

# USO DELLA COLORAZIONE CRISTAL VIOLETTO PER L'IDENTIFICAZIONE DEI LIEVITI APPARTENENTI AL GENERE *MALASSEZIA* IN DERMATOLOGIA VETERINARIA

LUISA CORNEGLIANI\*, ANTONELLA VERCELLI\*, CARLO MASSERDOTTI<sup>§</sup>

\*Ambulatorio Veterinario Associato, C.so Traiano 99/d, Torino

§Clinica Veterinaria S. Antonio, Via Montale 4, Cunettone di Salò, Brescia

## Riassunto

È descritta la metodica di colorazione con Cristal Violetto per l'identificazione dei lieviti del genere *Malassezia* nei campioni citologici cutanei prelevati tramite scotch test dallo spazio interdigitale e con tampone dal canale auricolare. Sono inoltre presi in considerazione altri possibili impieghi per il riconoscimento di differenti tipi cellulari.

## Summary

We report the use of Crystal Violet stain in clinical practice for cytological evaluation of yeasts belonging to the genus *Malassezia* using the acetate tape skin impression and cotton swab smears technique. The samples were obtained respectively from interdigital webs of paws and from ear canal. The authors evaluate the reliability of this technique in diagnostic cytology.

## INTRODUZIONE

L'esame citologico è un metodo diagnostico rapido e di facile impiego nella pratica clinica ambulatoriale. Varie sono le metodiche attualmente conosciute ed usate per colorare i campioni citologici prelevati, anche se le più utilizzate sono le colorazioni rapide, Diff Quick<sup>®</sup> ed Hemacolor<sup>®1,2,3</sup>. Scopo di questo lavoro è descrivere una metodica di colorazione basata sull'utilizzo del Cristal Violetto, il primo colorante della colorazione di Gram, in alternativa alle altre metodiche rapide sopra citate nell'allestimento di campioni citologici cutanei per la ricerca di lieviti del genere *Malassezia*. In particolare è stata valutata la sua applicazione nella preparazione dei campioni prelevati mediante *scotch* test dalla cute e con tampone dal canale auricolare (cerume auricolare). La possibilità di impiegare un unico colorante nella preparazione citologica è stata già segnalata nella ricerca di funghi e lieviti con il lattofenolo cotton blu ed il blu di metilene<sup>1,4,5</sup>. Il Cristal Violetto (CV) è stato scelto quale colorante per la sua capacità di penetrare la parete cellulare, per il suo intenso colore viola, nonché per il suo basso costo<sup>6</sup>.

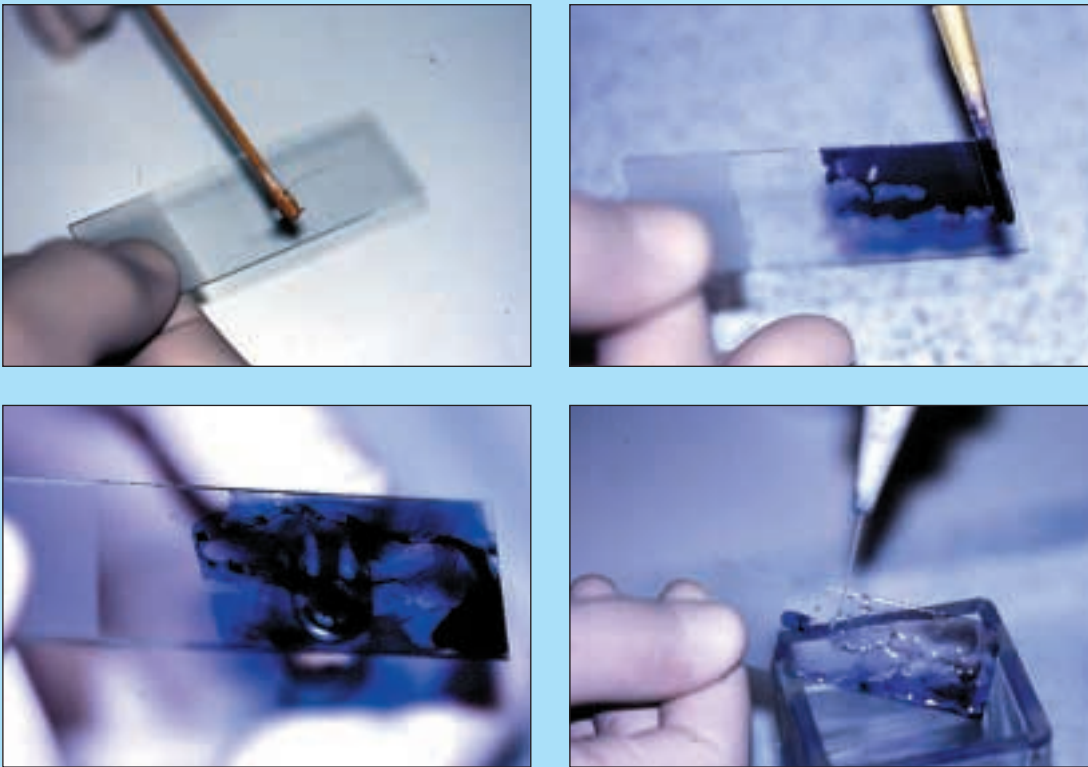
## MATERIALI E METODI

È stato selezionato un gruppo di 30 cani atopici con dermatite ed otite da *Malassezia*. Da questi animali sono stati prelevati campioni citologici tramite nastro adesivo trasparente dagli spazi interdigitali e con tampone da entrambi i canali auricolari esterni. L'allestimento e la colorazione dei vetrini per la lettura al microscopio sono stati effettuati secondo le metodiche riportate di seguito.

### Metodica di allestimento dei campioni auricolari

Il materiale ceruminoso auricolare, prelevato con bastoncini cotonati, veniva strisciato tramite rotolamento del medesimo su un vetrino portaoggetti in precedenza sgrassato e lavato con alcool. Il materiale citologico prelevato non era fissato preliminarmente. Si aggiungevano, con una pipetta, da 100 a 300 microlitri di Cristal Violetto sul portaoggetti in modo da coprire tutto il materiale presente. Si procedeva quindi a riscaldare a fiamma il portaoggetti fino a quando il colorante tendeva a raggiungere l'ebollizione. A questo punto si attendeva il raffreddamento naturale del vetrino per qualche istante per poi lavarlo con soluzione tamponata (acqua distillata tamponata). Si lasciava asciugare all'aria o in asciugatore per vetrini prima di procedere all'esame microscopico (Fig. 1).

“Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 5/3/2003 ed accettato per pubblicazione dopo revisione il 24/10/2003”.



**FIGURA 1**  
Metodica di allestimento di campioni citologici ottenuti per apposizione del bastoncino cotonato su vetrino portaoggetti.

### Metodica di allestimento dei campioni cutanei prelevati con nastro adesivo

Per i campioni citologici ottenuti tramite *scotch* test si allestivano anche dei preparati da colorare con metodica rapida Diff Quick® con l'intento di valutare comparativamente l'attendibilità della metodica CV. A tale scopo si prelevavano dallo spazio interdigitale di ogni cane due campioni con nastro adesivo trasparente. Trenta di questi venivano colorati con CV e trenta con Diff Quick®. Il campione citologico era stato prelevato tramite apposizioni ripetute del nastro sulla cute, come usualmente fatto per ottenere campioni degli strati più esterni dell'epidermide<sup>1</sup>. In contemporanea erano allestiti trenta vetrini portaoggetti, precedentemente lavati e sgrassati con alcool, sui quali si depositavano con una pipetta calibrata 200 microlitri di Cristal Violetto. Lo scotch era delicatamente appoggiato sul portaoggetti (con funzione di coprioggetto). Con un pezzo di carta assorbente si premeva e si faceva aderire lo scotch sul portaoggetti eliminando contemporaneamente l'eccesso di colorante. Il vetrino era così pronto per l'esame microscopico (Fig. 2). In contemporanea si allestivano con colorazione di Diff-Quick® trenta campioni, prelevati con la medesima metodica. Si calcolava la media dei lieviti presenti a 100X su 10 campi per preparato citologico.

### RISULTATI

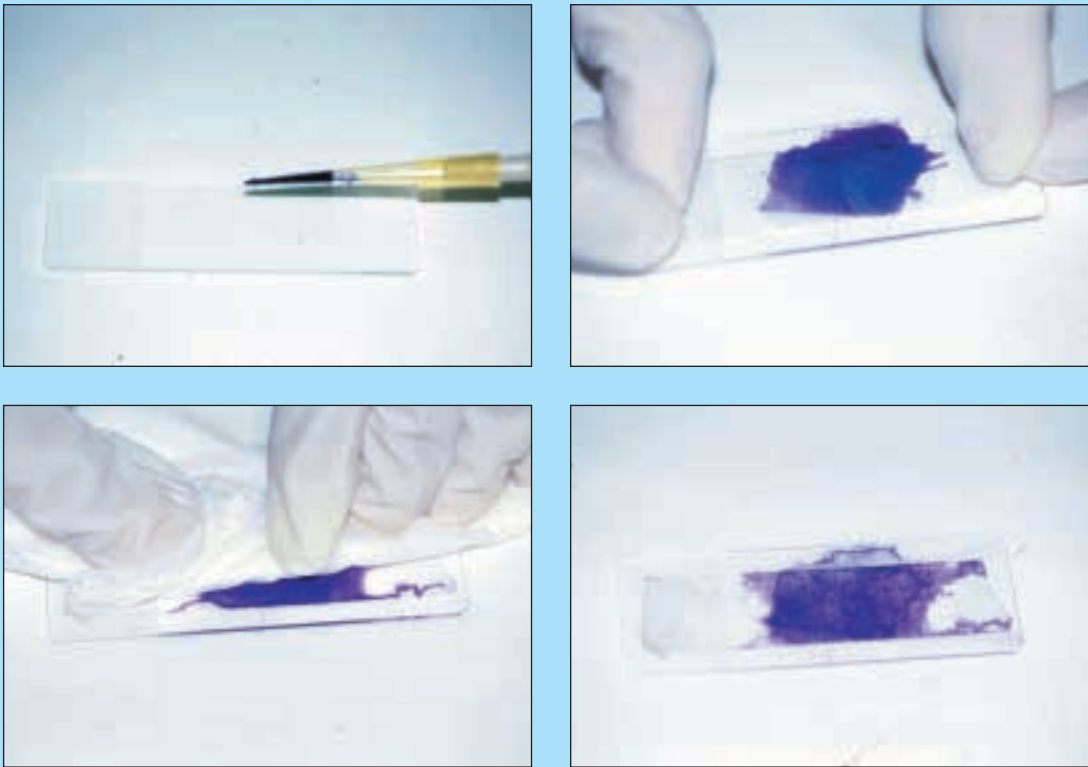
Di seguito sono riportate le valutazioni cromatiche e morfologiche delle cellule epiteliali e dei microrganismi presenti in tutti i campioni citologici prelevati con le due metodiche e colorati con CV.

Caratteri generali: a piccolo ingrandimento il fondo appare pulito e i corpi cellulari ben contrastati; è possibile differenziare gli elementi epiteliali dagli aggregati di cellule flogistiche e, laddove gli aggregati di cellule epiteliali si organizzano in clusters tridimensionali, è possibile distinguere i singoli elementi con discreta definizione. I cromatismi non sono tuttavia omogenei e accanto ad elementi cellulari correttamente colorati se ne osservano alcuni che assumono aspetto diafano acromatico. Non si riscontrano zolle o detriti di colorante in eccesso.

Elementi epiteliali squamosi: i margini citoplasmatici sono ben delineati e sono facilmente valutabili le disposizioni tridimensionali della membrana, quali ripiegature ed accartocciamenti. I citoplasmici esibiscono cromatismi variabili da eosinofili a debolmente basofili; sono riconoscibili granulazioni citoplasmatiche, presumibilmente riferibili a granuli di cheratoilina, e disposizioni fibrillari delle proteine di membrana. In alcune cellule squamose sono ben riconoscibili i granuli di melanina che assumono aspetto bastoncellare e cromatismo brunastro. Gli occasionali nuclei picnotici o in fase avanzata di degenerazione assumono aspetto rotondeggiante a bordi sfumati e cromatismo intensamente eosinofilo, che contrasta sufficientemente sull'eosinofilia citoplasmatica di fondo.

Elementi infiammatori: i granulociti neutrofili esibiscono lobature nucleari di cui si apprezza facilmente la segmentazione; il cromatismo nucleare conferito dalla colorazione è omogeneamente ed intensamente eosinofilo; in alcuni preparati si apprezza una debole eosinofilia citoplasmatica omogenea e un alone perinucleare discontinuo.

Elementi fungini: in riferimento alle cellule di *Malassezia* spp. osservate in tutti gli allestimenti, i profili caratteristici del lievito sono perfettamente riconoscibili, come la segmentazione nel punto di gemmazione, benché per molti elementi



**FIGURA 2**  
Metodica di allestimento di campioni citologici ottenuti per apposizione dal nastro adesivo trasparente con il campione citologico su vetrino portaoggetti.

tale struttura non sia completamente individuabile; il protoplasma del microorganismo assume cromatismo intensamente eosinofilo e si rende perfettamente riconoscibile anche laddove il lievito si sovrappone a strutture cellulari sottostanti.

Elementi batterici: i batteri presenti nei campioni citologici esaminati di forma coccoide sono risultati anch'essi con i profili caratteristici e perfettamente riconoscibili.

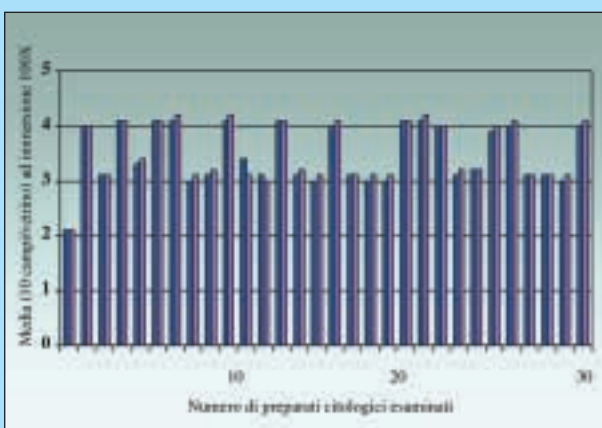
Per quanto concerne la comparazione tra le colorazioni CV e Diff Quick® applicate ai campioni ottenuti con nastro adesivo trasparente, i due gruppi hanno fornito risultati sovrapponibili. La media ottenuta dalla somma dei lieviti presenti in 10 campi a 100X era di 3,5 per il CV e di 3,45 per il Diff Quick® (Fig. 3). Il CV colora in modo adeguato sia il materiale cutaneo prelevato con tampone che

con nastro adesivo trasparente. Nei campioni prelevati per *scotch test* si deve però procedere ad una buona compressione del nastro adesivo sul portaoggetti, per evitare micro-raccolte di colorante che possano, poi, impedire una corretta lettura. Se è impiegata, a scopo comparativo, un'altra colorazione rapida; in tale modo si può notare la differenza di colorazione delle cellule di *Malassezia* spp. che con Hemacolor® e Diff Quick® sono più pallide e dai contorni più sfumati (Fig. 4).

## DISCUSSIONE

La metodica descritta risulta facile da eseguire e più rapida ed economica rispetto alle colorazioni rapide. Inoltre, la colorazione con il CV evidenzia in maniera efficace gli elementi fungini del genere *Malassezia*. In tutti i campioni si rende estremamente semplice il reperimento dei microrganismi; tale risultato non altera le osservazioni secondarie a carico della struttura morfologica degli elementi epiteliali di accompagnamento, non determina sul preparato presenza di artefatti, conseguenza di precipitati di colorante, benché non sia possibile ottenere in tutti i preparati un'uniformità nella colorazione delle singole cellule. Presumibilmente tale difetto è più probabilmente imputabile alla tecnica di preparazione che alle caratteristiche di distribuzione del colorante stesso. Nelle altre metodiche rapide (Diff Quick® ed Hemacolor®), le cellule ed i microrganismi possono risultare non uniformemente colorate a causa della necessità di più passaggi e della deteriorabilità dei coloranti stessi.

Per quanto riguarda le osservazioni a carico degli elementi infiammatori è doveroso sottolineare che il CV può confe-



**FIGURA 3** - La Figura evidenzia graficamente la comparazione tra le due metodiche. In azzurro i campioni colorati con Diff Quick®, in rosa quelli allestiti con Cristal Violetto.

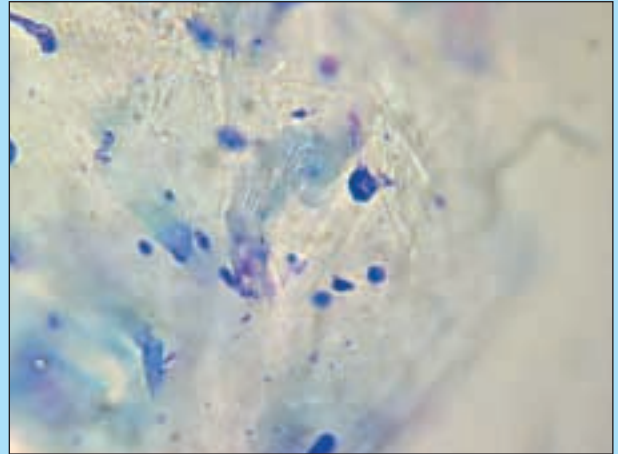
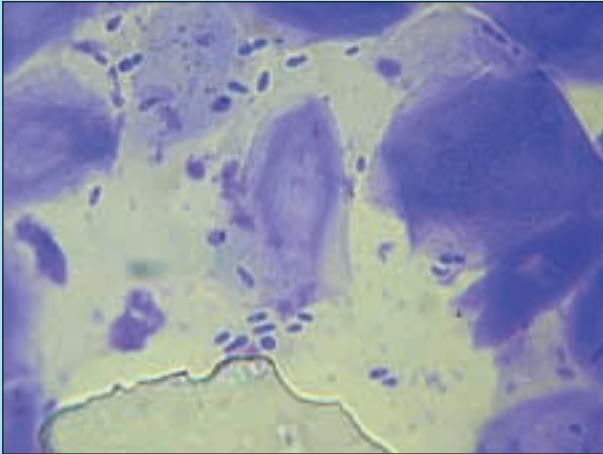


FIGURA 4 - L'immagine a sinistra rappresenta un campione citologico colorato con CV, mentre quella a destra un altro prelievo allestito con Diff Quick®.

rire al materiale nucleare una colorazione omogenea priva delle caratteristiche zollature cromatiniche ottenibili con i metodi classici di allestimento. Questo aspetto, unitamente ad altri particolari, quali l'eosinofilia citoplasmatica e l'alone perinucleare, può erroneamente essere interpretato come fenomeno di cariolisi nucleare. Tale inconveniente non si verifica nei campioni preparati con le altre metodiche rapide (se i coloranti sono nuovi e/o ben conservati).

Se paragoniamo la metodica con il Cristal Violetto a quella con altre colorazioni rapide notiamo anche che il campione risulta colorato in modo uniforme e tutti gli elementi fungini hanno le stesse caratteristiche tintoriali (Fig. 4). Questo non si verifica comunemente nelle altre colorazioni rapide (Diff Quick® e Hemacolor®) dove alcuni lieviti possono risultare di colore rosa pallido. In uno studio comparativo precedentemente effettuato<sup>5</sup>, questa differenza ha spesso determinato l'evidenziazione di un numero inferiore di elementi fungini nel campione citologico. Considerate le caratteristiche di questa colorazione se ne suggerisce l'uso nella pratica ambulatoriale qualora si vogliono identificare in modo rapido la presenza di lieviti del genere *Malassezia* spp.

## Parole chiave

*Cristal violetto, citologia cutanea, Malassezia spp.*

## Key words

*Crystal violet, skin cytology, Malassezia spp.*

## Bibliografia

1. Guaguere E: Techniques diagnostiques en dermatologie des carnivores, PMCAC, 1994, 23-28.
2. Scott DW, Miller WH, Griffin CE: Muller & Kirk's Small Animal Dermatology, 6<sup>th</sup> ed WB Saunders Company, 2001, 112-118.
3. Magol JP, Guelfi JF: Colour Atlas of Cancer Cytology of the Dog and Cat, PMCAC, 1994, 5.
4. Woods and Walker: Stains for detection of Fungi. Clinical Microbiology Rev. Vol. 6, 1996, 396-397.
5. Quinn PJ, et al.: Reagents and Stains. In Clinical Veterinary Microbiology, Wolfe ed. 1998, 615-619.
6. Cornegliani L, Vercelli A: Crystal Violet stain for cytological evaluation of *Malassezia*. Veterinary Dermatology, vol. 11, Supplement 1, Sept 2000, 56.