

Metodologie di riconoscimento e di evidenziazione delle Candide nei tessuti animali

ENNIO PALLIOLA (a), SIMONETTA PESTALOZZA (a), LORENZO TUTTOBELLO (b),
GIOVANNI ANTONUCCI (a) e CLAUDIA PISTOIA (a) (*)

(a) Laboratorio di Veterinaria

(b) Servizio Biologico

INTRODUZIONE

Le Candidiasi e le forme morbose imputabili a lieviti (*Torulopsis*, *Rhodotorula* ecc.), sono in aumento per una lunga serie di motivi che possono attribuirsi all'indebolimento dell'ospite e/o alla virulentazione del parassita, come: terapie intense e prolungate con antibiotici; l'uso, spesso sconsigliato, di cortisonici; l'impiego dei contraccettivi orali; l'aumento del diabete mellito tra le popolazioni civili; i trapianti d'organo; l'emodialisi; l'aumento e l'abuso di alimentazione per via parenterale; i tumori nelle loro varie forme e terapie (immunosoppressori, radiazioni) ecc. Tra i numerosissimi reperti umani di Candidiasi, riportati in letteratura, risulta che la *C. albicans* [1] diminuisce in percentuale rispetto alle altre Candide considerate opportuniste, per cui abbiamo affrontato il problema della dimostrazione sperimentale della patogenicità dei lieviti, riferibili al genere *Candida*, anche in considerazione della eventuale produzione di massicce quantità di Candide cresciute su n-alcani da usare nell'alimentazione del bestiame. Tale produzione potrà comportare una serie di problemi a livello zootecnico, ecologico-ambientale e delle zoonosi, da non sottovalutare.

Per le Candide patogene, o supposte tali, sono stati sperimentati animali, dosi e vie di inoculazione diverse [2-9]: conigli inoculati in vena auricolare, cavie inoculate per via endoperitoneale ed in vena femorale, gerbilli inoculati in vena femorale, pulcini inoculati in vena alare, embrioni di pollo inoculati in sacco vitellino, topini inoculati in vena caudale. La migliore risposta è stata ottenuta, per i tipi di Candide da noi sperimentate, con i topini, che offrono inoltre i vantaggi di essere gli animali più economici, più facilmente trattabili, più omogenei e con maggiori possibilità di repliche.

(*) Borsista del Laboratorio di Veterinaria.

È stato altresì necessario trovare un metodo di colorazione istochimica, tra i tanti riportati in letteratura per individuare i miceti nei tessuti, che rispondesse all'esigenza di una semplice e rapida esecuzione e della possibilità di evidenziare sia la presenza dei lieviti nei tessuti in esame che le eventuali lesioni ed alterazioni di tipo infiammatorio e/o degenerativo da essi causate. Sono stati presi in esame i metodi: Ematossilina-Eosina, p.a.S., Hotchkiss Mc-Manus, Grocott, Pickett, Kelly, Gridley, Van Gieson, apportando a volte alcune modifiche. Alla fine delle esperienze per i risultati ottenuti, e come verrà meglio chiarito più avanti, si è proposto il metodo p.a.S. associato a quello di Van Gieson.

MATERIALI E METODI

A) Conservazione delle colture

Le *Candida*, di isolamento o di collezione, vengono conservate in più modi:

- 1) in provette di agar patata (*) e agar malto (**) chiuse con tappo a vite e tenute in frigorifero a $+ 7^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$;
- 2) in boccette di agar patata e agar malto interamente ricoperte con olio di vasellina sterile tenute a temperatura ambiente;
- 3) in sospensione in provette con acqua sterile, chiuse ermeticamente con tappo di gomma e tenute in frigorifero a $+ 7^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$;
- 4) in provette di agar malto con tappo di cotone a temperatura ambiente.

Si ricorda che mentre nei primi tre casi la sopravvivenza è assicurata per almeno due anni, nell'ultimo caso è necessario effettuare passaggi delle colture almeno ogni due mesi.

B) Preparazione delle colture per gli inoculi

Le *Candida*, comunque conservate, vengono passate in provette di agar malto e tenute due giorni in incubazione a 27°C . Con una ansata di queste

(*) Agar patata: 200 g di patate sbucciate e spaccate in quattro si fanno bollire per 30 min in 1 l di H_2O distillata. Si filtra per garza e cotone, si aggiungono 20 g di glucosio, si porta a volume con H_2O distillata, si corregge se necessario a pH 6,0. Si aggiungono 20 g di agar. Si sterilizza 20 min a vapore fluente e 20 min a 120°C .

(**) Agar malto:

estratto di malto (Difco)	g/l	20
peptone	»	1
glucosio	»	20
agar	»	20

Si corregge se necessario a pH 6,0. Si sterilizza 20 min a vapore fluente e 20 min a 120°C .

culture si seminano beute Erlenmeyer, da 500 ml contenenti 100 ml di brodo nutritivo glucosato, che vengono poste in agitatore rotatorio (200 giri/min) per 24 h a 27 °C. Le cellule delle brodo culture, in avanzata fase logaritmica e, nella maggior parte dei casi, in forma Y (= yeast), dopo opportuna diluizione con acqua o, indifferentemente, con soluzione fisiologica, si contano facilmente in camera di Thoma-Zeiss. Più volte la conta è stata fatta parallelamente col metodo delle diluizioni seriali in piastre di agar malto .. (in triplo o in quadruplo), incubate fino a 4 gg a 27 °C prima della conta definitiva delle colonie. Lo scarto tra la conta microscopica e la conta microbiologica su piastra è del 2-3 %, nel senso che sono più le cellule contate al microscopio che le colonie contate su piastra. Tenendo conto di questo piccolo errore che si compie nella conta microscopica immediata, si sono allestite opportune diluizioni, con acqua o soluzione fisiologica, in modo da iniettare i topini in vena caudale con quantità variabili di cellule da 10 a 100 milioni.

Nella maggioranza delle esperienze si è usata la dose di $2,5 \times 10^7$ cellule, sufficiente per causare candidiasi sistemiche, invasione di organi, fino a morte (da qualche giorno a qualche settimana a seconda del ceppo) nei topini inoculati con *C. albicans* e *C. tropicalis*; o per avere una certa percentuale di mortalità con *C. stellatoidea* o comunque per evidenziare danni, forme salutarie M (= mycelial) o colonizzazione in forma Y o commensalismi prolungati con altre specie.

C) Stabulazione

I topini di razza Swiss-albini vengono messi a stabulare, randomizzati, in gabbiette di plastica a cestello (in Plexiglass con coperchio in acciaio inossidabile), suddivisi in maschi e femmine, di 6-7 settimane d'età e di peso medio compreso tra 20-25 g.

L'alloggiamento degli animali è distinto in gruppi di cinque soggetti per gabbietta, con lettiera di segatura di pioppo deresinata ad alta temperatura, depolverizzata e sterile. Per una maggiore sicurezza la lettiera viene sostituita con frequenza settimanale, anziché ogni tre settimane come consigliato dalla Ditta fornitrice. Le gabbiette sono sistemate in un castello di ferro, posto in una camera a ventilazione forzata, a temperatura costante (22 °C), ad umidità costante e ad illuminazione naturale attenuata.

D) Alimentazione

L'alimentazione è uguale per tutti gli animali ed è costituita da un mangime composto, integrato, sotto forma di pellets, preparato dalla Ditta

Mill su formula del Laboratorio di Veterinaria dell'Istituto Superiore di Sanità ed avente, all'analisi chimica, la seguente composizione:

estrattivi inazotati	26,50 %
lipidi	4,50 %
fibra grezza	4,50 %
cenere	6,50 %

Il mangime e l'acqua rimangono a disposizione degli animali *ad libitum*.

E) Esame clinico ed ispettivo

Dal lato clinico i topini vengono seguiti, una volta al giorno, con attento esame obiettivo della sintomatologia. I soggetti trovati morti, durante l'ispezione, vengono sottoposti immediatamente ad un accurato esame autoptico ed al prelievo degli organi, secondo un elenco riportato più avanti.

F) Abbattimento

L'abbattimento degli animali viene compiuto, seguendo i tempi stabiliti dal programma, mediante eutanasia. Il metodo prescelto è quello suggerito dall'UFAW (Universities Federation for Animal Welfare) che provoca la morte indolore [10]. Il prelievo del sangue, per gli esami emato-chimici viene effettuato immediatamente prima dell'abbattimento del topino mediante puntura della vena orbitale dell'angolo interno dell'occhio, con pipetta Pasteur [11].

G) Necropsia ed esame anatomo-patologico

La necropsia degli animali si effettua su tavolette per dissezione «Fupoicel» [12], costituite da materiale plastico, consistente ma sufficientemente poroso, facilmente sterilizzabile sia ad alta temperatura che con detergenti chimici. La necropsia degli animali è sempre completa e riguarda sia gli organi della cavità addominale che quelli della cavità toracica ed endocranica, dando sempre la precedenza al prelievo del cervello.

L'osservazione e la descrizione anatomo-patologica degli organi è riportata, per ogni singolo animale, su un registro delle necropsie su cui si trascrive, in seguito, anche la diagnosi isto-patologica di ogni organo. La necropsia viene eseguita con le normali cautele e regole di asepsi per permettere il reisolamento di eventuali *Candida* presenti negli organi e per cautelare lo stesso perito settore. La tecnica seguita è quella che si può trovare descritta in un qualsiasi manuale di necropsia.

H) *Prelievo organi*

A tutti gli animali vengono prelevati, sempre in cella sterile con bisturi e pinzette risterilizzati ad ogni prelievo di organo mediante lavaggio in alcool e flambaggio al Bunsen, i seguenti cinque organi: fegato, milza, rene, polmoni e cervello, perché da nostre precedenti esperienze [2-5, 7-9] si è constatato che rene e cervello sono generalmente gli organi bersaglio per la presenza di *Candida* mentre gli altri, pur non avendo sempre presenza di lieviti, rivelano spesso lesioni. Su questi organi viene eseguito sia l'esame colturale che quello istologico ed istochimico.

1) *Esame microbiologico degli organi degli animali morti o abbattuti*

È necessario, per evitare interpretazioni errate di false diagnosi di candidiasi, procedere ad una indagine microbiologica degli organi esaminati istologicamente ed istochimicamente. Essendo gli animali di piccola mole e risultando spesso molto esiguo il materiale da controllare, è preferibile piastrare direttamente le parti di organo, servendosi di pinzette e bisturi sterili, in agar malto per gli animali abbattuti, ed anche in agar mycosel (*) antibiotato nel caso di animali morti; le piastre vengono poste due giorni in termostato a 37 °C e due giorni a 27 °C.

Tale metodo, pur non permettendo di determinare con precisione il numero di *Candida* presenti, dà tuttavia una misura quantitativa sufficientemente valida dell'invasione degli organi e la certezza della presenza anche minima dei lieviti. Lo sviluppo delle *Candida* viene così indicato:

- + qualche colonia per piastra;
- ++ 20-40 colonie per piastra;
- +++ intorno a 100 colonie per piastra;
- ++++ un numero non facilmente determinabile (200-400) di colonie per piastra;
- +++++ una patina.

In altri casi, per studi patogenetici e per evidenziare gli effetti di sostanze stressanti o defedanti, è necessario provvedere alla conta dei lieviti nei singoli

(*) Agar Mycosel:

peptone	g/l	10
glucosio	»	10
agar	»	16
ciclo esimide	»	0,4
cloramfenicolo	»	0,05

Si corregge se necessario a pH 7,0. Si sterilizza per 15 min a 105 °C. Le piastre si preparano subito in fase di raffreddamento dell'agar.

organi. Si preferisce esprimerli in CFU (unità formanti colonie) per 100 mg di organo. Si procede pesando sterilmente il campione, pestando e strusciando a secco l'organo su un mortaio sterile. Dopo di che si aggiunge soluzione fisiologica in modo da avere una diluizione iniziale 1 : 50 (p/v) da cui si parte, per le successive diluizioni seriali fino a valori di 10^6 , se si debbono contare le *Candida* nel rene e nel cervello. Si piastra 1 ml di ogni diluizione in triplo in agar malto e si può procedere alla conta delle CFU dopo due giorni di incubazione a 37 °C ed altri due giorni a 27 °C.

L) Identificazione e conferma di specie

Sia nel primo caso (colonie di *Candida* ottenute per piastramento di parti di organo), che nel secondo caso (colonie ottenute per diluizione) si procede all'isolamento in provette di agar malto e da queste colture si parte per la identificazione e la successiva conferma.

È necessario usare una serie di terreni in provette da batteriologia sterilizzati tutti 20 min a vapore fluente e 15 min a 110 °C. Per le prove di fermentazione si preparano provette con campanelle di Durham nel seguente terreno base: peptone 10 g/l; acas (Costantino) 10 g/l; NaCl 5 g/l, a cui vengono aggiunti glucosio, saccarosio, galattosio, maltosio, lattosio, raffiniosio in ragione di 20 g/l. La lettura può iniziare dopo tre gg di incubazione a 27 °C e può prolungarsi fino a due settimane.

I terreni culturali per le prove di assimilazione sono stati preparati con tecnica diversa da quella indicata da Wickerham [13]; seguendo i suggerimenti semplificativi di Van der Walt [14] si preparano provette a becco di clarino con Yeast nitrogen base (Difco) 7 g/l, 20 g/l agar Difco ed aggiunta di glucosio, saccarosio, galattosio, maltosio, lattosio, raffiniosio, amido solubile, eritritolo in ragione di 10 g/l.

Il terreno per la prova di assimilazione dei nitrati si prepara con 11,7 g/l di Yeast carbon base (Difco), 10 g/l di KNO_3 , 20 g/l di agar Difco.

Per il test di scissione dell'arbutina si prepara un terreno con estratto di lievito 10 g/l, arbutina 5 g/l, agar 20 g/l; subito dopo la sterilizzazione si aggiungono ad ogni provetta due gocce di $FeCl_3$ al 5 %.

Per lo studio morfologico e per evidenziare le clamidospore, con la tecnica delle « slide cultures », si usa il corn meal agar Difco (*), distribuito in strato sottile su vetrino portaoggetti in camera umida sterile (secondo la tecnica di Rivalier e Seydel [15] o in capsule Petri, con vetrino coprioggetti sterile deposto sopra una parte dello striscio della coltura (secondo la tecnica di Dalmau [16]).

(*) Indifferentemente, in mancanza di questo, si può usare rice extract agar (Difco) o agar patata glucosio 2 %.

Le prove di conferma per l'identificazione sono necessariamente molto semplificate e generalmente più veloci rispetto a quelle di identificazione *ex novo*. Per quanto riguarda le *Candida* da noi sperimentate, la prima chiave da usare è quella del « germ tube test ». La prova viene compiuta incubando per 3 h in bagnomaria a 37 °C in provette da sierologia 0,5 ml di siero normale sterile di cavallo (Sclavo) inoculato con 0,1 ml di una sospensione della coltura in esame (10^6 cellule contate in camera di Thoma). La tubulazione in queste condizioni è evidente ad una osservazione microscopica per *C. albicans* e *C. stellatoidea*.

L'assimilazione del saccarosio, negativa per *C. stellatoidea*, è poi sufficiente per distinguere le due specie. Per le altre *Candida* si procede inizialmente all'osservazione delle « slide cultures » molto indicativa ma non probante. Poi, a seconda della *Candida* isolata da reidentificare, si compiono alcuni tests particolari, e non necessariamente tutti quelli indicati dalla Tab. 1; per la riconferma di *C. utilis*, per es. è sufficiente compiere le prove di assimilazione dei nitrati e di idrolisi dell'arbutina; per la riconferma di *C. lipolytica*, che non fermenta zuccheri, basta avere positiva la prova di assimilazione dell'eritritolo per distinguerla da *C. zeylanoides*.

Per *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. pseudotropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, può essere sufficiente la serie ridotta a 6 zuccheri delle prove di fermentazione. Talvolta alcuni ceppi di *C. parapsilosis* possono fermentare solo glucosio, per cui risulterebbero biochimicamente indistinguibili da *C. krusei*; è sufficiente allora procedere alle prove di assimilazione di glucosio, saccarosio, galattosio, maltosio: la *C. krusei* assimila solo glucosio.

Per quanto riguarda la *Candida* ATCC 20275, l'unico dato che la può distinguere dalla *C. tropicalis* è la prova di assimilazione dell'amido solubile; ma poiché in terreni agarizzati con amido si possono avere false crescite, e quindi responsi discutibili, è necessario, solo in questo caso, seguire la tecnica di Wickerham che prevede una coltura in beute agitate in due stadi [13].

M) Materiali e metodi istologici ed istochimici

1) Fissazione.

Immediatamente dopo il prelievo, gli organi vengono fissati in formalina salata di Policard (aldeide formica al 40 % 100 ml; NaCl 8,5 gr; H₂O distillata 900 ml). Si è scelto questo fissativo perché permette di eseguire tutte le colorazioni istochimiche usate nelle diagnosi dei miceti, è di facile preparazione ed è quello più comunemente usato, oltre che nei laboratori di ricerca, anche negli ospedali. I tessuti così fissati possono essere conservati a lungo. Il volume del fissativo deve essere almeno 20 volte quello del campione, il cui spessore non deve essere superiore a 0,5 cm per permettere una adeguata penetrazione del fissativo. Il campione deve rimanere nel fissativo per almeno

TABELLA I

Tabella di caratterizzazione delle Candide sperimentate

C E P P O	FERMENTAZIONE						ASSIMILAZIONE									
	Glucosio	Saccarosio	Galattosio	Maltosio	Lattosio	Raffinosio	Glucosio	Saccarosio	Galattosio	Maltosio	Lattosio	Raffinosio	Amido solubile	KNO ₃	Arbutina	Eritritolo
C. albicans	+	— (*)	+	+	—	—	+	+	+	+	—	—	+	—	—	+
C. stellatoidea	+	—	— (*)	+	—	—	+	—	+	+	—	—	+	—	—	+
C. tropicalis	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	—	—	+	—	—	—
C. krusei	+	—	—	—	—	—	+	—	—	—	+	—	—	—	—	—
C. pseudotropicalis	+	+	+	—	+	+	+	+	+	—	+	+	—	—	—	—
C. guilliermondii	+	+	+	—	—	—	+	+	+	+	—	+	—	—	+	—
C. parapapilosis	+	—	—	—	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—
C. zeylanoides	— (*)	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—
C. lipolytica	—	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+	—
C. utilis	+	+	—	—	—	+	+	+	—	—	—	+	—	+	—	—
C. ATCC 20275	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—

(*) Bolla talvolta.
(**) Talvolta può essere debole-negativa.

24-48 h, dopodiché può essere conservato nel tempo aggiungendo però, alla soluzione prima detta, 4 g di fosfato di sodio monobasico e 6,5 g di fosfato di sodio bibasico anidro per tamponare la formalina. Prima di procedere all'allestimento del preparato istopatologico, il campione viene lavato per 24 h in acqua corrente per eliminare la formalina.

2) *Disidratazione, chiarificazione e inclusione.*

La disidratazione e la chiarificazione vengono eseguite con inclusore automatico Italglas, usando, al posto dei liquidi tradizionali (alcool e xilolo), le miscele disidratanti e chiarificanti della ditta Technicon.

I tempi di permanenza in queste miscele variano in funzione dello spessore del preparato e del suo grado di idratazione (*).

Dopo aver eseguito l'inclusione in paraffina a p.f. 58°-60 °C i campioni vengono tagliati con microtomo Jung e per ogni pezzo vengono raccolte su vetrini portaoggetto diverse sezioni dello spessore di circa 5-6 μ .

3) *Metodi di colorazione istologica.*

Ematossilina-Eosina. — Soluzioni: Eosina bluastra all'1 % in soluzione acquosa (aggiungere al momento dell'uso 2 gocce di acido acetico glaciale per mordenzare la soluzione). Emallume di Mayer: si sciolgono a caldo in mezzo litro di H₂O distillata 1 g di ematossilina e 50 g di allume di potassio. Quando la soluzione si è raffreddata si aggiungono 0,20 g di iodato di sodio sciolto in 50 ml di H₂O distillata, 50 g di cloralio idrato e 1 g di acido citrico sciolti insieme in 450 ml di H₂O distillata. Dopo circa un'ora si filtra e la soluzione è pronta per l'uso.

Procedura:

- 1) sparaffinare ed idratare le sezioni fino all'H₂O distillata;
- 2) emallume 5 min;
- 3) acqua corrente 10 min;
- 4) eosina 1 min;
- 5) lavaggio rapido in H₂O distillata;
- 6) disidratare, chiarificare e montare.

Risultati: citoplasma rosa, nucleo blu.

Considerazioni: questa colorazione è la più usata dagli istologi per la facilità di preparazione e la rapidità di esecuzione. Evidenzia bene le lesioni istopatologiche del tessuto in esame ma non colora affatto gli eventuali miceti presenti.

(*) Per un campione di 2 mm di spessore, i tempi adoperati sono: 8 h in alcool 80°, 1 h ciascuno nei 5 disidratanti, 1 h ciascuno nelle due miscele disidratante / chiarificante (1/1), 2 h nel chiarificante puro, 2 h ciascuno nelle due paraffine a p. f. 58°-60 °C.

4) Metodi di colorazione istochimica.

Metodo Hotchkiss-Mc Manus [17]. — Soluzioni: acido periodico all'1 % in soluzione acquosa. Reattivo di Schiff: pestare finemente in un mortaio 1,5 g di fucsina basica; aggiungere 200 ml di H₂O distillata; lasciare sciogliere e filtrare; aggiungere 3 g di metabisolfito di potassio; sciogliere e filtrare; aggiungere 3 ml di acido cloridrico concentrato e 30 ml di acido cloridrico 1 N; aggiungere 0,50 g di carbone attivo; agitare per 1 minuto e filtrare; conservare in una bottiglia piena fino al collo, al buio e a 4 °C. Differenziatore: potassio metabisolfito al 10 % in soluzione acquosa 5 ml, acido cloridrico normale 5 ml, H₂O distillata 100 ml. Verde luce: verde luce 0,2 g, H₂O distillata 100 ml e acido acetico glaciale 0,2 ml.

Procedura:

- 1) sparaffinare ed idratare le sezioni fino all'H₂O distillata;
- 2) ossidare in acido periodico per 5 min;
- 3) acqua corrente 15 min;
- 4) reattivo di Schiff da 15 min a 1 h;
- 5) differenziatore, 2 cambi per un totale di 5 min;
- 6) acqua corrente 10 min;
- 7) verde luce 3-5 min. Se troppo scuro, lavare in acqua corrente.
- 8) disidratare, chiarificare e montare.

Risultati: miceti in rosso, fondo verde chiaro.

Considerazioni: questo metodo mette chiaramente in evidenza la presenza delle Candida nel tessuto, ma il verde luce che dà la colorazione di fondo non permette di distinguere le alterazioni, sia a livello cellulare che connettivale o addirittura cellule di richiamo linfoistiocitario, eventualmente presenti (Fig. 1). Inoltre, per meglio favorire la penetrazione del reattivo di Schiff attraverso la parete cellulare dei lieviti, è consigliabile, secondo gli AA., prolungare il tempo di ossidazione dell'acido periodico fino a 15 min.

Metodo al nitrato di argento metenamina di Gomori modificato da Grocott [18]. — Soluzioni: nitrato di argento metenamina. Soluzione madre: nitrato di argento al 5 % 5 ml e metenamina (esametilentetramina) al 3 % 100 ml; soluzione d'uso: borace al 5 % 2 ml, H₂O distillata 25 ml e soluzione madre di nitrato di argento metenamina 25 ml. Verde luce allo 0,2 %.

Procedura:

- 1) sparaffinare ed idratare le sezioni fino all'H₂O distillata;
- 2) ossidare con acido periodico allo 0,5 % 10 min;
- 3) lavare in acqua corrente 3 min;
- 4) ossidare in acido cromico al 5 % 45 min;

- 5) lavare in acqua corrente 2 min;
 - 6) sodio bisolfito al 2 % (per eliminare l'acido cromico) 1 min;
 - 7) lavare in acqua corrente 5 min;
 - 8) sciacquare in H₂O distillata 2-3 cambi per un totale di 5 min;
 - 9) soluzione nitrato di argento metenamina 60 min circa a 58 °C.
- Controllare la colorazione al microscopio: i miceti devono apparire neri;
- 10) lavare in H₂O distillata diverse volte;
 - 11) cloruro d'oro 0,1 % (le sezioni virano al grigio porpora);
 - 12) sciacquare con H₂O distillata;
 - 13) fissare con tiosolfato di sodio al 5 % 3 min;
 - 14) colorazione di contrasto con verde luce 30 sec;
 - 15) disidratare, chiarificare e montare;

Risultati: miceti marrone scuro, fondo verde chiaro.

Considerazioni: il metodo Grocott permette una rapida visualizzazione delle Candida nelle sezioni di organo, ma come il precedente non consente di rilevare eventuali reazioni del tessuto in esame (Figg. 2 e 3). Inoltre, la preparazione delle soluzioni ed il tempo di esecuzione della colorazione sono piuttosto lunghi; pertanto, gli AA. ritengono che il suddetto metodo sia tra i meno indicati per una rapida diagnosi istologica.

Metodo Gridley [19]. — Soluzioni: acido cromico al 4 % in soluzione acquosa. Reattivo di Schiff. Differenziatore. Fucsina paraldeide: fucsina basica 0,5 g, alcool etilico 70 % 100 ml, paraldeide 0,75 ml, acido cloridrico concentrato 1,25 ml. Giallo metanile: giallo metanile 0,25 g, H₂O distillata 100 ml e acido acetico glaciale 2 gocce.

Procedura:

- 1) sparaffinare ed idratare le sezioni fino all'H₂O distillata;
- 2) ossidare in acido cromico 1 h;
- 3) acqua corrente 5 min;
- 4) reattivo di Schiff da 15 min ad 1 h;
- 5) sciacquare nel differenziatore, 3 cambi per un totale di 5 min;
- 6) acqua corrente 15 min;
- 7) fucsina paraldeide da 15 a 30 min;
- 8) eliminare l'eccesso di colorante con alcool 95 %;
- 9) lavaggio in acqua corrente;
- 10) colorazione di contrasto con giallo metanile 1 min;
- 11) lavaggio in acqua corrente;
- 12) disidratare, chiarificare e montare.

Risultati: lieviti dal rosa scuro al porpora, miceli blu scuro, fondo giallo.

Considerazioni: il metodo è molto lungo ed indaginoso. Inoltre, l'ossidazione effettuata secondo la metodica, è spesso insufficiente a favorire la penetrazione del reattivo di Schiff, in quanto l'acido cromatico è un ossidante molto più debole dell'acido periodico, abitualmente usato nella colorazione p.a.S. (periodic acid Schiff).

Metodo metacromatico [20]. — Soluzioni: acido solforico concentrato-etero dietilico 1:1. Blu di toluidina allo 0,01 % in acido acetico al 3 %.

Procedura:

- 1) sparaffinare le sezioni e metterle in alcool assoluto;
- 2) asciugare le sezioni all'aria 5-10 min;
- 3) acido solforico/etero dietilico 5 min;
- 4) lavare in acido acetico al 3 %;
- 5) blu di toluidina 5 min;
- 6) lavare in acido acetico al 3 % 1 min;
- 7) disidratare in alcool assoluto 1 min;
- 8) chiarificare e montare.

Risultati: miceti rosso-violaceo, fondo blu pallido.

Considerazioni: è noto che i miceti possiedono gruppi 1,2 glicol ($-\text{CHOH}-\text{CHOH}-$) che vengono esterificati dall'acido solforico in gruppi estere-solfato ($-\text{OSO}_3$) che reagiscono metacromaticamente con il blu di toluidina. Le Candidae vengono, quindi, identificate con questo metodo (Figg. 4 e 5). La difficoltà consiste, però, nel conservare a lungo le sezioni così colorate, in quanto la disidratazione tende a far virare nuovamente il colore verso l'ortocromatico.

Metodo alla fluorescenza [21]. — Soluzioni: arancio di acridina allo 0,1 % in soluzione acquosa. Ematossilina di Weigert.

Procedura:

- 1) sparaffinare ed idratare le sezioni fino all' H_2O distillata;
- 2) ematossilina di Weigert 5 min;
- 3) sciacquare in acqua corrente 5 min;
- 4) arancio di acridina 2 min;
- 5) sciacquare in H_2O distillata 30 sec;
- 6) disidratare in alcool 95 % 1 min;
- 7) disidratare in alcool assoluto, 2 cambi per un totale di 3 min;
- 8) chiarificare in xilolo, due cambi per un totale di 3 min;
- 9) montare in mezzo non fluorescente.

Risultati: Candidae con fluorescenza giallo-verde.

Considerazioni: questo metodo è di facile preparazione ed esecuzione. Le Candidi mostrano una fluorescenza brillante e quindi si visualizzano particolarmente bene sul fondo scuro (Fig. 6). L'ematossilina di Weigert permette di distinguere il tessuto, ma non è sufficiente a rivelarne eventuali alterazioni. Inoltre, gli inconvenienti di questa metodica consistono nel dover disporre di un microscopio a fluorescenza e nella necessità di fotografare immediatamente le sezioni in quanto, per un noto fenomeno fisico-chimico, la fluorescenza si attenua nel tempo fino a scomparire completamente.

Metodo p.a.S. associato al metodo Van Gieson. — Soluzioni: acido periodico all'1 %. Reattivo di Schiff. Differenziatore. Ematossilina di Weigert; soluzione A: soluzione acquosa al 48 % di cloruro ferrico 4 ml, acido cloridrico 1 ml e H₂O distillata 95 ml; soluzione B: ematossilina 1 g e alcool 95 % 100 ml; al momento dell'uso si mescolano le due soluzioni in egual volume. Soluzione Van Gieson: soluzione acquosa satura di acido picrico 100 ml e fucsina acida all'1 % 10 ml.

Procedura:

- 1) sparaffinare ed idratare le sezioni fino all'H₂O distillata;
- 2) acido periodico 15 min;
- 3) acqua corrente 15 min;
- 4) reattivo di Schiff da 15 min a 1 h;
- 5) differenziatore, 2 cambi per un totale di 5 min;
- 6) acqua corrente 10 min;
- 7) lavaggio rapido in H₂O distillata;
- 8) ematossilina di Weigert 5 min;
- 9) acqua corrente 10 min;
- 10) soluzione Van Gieson 2 min;
- 11) lavaggio rapido in H₂O distillata;
- 12) disidratare, chiarificare e montare.

Risultati: nuclei neri, citoplasma rosa aranciato, connettivo rosso porpora, Candidi rosso violaceo.

Considerazioni: gli AA., constatati gli inconvenienti che ciascuna metodica sopracitata presenta, hanno adottato l'associazione, in un unico metodo di una reazione istochimica (p.a.S.) con una colorazione istologica (Van Gieson). Questa associazione consente di rilevare contemporaneamente e con molta chiarezza sia le Candidi che le eventuali alterazioni istopatologiche di tipo degenerativo e/o reattivo nel tessuto in esame [Fig. 7-12]. Si è rivelata, in effetti, una tecnica semplice, di rapida esecuzione che permette anche di conservare nel tempo i preparati.

CONCLUSIONI

Gli AA. ritengono che questa nota (scaturita da numerose esperienze e approfondite ricerche bibliografiche) possa fornire una guida valida e sufficientemente semplice a coloro (medici, veterinari, analisti, ecc.) che si trovassero nella necessità di affrontare il problema della identificazione di specie diverse di *Candida*, isolate da reperti umani o animali.

Lo schema metodologico presentato potrà inoltre essere utile per stabilire, a priori, se un lievito da utilizzarsi in un ciclo produttivo possa presentare qualche indizio di patogenicità.

Appare anche importante sottolineare che il topino è risultato il più rispondente degli animali utilizzati per le sperimentazioni descritte. Resta tuttavia fuor di dubbio che coloro i quali volessero approfondire le proprie ricerche o si trovassero di fronte a specie di lieviti diversi da quelli presi in considerazione o, ancora, dovessero affrontare altre problematiche inerenti all'argomento, dovrebbero compiere esperienze analoghe anche su altri animali di laboratorio eventualmente rendendoli più sensibili all'infezione con diversi metodi quali l'uso di allossana, antibiotici, cortisonici, immuno-soppressori, radiazioni, timectomia, ecc.

Si ringraziano i sigg. Vincenzo Adriani e Mario Biancini per la valida ed efficace collaborazione prestata durante tutto lo svolgimento delle esperienze.

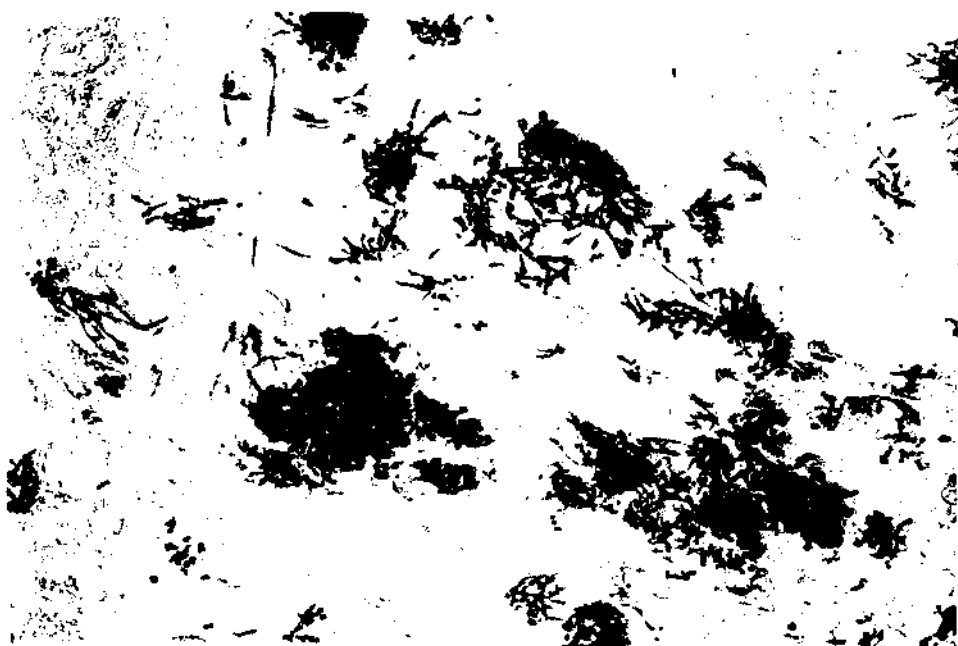
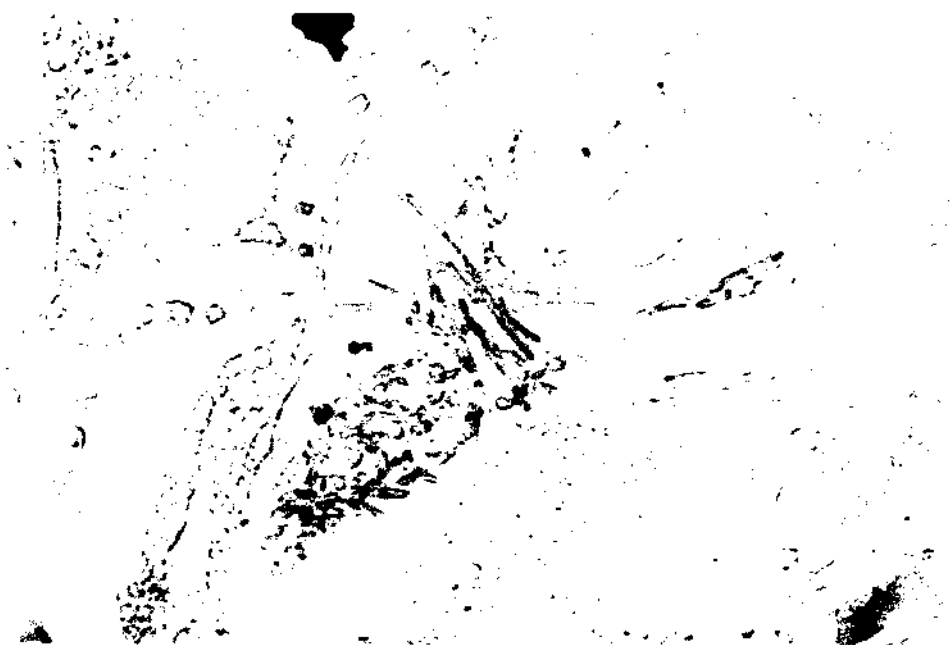
BIBLIOGRAFIA

1. WALCHER, I.J. & LUECKE, 1974. The identification of yeasts in clinical material. *Proc. IOWA Acad. Sci.* **81**.
2. TUTTOBELLO, L. & PALLIOLA, E. 1976. Esperienze preliminari sulla patogenicità di diverse specie di *Candida*. *Vet. Ital.* **15**: 35-37. (Tavola rotonda 1-2 giugno 1975).
3. TUTTOBELLO, L., PALLIOLA, E., & ANTONUCCI, G. 1975. Prove di patogenicità di alcune specie di *Candida*. *Atti Soc. Ital. Sci. Vet.* **29**: 658-664.
4. PESTALOZZA, S., COEN, R., TUTTOBELLO, L. & ANTONUCCI, G. 1976. Studio sulla presenza e diffusione di *C. tropicalis* inoculata endovena in organi di topino. *Atti Soc. Ital. Sci. Vet.* **30**: 548-550.
5. TUTTOBELLO, L., PALLIOLA, E., PESTALOZZA, S. & ANTONUCCI, G. 1976. Controllo di patogenicità su topino di *Candida* isolate da reperti umani. *Atti Soc. Ital. Sci. Vet.* **30**: 660-662.
6. ZAVATTIERO CASTAGNOLI, O., TUTTOBELLO, L. & PALLIOLA, E. 1976. Patogenicità sperimentale di *Candida* su uova embrionate. *Atti Soc. Ital. Sci. Vet.* **30**: 663-665.
7. TUTTOBELLO, L., FOGGINI, A., GRAMENZI, F., PISTOIA, C. & SIMONELLA, G. 1977. Prove di patogenicità di *Candida* in animali da laboratorio. *Giorn. Microbiol.* **25**: 169-170.

8. TUTTOBELLO, L., PALLIOLA, E. & PESTALOZZA, S. 1977. Patogenicità sperimentale di ceppi di *Candida tropicalis* su topini. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* **52**: 158-163.
9. PALLIOLA, E., PESTALOZZA, S., TUTTOBELLO, L., PICCININNO, G. & ANTONUCCI, G. 1977. Infezione sperimentale con *Candida* su topini cortisonizzati. *Atti Soc. Ital. Sci. Vet.* **31**: 799-801.
10. UFAW (*Humane Killing of Animals*). 1967. Pathers Bar, Herts, 230 High street—England.
11. STEVENIN, G. 1974. *Manuale del Tecnico di Laboratorio e del Tecnico Biochimico*. T.E.P. Vol. 1.
12. Fupoicel tavolette per dissezione. Ditta phi (Pool Bioanalysis italiana).
13. WICKERHAM, L.J. 1951. Taxonomy of yeasts. *Tech. Bull.* n. 1029. U.S. Dept. Agric. Washington D.C.
14. VAN DER WALT, J. P. 1970. Criteria and methods used in classification. In: *The yeast* Lodder, J. (Ed.) pp. 81-83 North Holland publ. Comp. Amsterdam.
15. RIVALIER, E. & SEYDEL, S. 1932. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* **10**: 444. In: *The yeasts*, Lodder, J. (Ed.), p. 45.
16. DALMAU, L.M. 1929. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* **7**: 536. In: *The yeasts*, Lodder, J. (Ed.), p. 42.
17. MC MANUS, J.F.A. 1948. Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technol.* **23**: 99-108.
18. GROCOTT, R.G. 1955. A stain for fungi in tissue section and smears, using Gomori's methenamine-silver nitrate method. *Am. J. Clin. Pathol.* **25**: 975-979.
19. GRIDLEY, M.F. 1953. A stain for fungi in tissue sections. *Am. J. Clin. Pathol.* **23**: 303-307.
20. KELLY, J.W., MORGAN, P.N. & S. NIRMAL S. 1962. Detection of tissue fungi by sulfation and metachromatic staining. *Arch. Pathol.* **73**: 70-73.
21. PICKETT, J.P., BISHOP, C.M., CHICK, E.W. & BAKER, R.D. 1960. A simple fluorescent stain for fungi. *Am. J. Clin. Pathol.* 197-202.

Fig. 1. — Metodo Hotchkiss-Mc Manus: *C. subtropicalis*- Rene - 400x.

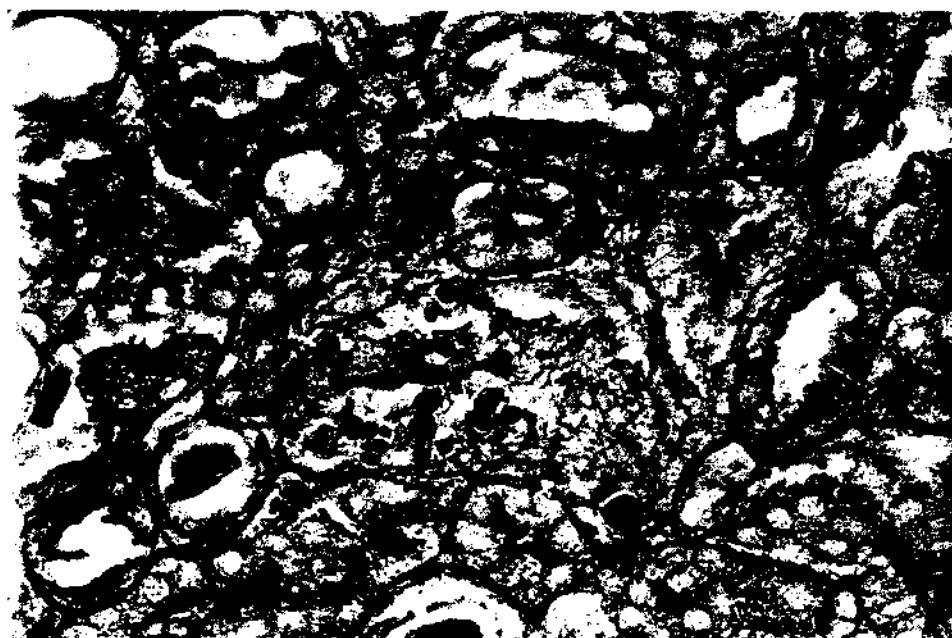
Fig. 2. — Metodo Grocott: *C. albicans*- Rene - 100x.



LIEVITI COLTIVATI SU N-ALCANI (BIOPROTEINE)

Fig. 3. — Metodo Grocott: *C. albicans*— Rene — 400x.

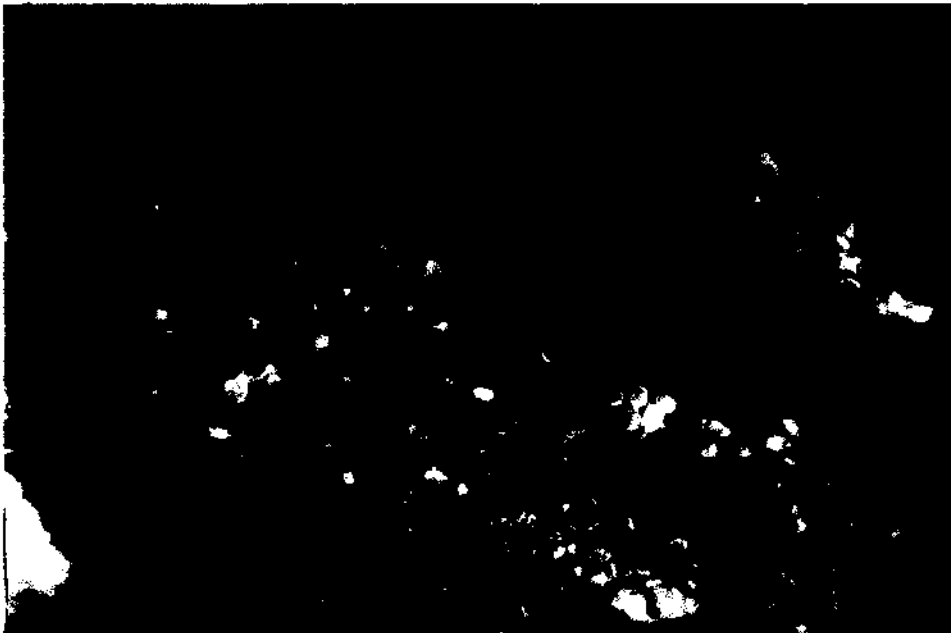
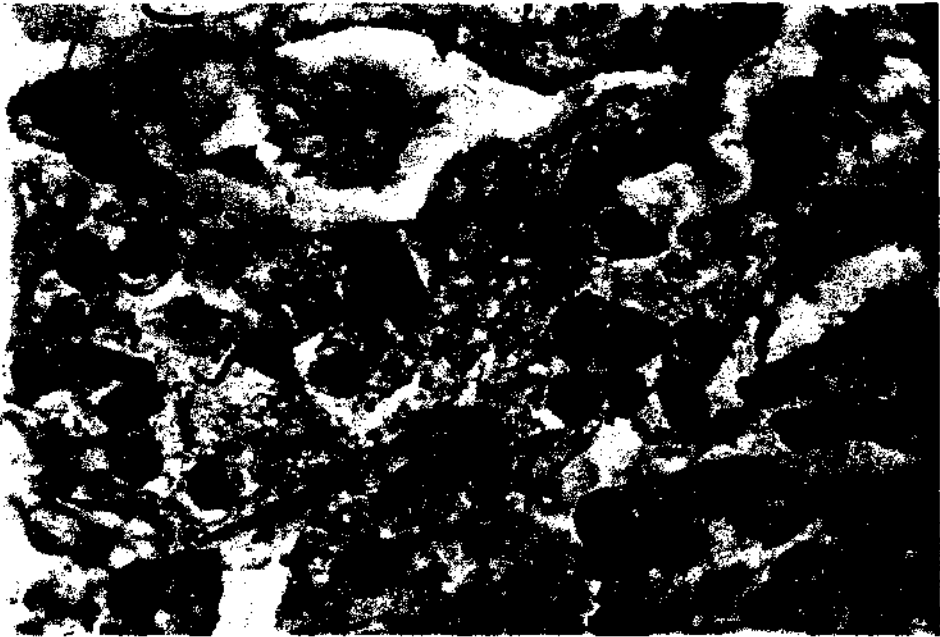
Fig. 4. — Metodo Kelly: *C. stellatoidea* — Rene — 400x.



LIEVITI COLTIVATI SU N-ALCANI (BIOPROTEINE)

Fig. 5. — Metodo Kelly: *C. albicans*— Rene — 1.000x.

Fig. 6. — Metodo Pickett: *C. subtropicalis* — Rene — 400x.



LIEVITI COLTIVATI SU N-ALCANI (BIOPROTEINE)

Fig. 7. — Metodo p.a.S. - Van Gieson: *C. subtropicalis* - Cervello - 100x.

Fig. 8. — Metodo p.a.S. - Van Gieson: *C. subtropicalis* - Cervello - 250x.

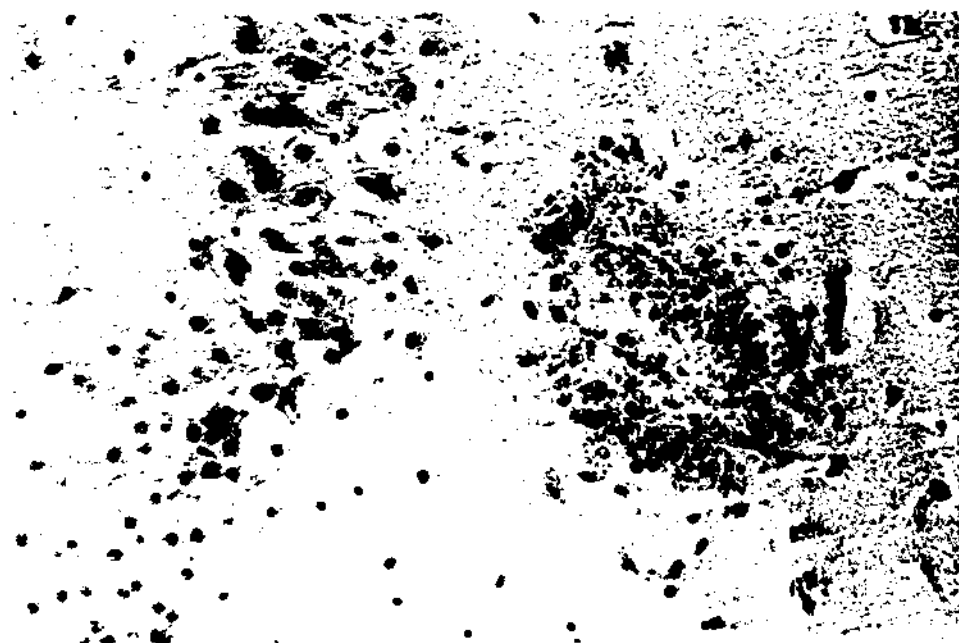
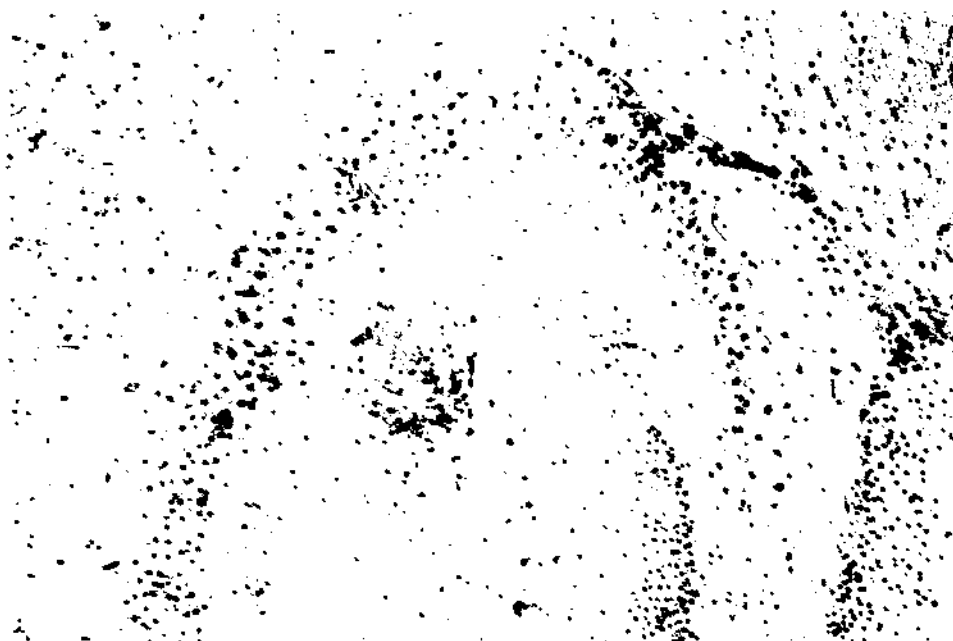
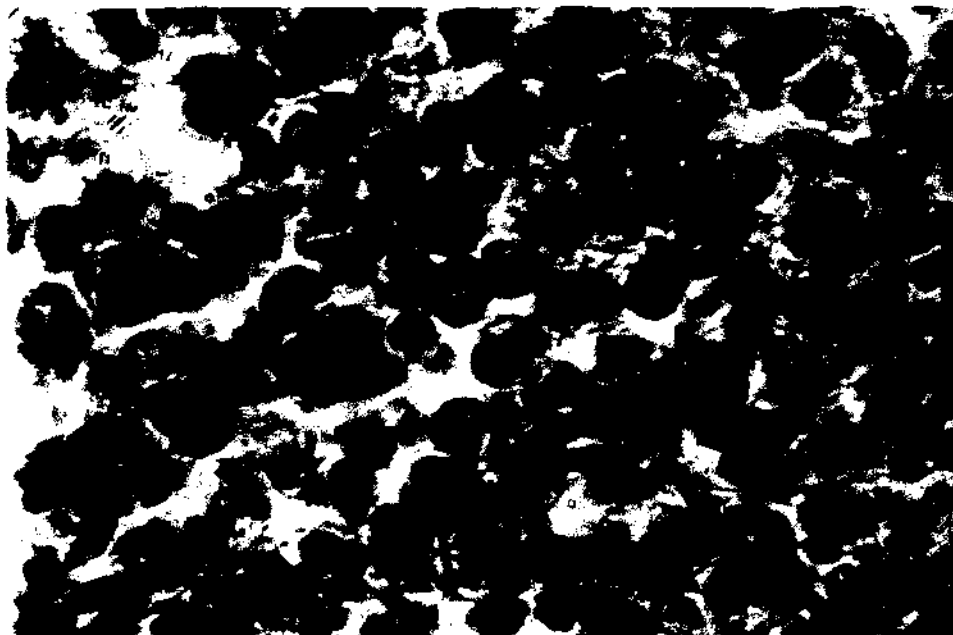
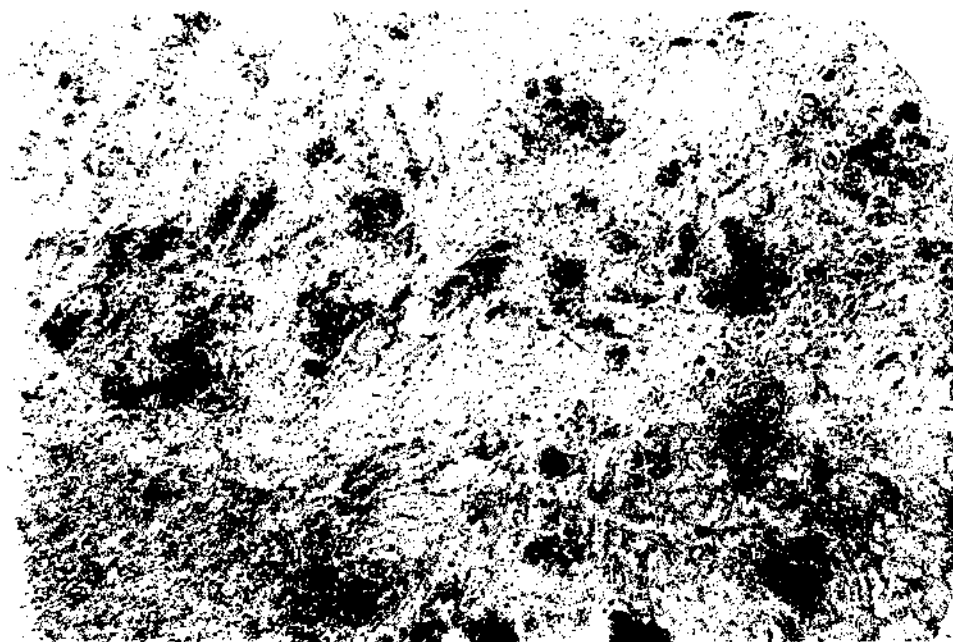


Fig. 9. — Metodo p.a.S. — Van Gieson: *C. albicans* — Renc — 40x.

Fig. 10. — Metodo p.a.S. — Van Gieson: *C. utilis* — Renc — 1.000x.



LIEVITI COLTIVATI SU N-ALCANI (BIOPROTEINE)

Fig. 11. — Metodo p.a.S. — Van Gieson: *C. subtropicalis* — Rene — 100 x.

Fig. 12. — Metodo p.a.S. — Van Gieson: *C. subtropicalis* — Rene — 250x.

