservate in SAF.
- Non idonei campioni conservati in Formalina 10% o in MIF. Risultati molto scarsi.
- Feci in fissativi ecologici.
- Anche se non presenta la gamma di contrasti di colore della Tricromica è ottima per l'identificazione di trofozoiti e cisti di amebe e flagellati.



Trofozoita di *E. histolytica*
Da: Petithory JC *et al*. Amibes et Flagellés Intesinaux. 1998

Riepilogando:
Esame Copro-parassitologico Standard (O&P)



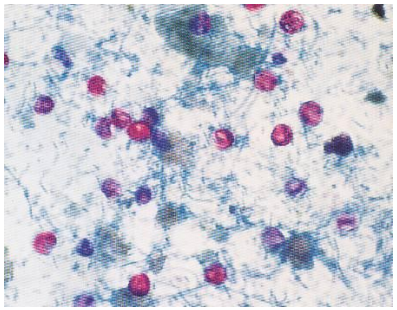
Da: L.S Garcia. Diagnostic Medical Parasitology . 2016 (modificato)

Se i campioni sono conservati in formalina o altri fissativi, è possibile non eseguire l'esame microscopico diretto.

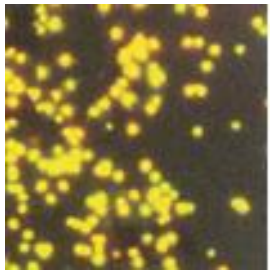
COLORAZIONI PER COCCIDI

Particolarmente utili per la ricerca di *Cryptosporidium* spp. Meno per *Cyclospora cayetanensis* e *Cystoisospora belli* che sono più facilmente trovate e identificate con l'esame microscopico diretto o dopo concentrazione.

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



- **Ziehl-Neelsen a caldo**
- **Ziehl-Neelsen modificata a freddo**
- **Kinyoun**
- **Auramina o Auramina-Rhodamina**
  (screening per *Cryptosporidium* spp in fluorescenza)



Nota: Non tutte le oocisti si colorano o si colorano uniformemente, particolarmente per *C. cayetanensis* e *C. belli*.

ALTRE TECNICHE PER ELMINTI

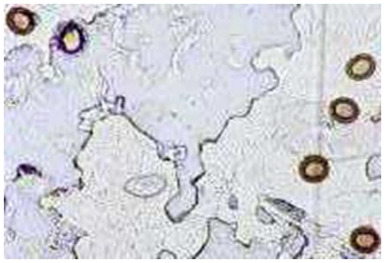
- **Ricerca di *Enterobius vermicularis***
  - Scotch Test (Test di Graham)
  - Tampone perianale
- **Ricerca di larve di *Strongyloides stercoralis* e altri nematodi**
  - Metodo di Baermann
  - Coltura su agar

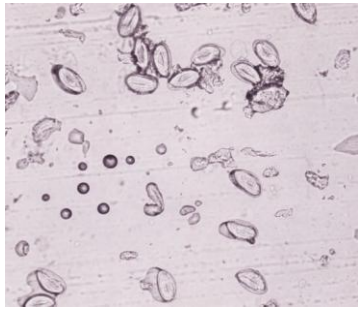
AMCLI associazione microbiologi clinici italiani Ente del Terzo Settore

Scotch test –Tampone perianale

- Con le tecniche di concentrazione delle feci è possibile evidenziare le uova in meno del 5-10% dei casi di infezioni da *Enterobius vermicularis* (Ossiuri).
- Le uova vanno ricercate a livello delle pliche perianali.
- Un singolo test individua solo circa il 60% delle infezioni.
- Esaminare almeno tre campioni raccolti a giorni alterni.
- Può essere necessario esaminare sino a 6 campioni prima di poter escludere con certezza un'infezione.

Con lo Scotch test è possibile evidenziare anche uova di *Taenia* spp.





Ricerca di larve di *Strongyloides stercoralis*

Rev Esp Salud Pública 2014; 88:581-600. N.º5 Septiembre-Octubre 2014

REVISIÓN SISTEMÁTICA Y METANÁLISIS

INFECCIÓN POR *STRONGYLOIDES STERCORALIS*: METANÁLISIS SOBRE EVALUACIÓN DE MÉTODOS DIAGNÓSTICOS CONVENCIONALES (1980-2013)

Laura Campo Polanco (1), Lina A Gutiérrez (1) y Jaiberth Cardona Arias (2).

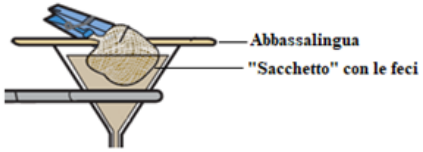
En el metanálisis de la sensibilidad se obtuvo una medida global del 72% (IC 95%=67%-76%) para el método de Baermann, del 89% (IC 95%=86%-92%) para en placa de ágar, del 21% (IC 95%=16%-26%) en el examen directo en heces y del 48% (IC 95%=42%-54%) en formol-éter. Con todos los métodos hubo heterogeneidad entre los estudios incluidos (figura 2). En los cuatro métodos diagnósticos la especificidad fue del 100%.

TECNICA	SENSIBILITÀ	SPECIFICITÀ
Esame diretto	21%	100%
Esame dopo concentrazione	48%	100%
Baermann	72%	100%
Coltura in agar	89%	100%

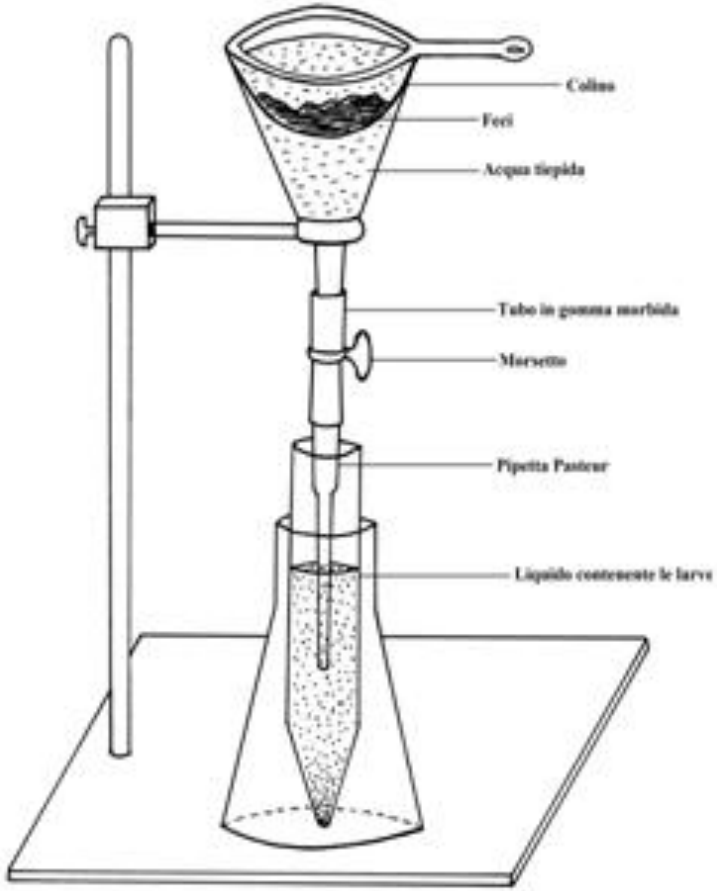
AMCLI associazione microbiologi clinici italiani Ente del Terzo Settore

Metodo di Baermann

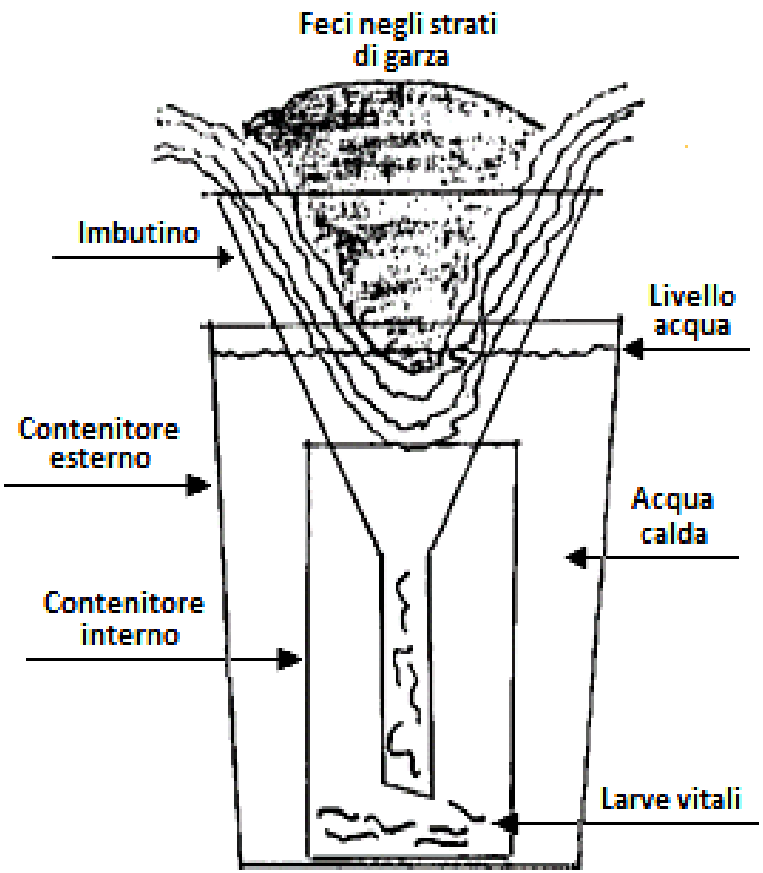
- Tecnica di concentrazione specifica per le larve di *Strongyloides stercoralis.*
- Sfrutta la termotassi positiva delle larve che presentano anche una fototassi positiva.
- Molto più sensibile della concentrazione FEA.
- Possono essere utilizzate solo feci fresche, non fissate e non refrigerate.
- Con il metodo di Baermann è possibile concentrare anche i trofozoiti di *Balantidium coli*.



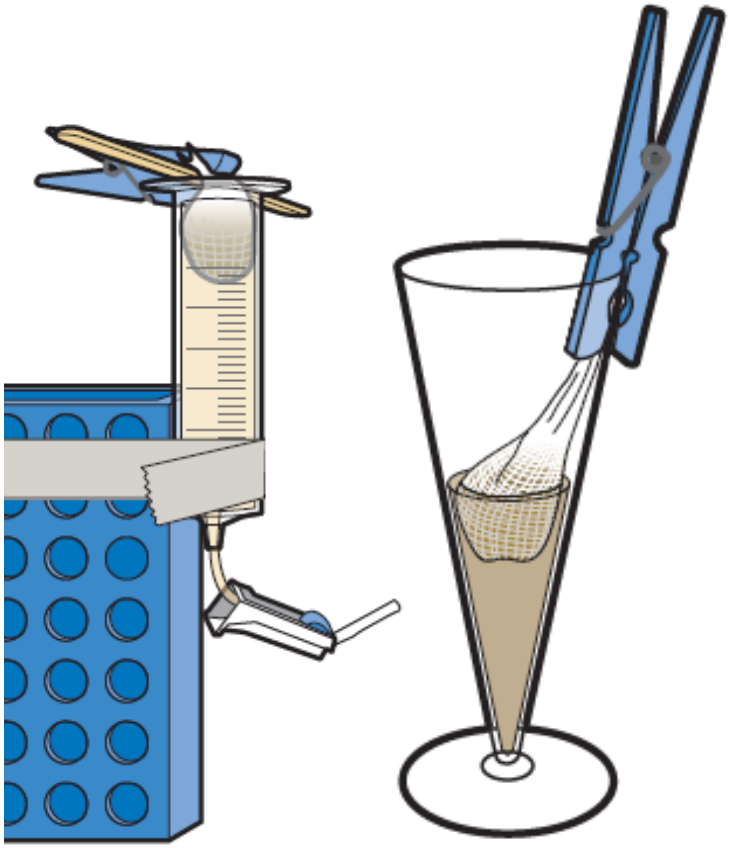
Da: *Bench aids for the diagnosis of intestinal parasites*. WHO 2019



Modifiche al metodo di Baermann



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



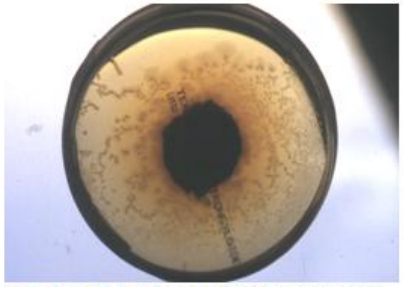
Bench aids for the diagnosis of intestinal parasites
© World Health Organization, 2019

Vedi Percorso diagnostico
Parassitosi Intestinali

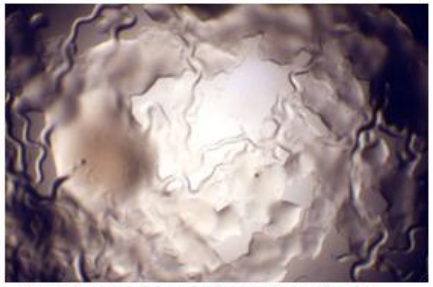
Coltura su Agar
(Arakaki T *et al*, 1990 - Koga KS *et al*, 1991)

- La coltura su agar è considerato il metodo più efficiente per la ricerca delle larve di *Strongyloides stercoralis*.
- Questa tecnica dovrebbe essere il test di scelta soprattutto nei pazienti immunocompromessi.
- Viene utilizzato un terreno specifico (*).
- L'utilizzo combinato di coltura in agar e Baermann può aumentare il numero di campioni positivi per *S. stercoralis*.
- Con la coltura su agar è possibile coltivare anche Ancilostomidi e di *Trichostrongylus* spp

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)



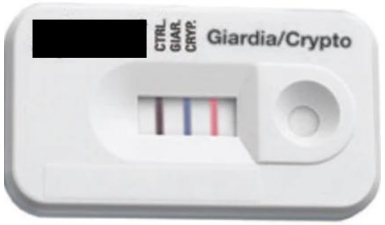
Esame microscopico della piastra
Sono visibili le larve

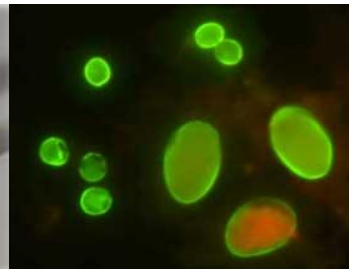
(*) Il terreno è disponibile in commercio già pronto all'uso.

RICERCA DI ANTIGENI

Giardia duodenalis e *Cryptosporidium* spp

- Tecniche EIA, Immunocromatografiche, Fluorescenza Diretta (DFA).
- Test per i singoli protozoi o per entrambi.
- Feci fresche, anche refrigerate per non più di 2-3 giorni o anche congelate (feci congelate: non per DFA).
- Feci conservate in Formalina 10%, SAF o Fissativi "Ecologici" (verificare la compatibilità dichiarata dai produttori).
- Per i test Immunocromatografici è raccomandato l'esame del sedimento dopo concentrazione in quanto aumenta la sensibilità, per i test EIA è anche possibile l'esecuzione diretta dalle feci prima della concentrazione





RICERCA DI ANTIGENI

Entamoeba histolytica/dispar e *Entamoeba histolytica*

- Tecniche EIA, Immunocromatografiche.
- La maggior parte non distingue tra *E. hystolitica* patogena e *E. dispar* non patogena, evidenziando quindi il gruppo *E. histolytica/dispar*.
- Vi sono anche kit specifici per *E. hystolitica* “sensu stricto”.
- Feci fresche anche refrigerate per non più di 2-3 giorni o congelate.
- Feci conservate in qualsivoglia fissativo non sono idonee.
- Anche per il kit che individua contemporaneamente *E. histolytica/dispar*, *G. duodenalis* e *Cryptosporidium* spp, sono necessarie feci fresche.

BIOLOGIA MOLECOLARE

- PCR convenzionale e RT-PCR.
- Sono disponibili test che identificano un solo parassita (monoplex) e altri invece con pannelli multiparametrici (multiplex).
- Elevata sensibilità e specificità per i principali protozoi intestinali (*E. histolytica*, *G. duodenalis*, *D. fragilis* e *Cryptosporidium* spp), anche con un solo campione di feci.
- PCR più sensibile di oltre il 30% rispetto alle tecniche tradizionali nel rilevare *G. duodenalis*, *E. histolytica*, *D. fragilis* e *Cryptosporidium* spp.
- Feci fresche anche refrigerate o congelate.
- Compatibili feci conservate in "fissativi universali" (miscele di alcooli; senza: Formalina, PVA, Zinco).
- Non idonee feci conservate in fissativi contenenti Formalina o PVA.

BIOLOGIA MOLECOLARE
DUAL FECAL TEST

Un campione raccolto in un'unica giornata suddiviso in due aliquote.

- La prima (A): feci fresche senza conservanti per l'esecuzione dei test molecolari.
- La seconda (B): feci in un conservante, come Formalina 10%, SAF o altro, per la concentrazione.

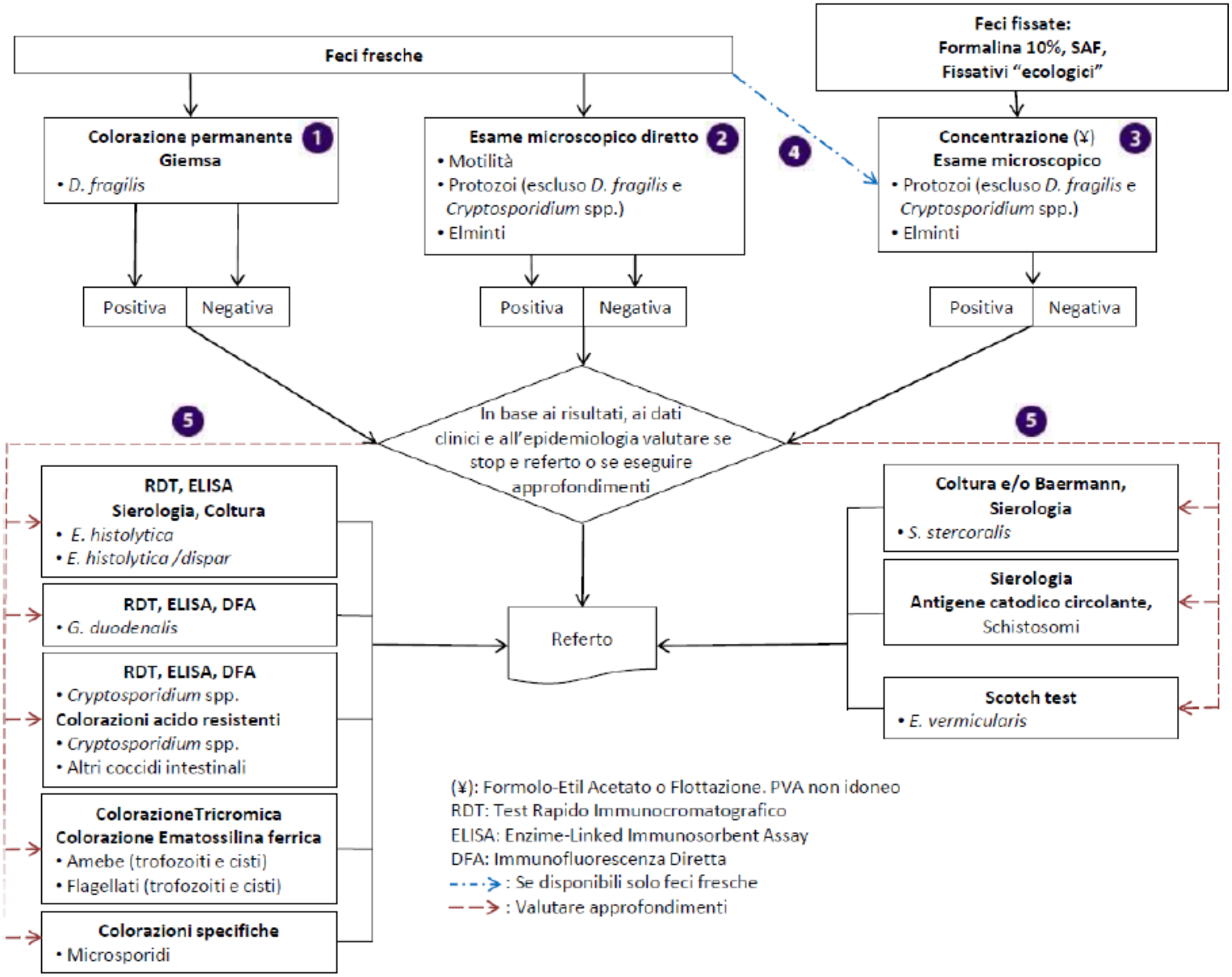
Biologia Molecolare (PCR)	Microscopia dopo concentrazione		
Protozoi patogeni	Protozoi patogeni	Protozoi non patogeni	Elminti
Entamoeba histolytica "sensu stricto"	*Cystoisospora belli*	*Entamoeba dispar*	Nematodi
Giardia duodenalis	*Balantidium coli*	*Entamoeba coli*	Cestodi
Cryptosporidium spp.	Microsporidi(*)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

Da van Gool e Bart (modificata)

(*) Allo stato esiste un unico kit commerciale per biologia molecolare dei microsporidi.
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".

Riepilogando

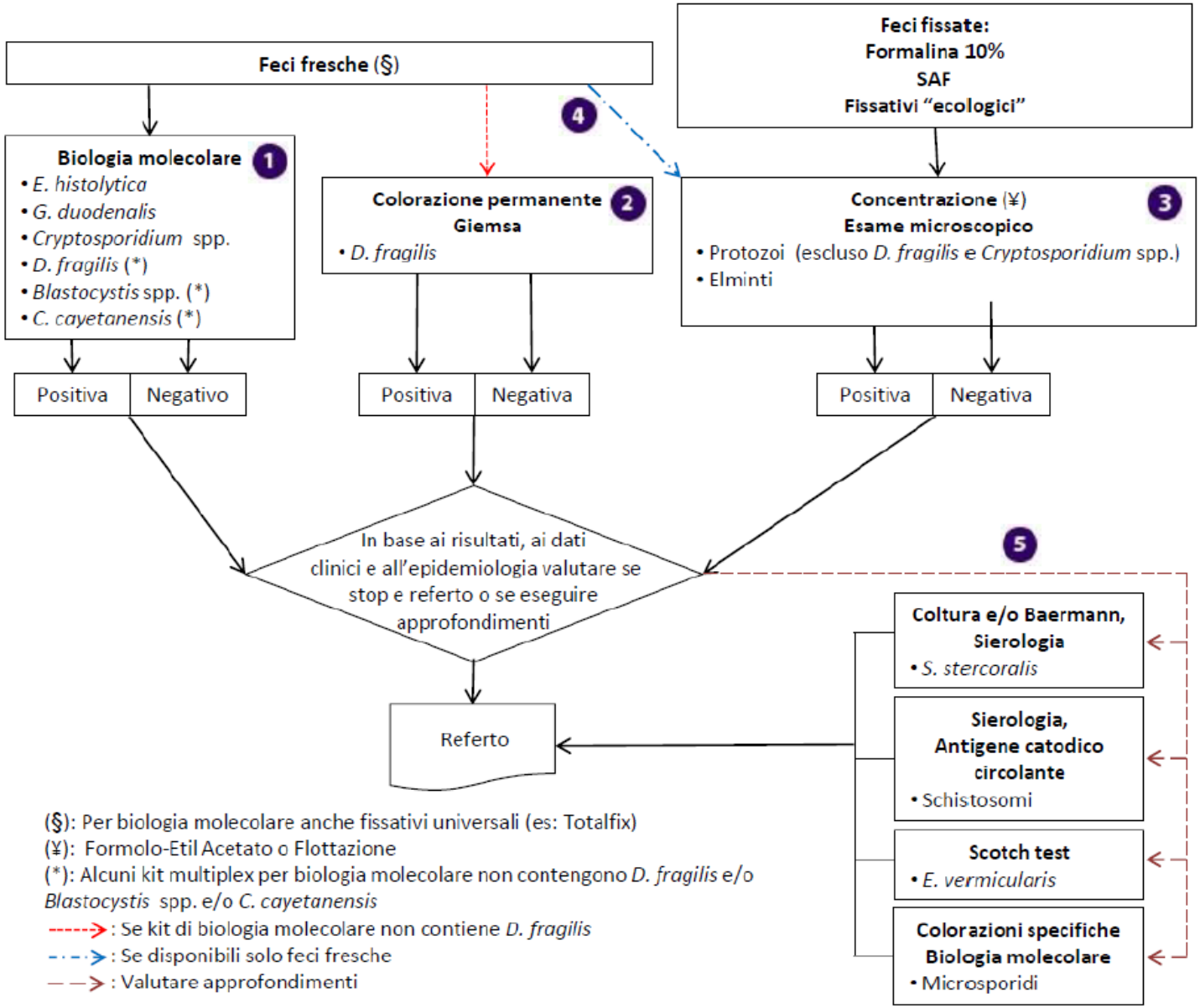
Fig. 33. Algoritmo A: tecniche tradizionali



AMCLI associazione microbiologi clinici italiani Ente del Terzo Settore

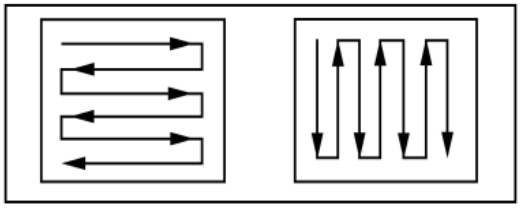
Riepilogando

Fig. 34. Algoritmo B: tecniche di biologia molecolare



Lettura Microscopica dei Preparati

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



- In presenza di elementi sospetti **usare un oculare micrometrico**.

Nota: è molto utile avere a disposizione testi, atlanti, iconografia di riferimento.

AMCLI associazione microbiologi clinici italiani

OCULARE MICROMETRICO

Biblioteca Medica Contemporanea
DELLA
ANTICA CASA EDITRICE DOTTOR FRANCESCO VALLARDI

DOTT. GIULIO BIZZOZERO
PROFESSORE ORDINARIO DI PATOLOGIA NELLA R. UNIVERSITÀ DI TORINO

MANUALE
DI
MICROSCOPIA CLINICA
CON AGGIUNTE RISGUARDANTI
GLI ESAMI CHIMICI PIÙ UTILI AL PRATICO
E
L'USO DEL MICROSCOPIO NELLA MEDICINA LEGALE

TERZA EDIZIONE
COMPLETAMENTE RIFUSA ED AUMENTATA
1888

Con 64 figure intercalate e con 7 tavole litografiche

ANTICA CASA EDITRICE
DOTTOR FRANCESCO VALLARDI
MILANO, Corso Magenta, 48. NAPOLI, S. Anna dei Lombardi, 35.
TORINO Carlo Alberto, 5. FIRENZE Alfani, 41. ROMA Convertite, 5 BOLOGNA Farini, 10 PADOVA S. Fermo, 1251.
PALERMO - CATANIA

DESCRIZIONE ED USO DEL MICROSCOPIO. 11

più delicati, invece, sono sempre dati da una vite micrometrica (V. fig. I) la quale non deve mai mancare in un buon istrumento.

6. In molte occasioni è indispensabile il misurare gli oggetti che si scorgono nel campo del microscopio; ciò si ottiene per mezzo dei cosidetti **micrometri.** Il più usato è un micrometro *oculare*, rappresentato da una lastrina di vetro, su cui, col diamante, è segnata una data misura, p. es. un centimetro, divisa in un certo numero di parti eguali; questa lastrina si applica su quel diaframma che, come notammo, sta nel tubo oculare. A questo modo,

AMCLI associazione microbiologi clinici italiani

OCULARE MICROMETRICO

- Oculare graduato che permette di misurare le forme osservate.

- Calibrazione del microscopio con un vetrino micrometrico (per ogni obiettivo).

- Importanza delle dimensioni:
  - per la diagnosi
  - per distinguere falsi parassiti

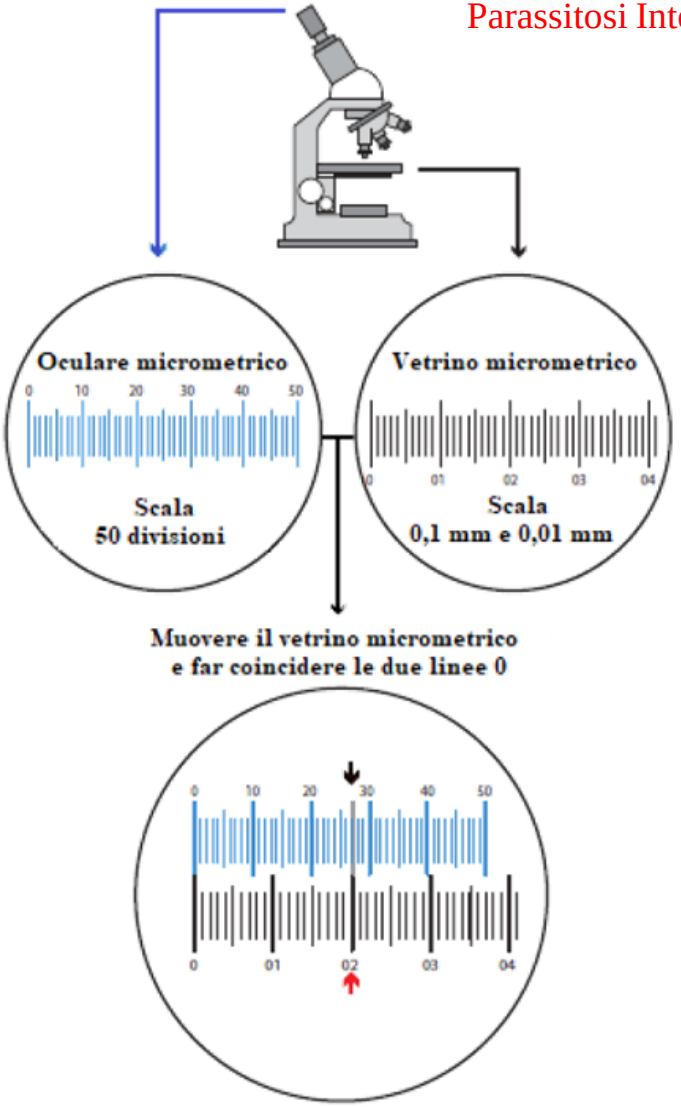
OCULARE MICROMETRICO

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.

Vedi Percorso diagnostico Parassitosi Intestinali

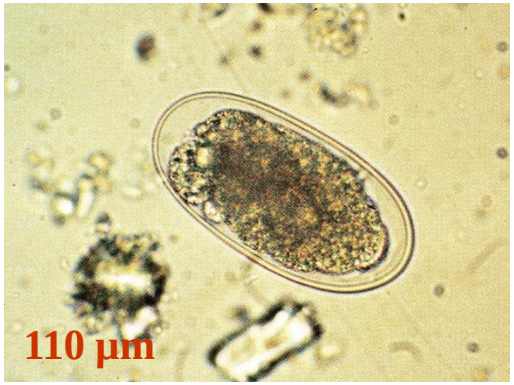
1. Togliere uno dei due oculari del microscopio e sostituirlo con l'oculare micrometrico.
2. Porre il vetrino micrometrico sul piano traslatore del microscopio.
3. Utilizzando l'obiettivo a piccolo ingrandimento (10x) mettere a fuoco la scala micrometrica incisa sul vetrino.
4. Agendo sul piano traslatore 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 è 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).
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 1000 = 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.



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

Importanza delle dimensioni

Ancylostoma/Necator spp

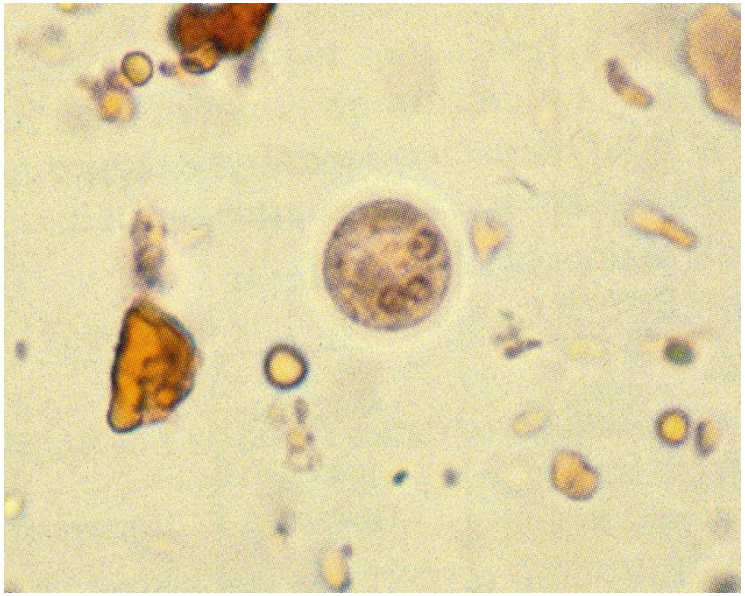


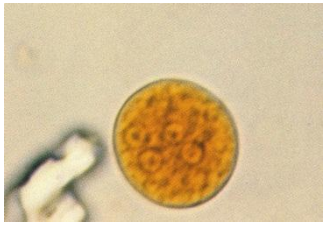
Trichostrongylus spp

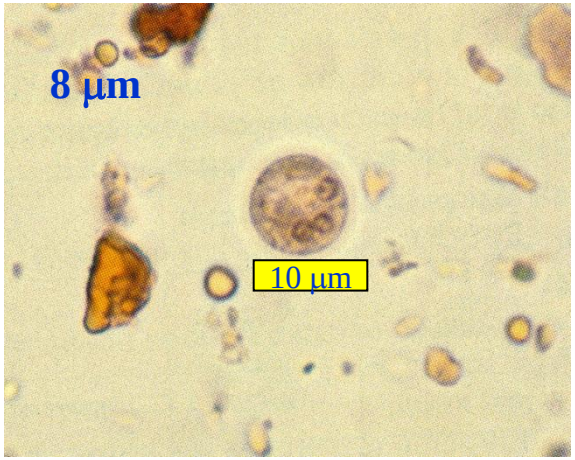
Trichuris trichiura (55 µm)
Trichuris vulpis (75 µm)

AMCLI associazione microbiologi clinici italiani

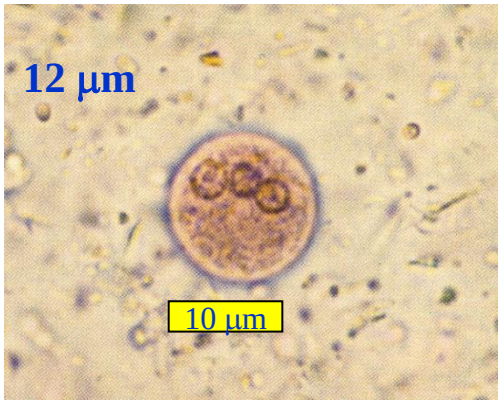
Importanza delle dimensioni



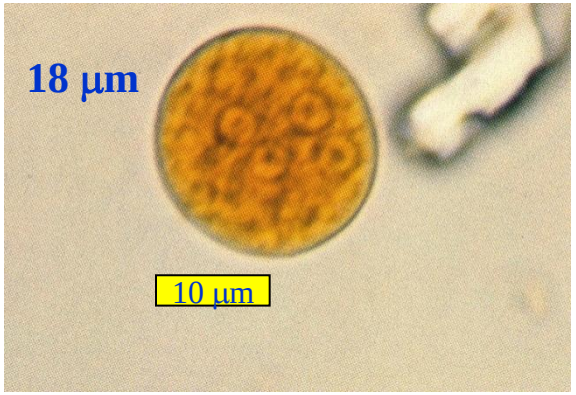




E. hartmanni



E. histolytica/dispar



E. coli

AMCLI associazione microbiologi clinici italiani

Azienda Ospedaliero Universitaria Careggi

Servizio Sanitario della Toscana

GRAZIE PER L'ATTENZIONE

associazione microbiologi clinici italiani

Ente del Terzo Settore

Comitato di Studio per la Parassitologia