

RENDICONTI

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ



VOLUME X

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ
BIBLIOTECA
INVENT. RID. N. 8003

ISTITUTO SUP. SANITÀ
UFF. CONSEGnatARIO
RIC. NE II CTG - INV. N.

42387

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ
BIBLIOTECA
INVENTARIO N. 32994

ROMA: FONDAZIONE EMANUELE PATERNÒ
VIALE REGINA MARGHERITA, 299 - ANNO 1947

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

DIRETTORE GENERALE

PROF. DOMENICO MAROTTA

CAPIS DEI LABORATORI E RIPARTI

BATTERIOLOGIA: Prof. ROMANO MAGGIORA-VERGANO. - *BIBLIOTECA*.
SEGRETERIA DIDATTICA, *MUSEO*: Dott. MASSIMO PANTALEONI. - *BIOLOGIA*:
Prof. ANTONIO GALAMINI. - *CHIMICA*: Prof. DOMENICO MAROTTA. -
EPIDEMIOLOGIA: Prof. PIETRO ZANNELLI - *FISICA*: Prof. GIULIO CESARE
TRABACCHI. - *INGEGNERIA SANITARIA*: Ing. EUSEBIO VACINO.
MALARIOLOGIA: Prof. ALBERTO MISSIROLI.

FOTOGRAFIE, TAVOLE, DIAGRAMMI, DISEGNI
ESEGUITI DAI FOTOGRAFI E DISEGNATORI DELL'ISTITUTO

A. PICCIRILLI - A. PACELLI

DISEGNO NEL FRONTESPIZIO: FOCO A ROTA DI CARBONI ACCESI (1464)

1. Raffaele ANGELICO – Di un metodo per la colorazione dei parassiti malarici nelle gocce spesse.

Recentemente è stato proposto da J. W. Field (1) un metodo ultrarapido di colorazione dei parassiti malarici nelle gocce spesse, che per la facilità e la rapidità di esecuzione e la sua grande praticità merita di essere largamente introdotto nell'uso.

SIMONS (2) aveva ottenuto un rapido metodo di colorazione con bleu di metilene in soluzione isotonica associato a saponina che esplicava la sua azione emolitica, ed aveva ricavato dei notevoli effetti di contrasto dalla presenza sul fondo del preparato di una certa quantità di emoglobina a causa di una disemoglobinizzazione incompleta.

PAMPANA (3) aveva notato che si può ottenere la disemoglobinizzazione delle gocce spesse senza ricorrere all'uso dell'acqua distillata o di soluzioni ipotoniche, ma con la semplice soluzione fisiologica. Colorando con simultanea disemoglobinizzazione, con una diluizione di liquido di Giemsa in soluzione tampone di fosfati, equimolecolare ad una soluzione di NaCl all'8, $5\frac{0}{00}$, aveva ottenuto un perfetto mantenimento della forma dei parassiti malarici e dei leucociti.

Questo concetto fu tenuto presente da FIELD (4) nel tentativo di ottenere dei metodi rapidi di colorazione basati sull'azione del brillant-cresylblau o del bleu di metilene-eosina, però i risultati furono piuttosto scarsi non pervenendosi ad una buona colorazione della cromatina. Dalla osservazione causale di un assistente di FIELD, JAW WAH CHEW (5) che aveva ottenuto una buona colorazione della cromatina di *P. falciparum* immergendo il vetrino per un 1'' in una soluzione isotonica di bleu di metilene vecchia di un anno (in seno alla quale l'invecchiamento aveva dato sviluppo di azzurro di metilene) e per 1'' in una soluzione A adoperata nel presente metodo aggiungendo ad una soluzione di bleu di metilene in soluzione tampone di fosfati, preparata di recente, una piccola quantità di Azur I.

La rapidità del metodo è una condizione essenziale per la sua riuscita. Secondo quanto afferma FIELD certi colori basici in soluzioni isotoniche possono penetrare profondamente nelle gocce

spesse non più profonde di 50 μ ed essere rapidamente assorbiti dai leucociti e dal citoplasma dei parassiti. Questo è il primo effetto quasi istantaneo, dopodichè comincia a sciogliersi l'emoglobina e comincia a colorarsi lo stroma dei globuli rossi, ma fin tanto che rimane l'emoglobina, scarsa tendenza hanno le emazie a colorarsi. Se, dosando la concentrazione del colore e il tempo di colorazione, si fa in modo di arrestare il processo al punto in cui i leucociti son colorati e le emazie non si vedono ma molta emoglobina è rimasta e gli involucri dei globuli rossi non cominciano ancora a colorarsi, si ottiene l'effetto selettivo: leucociti, piastrine e citoplasma dei parassiti ben colorati su uno sfondo scolorato o debolmente colorato, giallastro per l'emoglobina ritenuta. A ciò si perviene generalmente con 1'' di colorazione. Una buona colorazione della cromatina si otterrà però usando un colore di contrasto come l'eosina, che da sola avrebbe scarso effetto ma usata dopo la mordenzazione operata dall'azzurro di metilene acquista una affinità selettiva per la cromatina (effetto Romanoswky). Essa deve essere usata con cautela perchè tende a danneggiare e scolorare i leucociti colorati con l'Azur e il suo uso, prolungato oltre pochi secondi, accelera la scomparsa dell'emoglobina. La cromatina deve essere rapidamente colorata, i leucociti devono ritenere il loro colore bleu e deve rimanere una parte di emoglobina: ecco il punto in cui si deve arrestare la colorazione e ciò si ottiene in circa 1'' usando una soluzione di eosina allo 0,2%.

Ecco la tecnica del metodo:

Preparazione delle gocce spesse: le gocce deposte su vetrini perfettamente asciutti e puliti vanno definibrate a lungo ed estese a superficie piuttosto larga preferibilmente di forma quadrangolare. *Non devono essere troppo spesse*: secondo FIELD, una goccia di spessore conveniente deve permettere di vedere attraverso di essa le lancette di un orologio. Le gocce appena asciutte (da 1 a 10 minuti a seconda della secchezza dell'atmosfera) sono pronte per la colorazione, anzi i preparati freschi si colorano meglio e più rapidamente di quelli già raccolti da uno, due giorni. L'essiccamento può essere accelerato con una corrente di aria calda.

Preparazione delle sostanze coloranti:

Soluzione A		Soluzione B	
Bleu di metilene	gr. 0,8	Eosina	gr. 1,0
Azur I	» 0,5	Fosfato bisodico	
Fosfato bisodico		(Na_2HPO_4) anidro	» 5,0
(Na_2HPO_4) anidro	» 5,0	Fosfato monopotassico	
Fosfato monopotassico		(KH_2PO_4) anidro	» 6,25
(KH_2PO_4) anidro	» 6,25	Acqua distillata	cc. 500
Acqua distillata	cc. 500		

I fosfati vanno aggiunti prima dei colori. La soluzione di Azur I, granulare, va fatta frantumando in mortaio e raccogliendolo con piccola quantità della soluzione tampone.

Nel caso che non sia possibile trovare in commercio l'Azur I si potrà preparare la miscela bleu-azzurro di metilene dal bleu di metilene medicinale secondo il metodo proposto da A. V. HITCH (6). Ecco la tecnica per la preparazione della soluzione A: si sciolgono gr. 1,3 di bleu di metilene medicinale e gr. 5,0 di fosfato disodico in cc. 50 di acqua distillata. Si porta alla ebollizione e si evapora quindi a bagno maria fino a secchezza. Si aggiungono gr. 6,25 di fosfato monopotassico e cc. 500 di acqua distillata e si agita finchè il colore non sia completamente disciolto (*).

Le soluzioni, comunque preparate a pH fisso di 6,6 vanno te-

(*) PUNTONI (7), nel 1921, sottoponendo ad una corrente di ozono una soluzione di bleu di metilene medicinale previamente alcalinizzata è riuscito ad ottenere dell'AZUR I. Eccone la tecnica: Si prepara una soluzione di bleu di metilene gr. 25; carbonato sodico secco gr. 10; acqua distillata cc. 1000; si lascia 24 ore a 37° agitando frequentemente e si decanta per liberare la parte disciolta dallo scarso sedimento residuo. Posta la soluzione in un vaso si fa gorgogliare l'ozono prodotto da un ozonizzatore in modo che produca un gorgogliamento bolla a bolla nella soluzione. Dopo 24 ore il liquido è decolorato o reso verde chiaro, mentre sulle pareti si è raccolta una patina. Si getta via il liquido e si pone il precipitato in termostato a 37° ad asciugare. Il giorno dopo la patina è secca e si può staccare. L'Azur I ottenuto è in piccole scagliette brune. Da 25 gr di bleu medicinale si ottengono circa 12 gr. di Azur.

nute da parte per 24 ore quindi dopo filtrazione sono pronte per l'uso. Occorrerà filtrare ancora se compare schiuma alla superficie e se si ha precipitato nei preparati colorati. La stessa soluzione può essere usata continuamente per molte settimane senza che si deteriori ma la soluzione di eosina dovrà essere rinnovata quando appare verdastra per trasporto, durante la colorazione, di bleu di metilene dalla vaschetta precedente.

Colorazione: Si adoperino vaschette coperte strette e alte nelle quali i vetrini verranno introdotti verticalmente. Occorrono 4 vaschette disposte in fila nel seguente ordine:

Soluz. A Acqua di lavaggio Soluz. B. Acqua di lavaggio

Per l'acqua di lavaggio sarà bene adoperare vaschette più grandi e sarà bene rinnovarla frequentemente.

La colorazione si svolge nei seguenti 5 tempi:

- 1) Introdurre il vetrino per 1'' nella soluzione A;
- 2) Lavare in acqua di fonte agitando dolcemente per pochi secondi finchè il colore cessi di fluire dal preparato;
- 3) Introdurre il vetrino per 1'' nella soluzione B;
- 3) Introdurre il vetrino per 1'' nella soluzione B;
- 4) Lavare in acqua di fonte agitando dolcemente per 2 o 3 secondi;
- 5) Porre il preparato verticalmente a scolare ed asciugarsi senza rimuoverlo prima che sia perfettamente asciutto.

Il tempo di colorazione potrà essere aumentato fino a 5'' e più per ciascuna soluzione a seconda della concentrazione e della qualità dei colori usati, nonchè dello spessore e dell'età della goccia.

* * *

Secondo l'ideatore del metodo la colorazione ottimale si ha al margine inferiore del preparato verso il quale è scolata l'emoglobina. In questa zona i preparati presentano un bel quadro di colori con effetto tricromico. Il substrato appare giallo crema molto sbiadito a volte uniforme, a volte misto a bleu pallido. I leucociti hanno i nuclei azzurri scuri ben definiti, il citoplasma bleu pallido ben colorato, i granuli eosinofili, grandi, rossi,

molto distinti; i granuli neutrofili piccoli, porpora pallido, vagamente colorati. I parassiti malarici presentano il citoplasma colorato in bleu, la cromatina di color rosso porpora scuro, il pigmento giallo scolorato.

Dall'osservazione di preparati così colorati in confronto con altri colorati col Giemsa, FIELD rileva i seguenti vantaggi in favore del suo metodo: la goccia può essere colorata entro 1-10 minuti dal suo prelievo; la colorazione avviene in meno di 10 secondi anzichè in 20-60 minuti primi; i leucociti sono meglio conservati specialmente nelle loro granulazioni; la cromatina e il citoplasma dei giovani parassiti sono meglio conservati soprattutto nelle piccole forme anulari di *P. falciparum* che generalmente non appaiono mai collassate; i parassiti in forme avanzate di sviluppo non sono erosi ai margini, ma presentano una struttura interna meno evidente che col Giemsa. Non così brillanti risultati si ottengono in presenza di sangue anemico, nel quale i residui cromatici e reticolari delle emazie immature apportano confusione al substrato e possono simulare delle forme tali da indurre in inganno chi non abbia soverchia esperienza di parassiti malarici.

* * *

Attratti dalla semplicità e rapidità di esecuzione del metodo abbiamo voluto provarlo, con la tecnica suggerita da FIELD, su gocce spesse ricavate da malarici aventi in circolo forme di *P. vivax* e *P. falciparum*.

Non avendo in un primo tempo a disposizione dell'Azur I originale come quello usato da FIELD (G. T. Gurr London) abbiamo preparato la soluzione A secondo la tecnica proposta da HITCH ricavando cioè l'Azur I dal bleu di metilene medicinale mediante l'ebollizione. In seguito ci è stato possibile sperimentare con soluzioni A forniteci dal Dr. JOHN GLUCKMANN della U. S. Army e dalla N. 1 Field Section Malaria Research Unit entrambe preparate con l'Azur I originale. Successivamente, per la gentilezza del Prof. V. PUNTONI che ce lo ha fornito abbiamo potuto preparare la detta soluzione A con l'Azur I ottenuto per azione dell'ozono sul bleu di metilene medicinale previamente alca-

linizzato. L'eosina usata per la preparazione della soluzione B è quella di K. Hollborn u. Söhne Leipzig.

Dalla breve esperienza fatta ricaviamo le seguenti osservazioni:

1) Particolare attenzione deve essere fatta all'accurata defibrinizzazione della goccia. Ciò specialmente se si dovrà colorare con l'Azur I ottenuto dal bleu medicinale col metodo dell'ebollizione; in questi casi è comparsa spesso sul fondo una trama reticolare di colorito roseo che si è attribuita alla fibrina colorata. Probabilmente con l'azione del calore sul bleu di metilene si forma un sottoprodotto di decomposizione avente particolare attività tintoriale per la fibrina.

2) I tempi di colorazione fissati possono essere soggetti a lievi variazioni in dipendenza della concentrazione e della qualità dei colori usati, dello spessore e dell'età della goccia. In particolare l'Azur I da noi preparato in laboratorio si è dimostrato un po' meno efficace degli altri azzurri adoperati; per la colorazione di una goccia normale si è dovuto fare agire per un tempo 2-3 volte maggiore (2-3 secondi invece di un secondo). Se la goccia è troppo spessa o già prelevata da qualche giorno i colori richiederanno un pò più di tempo per penetrare nel suo spessore: In tal caso bisognerà aumentare di qualche secondo (in genere da 2 a 4-6'' e non più di 10'') il tempo di colorazione di entrambe le soluzioni o talora soltanto di una. Di queste minime variazioni del tempo di colorazione non si possono dare norme assolutamente precise. Ci si dovrà valere dello schema dato dalla tecnica del metodo, ma in ogni caso un'esperienza sia pure breve sarà la migliore maestra nella pratica.

3) Date le contingenti difficoltà che si incontrano nel trovare in commercio i colori originali ci si potrà valere benissimo nella preparazione della soluzione A dei metodi proposti da HITCH e da PUNTONI per ottenere l'Azur I dal bleu di metilene medicinale. Specialmente il primo, sono di facile esecuzione e permettono di conseguire ugualmente buoni risultati.

4) Un particolare importante è quello del 5° tempo di colorazione: lasciare asciugare verticalmente il preparato senza rimuoverlo prima che sia perfettamente secco. In tal modo con lo scolo lento dell'emoglobina si otterranno nel preparato zone di diversa

intensità e chiarezza di colorazione degli elementi e del substrato, fra le quali, tenendo conto anche dello spessore non sempre uniforme della goccia, si potrà scegliere il punto che più si presti all'osservazione.

5) La colorazione ottenuta non si mantiene nel tempo: in genere in capo ad una settimana i preparati appaiono scolorati.

6) Per quanto riguarda la riuscita della colorazione dei parassiti nelle loro diverse forme non abbiamo notato grandi vantaggi o svantaggi del presente metodo nei confronti con quello del Giemsa: nei preparati ben riusciti, colorati con l'uno o con l'altro metodo, ci è stato possibile avere costantemente ottimi reperti parassitari, con netta demarcazione fra nucleo e citoplasma, che non hanno dato adito ad incertezze diagnostiche.

Il reale assoluto vantaggio di questo metodo è la facilità e rapidità di esecuzione che permette di colorare con brillanti risultati qualunque goccia spessa nel giro di pochissimi secondi. Praticamente fra tempo di essiccamento della goccia, di colorazione, e di asciugamento del vetrino si può osservare il preparato entro 15-20 minuti dal prelievo, facilitando enormemente il compito diagnostico e permettendo di intervenire assai tempestivamente nella cura. A ciò si aggiunga l'enorme vantaggio derivante dal fatto che le soluzioni si mantengono inalterate per molte settimane e possono essere ripetutamente adoperate: ciò ha oggi un particolare valore data la difficoltà di procurarsi i coloranti dal commercio.

Ecco perchè raccomandiamo una larga applicazione del metodo nella pratica.

Roma - Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di malariologia

RIASSUNTO

L'A. descrive un metodo facile e di rapidissima esecuzione di colorazione dei parassiti malarici nelle gocce spesse.

RESUMÉ

L'A. décrit une méthode facile et très rapide à exécuter de coloration des parasites du paludisme dans les gouttes épaisses.

SUMMARY

The author describes a very rapid and easy method for the coloration of malaria parasites in thick blood drops.

ZUSAMMENFASSUNG

Der Verfasser beschreibt ein einfaches und rasch ausführbar zur Färbung der Malaria-Parasiten in den dichten Tropfen.

BIBLIOGRAFIA

- (1) Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg. 35, 1, 35 (1941).
- (2) Bull. Soc. Path. exot. 31, 100 (1938).
- (3) Riv. Malar. 17, 300 (1938).
- (4) Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg. 34, 2, 145 (1940).
- (5) citato da Field.
- (6) citato da Field.
- (7) Ann. Igiene 36, 1, 24 (1921).