

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute

Corso di laurea magistrale a ciclo unico in
MEDICINA VETERINARIA

**CITOLOGIA OCULARE NEL CAVALLO:
CONFRONTO TRA LA METODICA AD
IMPRESSIONE E LA TECNICA DI CYTOBRUSH
IN SOGGETTI PRIVI DI PATOLOGIE AGLI
OCCHI**

Relatore: Prof.ssa Ilaria Iacopetti
Correlatore: Dott. Federico Bonsembiante

Laureanda: Alessandra Deganello
Matricola n. 1022437

ANNO ACCADEMICO 2015/2016

Sommario

Riassunto	6
Abstract	8
1. Anatomia dell'occhio equino	10
1.1 Orbita	10
1.2 Globo oculare	10
1.2.1 Cornea.....	11
1.2.2 Sclera	12
1.2.3 Limbo	13
1.2.4 Coroide	14
1.2.5 Iride.....	14
1.2.6 Corpora nigra.....	15
1.2.7 Corpo ciliare	15
1.2.8 Cristallino	16
1.2.9 Umore vitreo.....	17
1.2.10 Retina.....	18
1.3 Annessi oculari	21
1.3.1 Palpebre e congiuntiva.....	21
1.3.2 Terza palpebra.....	22
1.3.3 Sistema nasolacrimale	23
1.3.4 Muscoli estrinseci dell'occhio	24
1.4 Vascolarizzazione dell'occhio	25
1.5 Innervazione dell'occhio	26
2. Visita oftalmologica nel cavallo	28
2.1 Riflessi associati all'occhio	28
2.2 Anestesia locoregionale	31
2.3 Coloranti oftalmici.....	32
2.4 Esame del segmento anteriore	32
2.5 Esame del segmento posteriore	33
2.6 Tonografia.....	33
2.7 Esame del sistema lacrimale.....	34

2.8 Citologia	34
3. Patologie oculari che si diagnosticano con l'ausilio della citologia.....	38
3.1 Cheratite ulcerativa.....	38
3.2 Cheratite e cheratocongiuntivite eosinofila	40
3.3 Congiuntivite	41
3.4 Neoplasie	41
4. Citologia ad impressione	43
5. Scopo della tesi	53
6. Materiali e metodi.....	54
6.1 Raccolta dei campioni	54
6.2 Colorazione.....	56
6.3 Valutazione citologica.....	56
6.4 Analisi statistica.....	58
7. Risultati	59
8. Discussione	73
9. Conclusioni.....	79
Bibliografia.....	80

Riassunto

Nel cavallo, la tecnica attualmente più usata per la citologia della superficie oculare è il cytobrush. La citologia ad impressione, invece, è una metodica innovativa e non invasiva, che consiste nella raccolta di un monostrato di cellule tramite l'apposizione di un filtro di cellulosa sulla superficie oculare. Essa viene usata abitualmente in medicina umana, mentre il suo utilizzo in veterinaria è ancora limitato. Fu testata inizialmente in cane e gatto e in seguito furono eseguiti alcuni studi sui grandi animali. Lo scopo di questa tesi è confrontare la metodica ad impressione e la tecnica di cytobrush applicate a cornea e congiuntiva nel cavallo sano, fornendo dei dati qualitativi e quantitativi di quarantotto campioni, ventiquattro dei quali ottenuti con cytobrushing e altri ventiquattro per impressione. Ulteriore obiettivo di questo studio è valutare la ripetibilità della metodica ad impressione nella specie equina stimando il livello di *agreement* tra le valutazioni di due osservatori con diverso livello di esperienza. Infine questo lavoro è volto anche a valutare il pattern citologico normale della citologia ad impressione nel cavallo.

Per questo studio sono stati campionati ventiquattro cavalli pochi minuti dopo la macellazione. Tutti i prelievi sono stati eseguiti dal limbo superiore. Dall'occhio sinistro sono stati raccolti i campioni per impressione mentre dal destro sono stati effettuati i prelievi con cytobrush. I preparati sono stati colorati con la colorazione May-Grunwald-Giemsa e poi osservati al microscopio ottico da due operatori con diverso livello di esperienza. Sono stati valutati cellularità, conservazione, dimensioni, forma, colore del citoplasma, rapporto nucleo/citoplasma, presenza di granuli intracitoplasmatici, cromatina. Inoltre, sono state valutate eventuali *goblet cells* e la presenza di cellule infiammatorie.

Per il primo osservatore, con conoscenze basilari, il 63% (15/24) dei filtri ha presentato buona cellularità e il 79% (19/24) di essi è ben conservato mentre il 25% (6/24) e l'8% (2/24) hanno dimostrato rispettivamente buona cellularità e conservazione per quanto riguarda solo una delle due popolazioni studiate (congiuntivale e corneale). Per il secondo osservatore, dotato di maggiore esperienza, il 25% (6/24) dei filtri aveva buona cellularità e il 66% (16/24) di essi aveva buona conservazione; il 33% (8/24) e il 29% (7/24), invece, presentavano rispettivamente buona cellularità e conservazione per quanto riguarda una sola popolazione cellulare. La popolazione corneale è organizzata

in un monostrato, con cellule grandi, poligonali, dotate generalmente di alto rapporto nucleo/citoplasma (N/C), citoplasma chiaro, nucleo tondo centrale o paracentrale e cromatina granulare o finemente granulare. La popolazione congiuntivale è costituita da cellule con citoarchitettura pavimentosa, piccole dimensioni, forma tonda od ovale, citoplasma leggermente basofilo, basso rapporto N/C, nucleo paracentrale e cromatina da dispersa a finemente granulare o granulare. Nel 25% dei campioni ottenuti per impressione (6/24) sono state notate cellule infiammatorie da entrambi gli osservatori.

Le differenze significative dal punto di vista statistico tra le due metodiche riguardano la conservazione, la cellularità, il numero di granuli, la numerosità delle *goblet cells* e la cromatina nucleare.

Il livello di *agreement* tra i due osservatori nella valutazione dei filtri è accettabile, validando la citologia ad impressione come una metodica ripetibile nella specie equina ed applicabile anche da neofiti.

La citologia ad impressione oculare nel cavallo permette di ottenere campioni dotati di buona cellularità e conservazione, migliori rispetto al cytobrush. Inoltre, consente una miglior rilevazione delle *goblet cells*. Tuttavia, per la visualizzazione di dettagli citoplasmatici e nucleari, è preferibile la metodica di *cytobrushing*, che permette di ottenere un maggiore ingrandimento.

Abstract

Cytobrushing is the most common technique used to sample the equine ocular surface. Impression cytology is an innovative non-invasive method which allows to collect the superficial layers of ocular epithelium. It's routinely used in human medicine while in veterinary medicine it has not been commonly practised yet. Impression cytology has been experimented first in dogs and cats but in the last years studies in large animals have been done. The aims of this study are: 1) to compare cytobrush technique and impression cytology of the cornea and bulbar conjunctiva of healthy equine eyes 2) to assess the agreement between two observers with different level of expertise, to evaluate repeatability of impression method and 3) to evaluate the normal pattern of ocular impression cytology in the horse.

Twenty-four horses were sampled few minutes after slaughtering. All samples were obtained from superior limbus, on the left eye of each horse using impression technique while on the right eye with cytobrush. All specimens were stained with May-Grunwald-Giemsa and then observed by light microscope by two observers. Features evaluated were cellularity, preservation, size, shape, cytoplasm colour, nucleus/cytoplasm ratio, cytoplasm granules, chromatin, presence of goblet cells and inflammatory cells.

According to the first observer, with lower level of expertise, 63% (15/24) of filters showed good cellularity and 79% (19/24) of them was well-preserved while 25% (6/24) and 8% (2/24) displayed respectively good cellularity and preservation for one of the two cellular populations. According to the second observer, with more expertise, 25% (6/24) of filters had good cellularity and 66% (16/24) of them had good preservation; 33% (8/24) and 29% (7/24), instead, presented respectively good cellularity and preservation for one population only. In 25% of impression samples (6/24), in addition, inflammatory cells were noticed by both observers.

Corneal cells are big, polygonal shaped, with high nucleus/cytoplasm ratio, light cytoplasm, central round nucleus and granular/finely granular chromatin.

Conjunctival cells are small, round or oval, with slightly basophilic cytoplasm, low nucleus/cytoplasm ratio, paracentral nucleus and smooth chromatin.

Preservation, cellularity, cytoplasmic granules, number of goblet cells and chromatin were different between the two methods.

Agreement between the two observers was acceptable so impression cytology could be

considered a repeatable cytology method in the equine.

Ocular impression cytology in the horse gives samples with good cellularity and well-preserved, better than cytobrush samples. Moreover, goblet cells were found easier with impression cytology. However, cytobrushing, that allows bigger magnification, is recommended to evaluate more specific details of cytoplasm and nucleus.

1. Anatomia dell'occhio equino

1.1 Orbita

L'orbita è una cavità imbutiforme dello splancnocranio deputata ad accogliere il globo oculare e gli annessi oculari.

Nel cavallo le orbite occupano una posizione pressoché laterale consentendo un campo di visione complessivo molto ampio di circa 340° (*Cutler, 2005*), nel quale predomina la visione monoculare laterale a discapito di quella binoculare che ha invece un campo molto ristretto (*Sjastaad et al., 2010*).

Approssimativamente, l'orbita equina è larga 62 mm, alta 59 mm e profonda 92 mm ma le dimensioni variano in base ad età e taglia del cavallo (*Carastro et al., 2004*). Essa si apre anteriormente con il *marginè orbitario*, che in questa specie è definito “completo” in quanto circonda totalmente il globo oculare (*Miller Michau, 2005*). Tale margine è costituito dorsalmente dall'osso frontale, contenente il foro sovraorbitario, medialmente dall'osso lacrimale, ventralmente dall'osso zigomatico e lateralmente dal processo zigomatico dell'osso temporale (*Carastro et al., 2004*). Le ossa frontale, lacrimale, sfenoide e palatino formano la parete mediale dell'orbita (*Miller Michau, 2005*). La parete dorsale è data dall'osso frontale mentre quella ventrale è formata da tessuti molli quali grasso e i muscoli pterigoidei (*Miller Michau, 2005; Carastro et al., 2004*).

Nell'osso sfenoide sono presenti, procedendo in senso medio-laterale, i forami etmoidale, orbitale, ottico e alare rostrale attraverso i quali passano vasi e nervi (*Miller Michau, 2005*). Il forame orbitale non si presenta allungato come nelle altre specie domestiche ma ha una forma sferoidale (*Miller Michau, 2005*).

1.2 Globo oculare

Nel cavallo adulto, il globo oculare misura approssimativamente 47,6 mm lungo l'asse verticale, 48,4 mm lungo l'asse orizzontale e 43,7 mm lungo l'asse anteroposteriore (*Miller Michau, 2005*). Ciò denota una leggera compressione lungo quest'ultimo asse.

Il globo oculare è costituito da tre tonache: la tonaca fibrosa esterna composta anteriormente dalla cornea e posteriormente dalla sclera; la tonaca vascolare intermedia detta anche *uvea*, che comprende corioide, corpo ciliare ed iride e infine la tonaca

nervosa interna costituita dalla retina (Sjastaad et al., 2010).

All'interno del globo si distinguono tre camere: la camera anteriore compresa tra cornea e iride, la camera posteriore tra iride e cristallino e la camera vitrea tra cristallino e retina. Le prime due camere, che insieme formano il *segmento anteriore*, sono riempite da un liquido detto "umore acqueo" mentre quella vitrea (che costituisce il *segmento posteriore*), da una sostanza gelatinosa detta "umore vitreo" (Sjastaad et al., 2010).

1.2.1 Cornea

La cornea è la zona anteriore della tonaca fibrosa. Avendo un raggio minore di curvatura rispetto al resto del globo, essa sporge dalla superficie anteriore dell'occhio (Dyce et al., 2009). Di forma ovalare, nel cavallo adulto misura da 29,7 mm a 34,0 mm sull'asse orizzontale e da 23,0 mm a 26,5 mm sull'asse verticale mentre nel puledro le rispettive misure variano da 20,5 mm a 26,6 mm e da 19,5 mm a 24,0 mm (Andrew et al., 2005).

Lo spessore corneale nel cavallo è compreso tra 770 µm e 793 µm nella parte centrale e aumenta leggermente alla periferia (Andrew et al., 2005).

La cornea è priva di vascolarizzazione ma riceve nutrienti sia dall'umore acqueo che dall'arcata vascolare presente al confine tra cornea e sclera (Cooley et al., 1992).

Dal punto di vista microscopico, la cornea presenta una struttura lamellare nella quale si distinguono cinque strati: l'epitelio anteriore, la membrana basale, la sostanza propria, la membrana di Descemet e l'endotelio (Hamor and Ehrhart, 2006).

L'epitelio corneale è di tipo squamoso stratificato non cheratinizzato. In confronto ai piccoli animali, l'epitelio anteriore della cornea equina è più spesso, includendo dai dieci ai quindici strati di cellule (Carastro et al., 2004). L'epitelio è formato da uno strato di cellule basali, da strati plurimi di cellule poligonali (*wing cells*) e da ulteriori strati di cellule squamose non cheratinizzate (Hamor and Ehrhart, 2006). Sulla superficie di queste ultime, sono presenti numerosi microvilli, finalizzati alla ritenzione del film lacrimale sulla superficie corneale (Hamor and Ehrhart, 2006).

La membrana basale collega le cellule epiteliali allo stroma sottostante (Carastro et al., 2004). Essa comprende fibre reticolari e una lamina basale, alla quale le cellule basali epiteliali sono ancorate per mezzo di desmosomi, fibrille di collagene e laminina (Hamor and Ehrhart, 2006).

La sostanza propria o stroma rappresenta il 90% dello spessore corneale (*Carastro et al., 2004*). E' formata da numerose "lamelle" costituite a loro volta da fibrille di collagene che sono parallele tra loro all'interno della stessa lamella mentre formano angoli retti all'interfaccia tra lamelle contigue (*Hamor and Ehrhart, 2006*). La precisa disposizione delle lamelle impedisce la dispersione della luce (*Carastro et al., 2004*). Il tipo cellulare predominante dello stroma è il fibrocita o cheratocita, cellula allungata, ramificata e con scarso citoplasma (*Hamor and Ehrhart, 2006*). Tali cellule si attivano durante il processo di riparazione dei tessuti corneali (*Hamor and Ehrhart, 2006*).

La membrana di Descemet è la membrana basale dell'endotelio corneale (*Carastro et al., 2004*). Si ispessisce con l'età a seguito dell'aggiunta di nuovi strati di cellule basali (*Carastro et al., 2004*). Al microscopio ottico, appare come uno spesso strato amorfo PAS positivo (*Hamor and Ehrhart, 2006*).

L'endotelio corneale o epitelio posteriore, è un epitelio monostratificato di cellule esagonali strettamente interdigitate tra loro e contenenti numerosi mitocondri e vescicole pinocitotiche (*Hamor and Ehrhart, 2006*). Le cellule endoteliali sono inoltre provviste di pompe Na^+/K^+ ATPasi che trasportano attivamente molecole di acqua al di fuori dello stroma (*Carastro et al., 2004*). Un loro difetto causerebbe difatti edema corneale (*Hamor and Ehrhart, 2006*).

La cornea possiede il più alto potere refrattivo dell'occhio (*Carastro et al., 2004*).

1.2.2 Sclera

La sclera rappresenta la porzione posteriore della tonaca fibrosa e ha la funzione di proteggere il globo oculare e mantenerne la forma. E' costituita da uno strato denso di tessuto connettivo che negli ungulati è più spesso nella regione del nervo ottico (*Hamor and Ehrhart, 2006*).

La sclera contiene primariamente fibre di collagene e, in minor misura, fibre elastiche, fibrociti e melanociti (*Hamor and Ehrhart, 2006*). Tutte le fibre sclerali sono disposte in modo disorganizzato e irregolare. Nella parte più profonda della sclera, in prossimità della tonaca vascolare, si rinviene un maggior numero di fibre elastiche, melanociti e fibroblasti: tale strato è denominato "lamina fusca della sclera" (*Hamor and Ehrhart, 2006*).

La sclera è ricoperta dalla *congiuntiva bulbare*, ossia la prosecuzione sul globo della *congiuntiva palpebrale*, la mucosa della palpebra.

1.2.3 Limbo

Il limbo è il punto di giunzione tra la cornea e la sclera. Tuttavia, essendo quest'ultima ricoperta dalla congiuntiva bulbare, il limbo può essere considerato anche come il margine corneo-congiuntivale.

A livello di limbo, l'epitelio anteriore della cornea si modifica gradualmente nell'epitelio della congiuntiva bulbare mentre le lamelle di collagene della sostanza propria si associano a più fibre elastiche e si continuano nelle fasce equatoriali della sclera (*Hamor and Ehrhart, 2006*). La membrana di Descemet termina al limbo (*Hamor and Ehrhart, 2006*).

Lungo le porzioni nasale e temporale del limbo, nel cavallo adulto è possibile notare una linea grigia che rappresenta l'attacco dei legamenti pettinati dell'angolo iridocorneale alla membrana di Descemet (*Cooley et al., 1992; Carastro et al., 2004*). Nel puledro la linea grigia è visibile a 360° lungo tutto il limbo (*Cooley et al., 1992*).

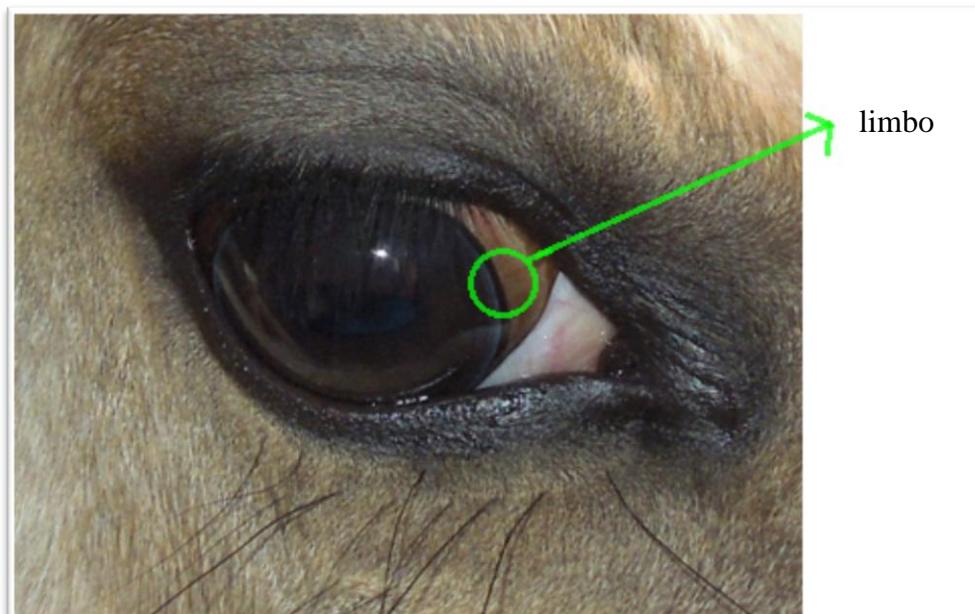


Figura 1.1: messa in evidenza del limbo (immagine tratta da <https://edhilyen.wordpress.com/tag/cavallo/>).

1.2.4 Coroide

La coroide è un elemento della tonaca vascolare che si continua anteriormente nello stroma del corpo ciliare (*Hamor and Ehrhart, 2006*). Essa comprende cinque strati. Il primo è lo strato sovracoroideo che rappresenta un tessuto connettivo di transizione tra sclera e coroide vera e propria (*Hamor and Ehrhart, 2006*). Procedendo verso l'interno, si trova lo strato vascolare responsabile del nutrimento della retina (*Carastro et al., 2004; Hamor and Ehrhart, 2006*). Il terzo strato è il *tapetum lucidum* che nel cavallo è di tipo fibroso (*Hamor and Ehrhart, 2006*). Quest'organo particolare riflette la luce e consente una maggior visione al buio. La sottostante tonaca coriicapillare è una fitta rete di capillari fenestrati diretti all'epitelio pigmentato della retina (*Hamor and Ehrhart, 2006*). L'ultimo strato è il complesso basale che funge da barriera tra il sangue contenuto nei vasi dello strato coriicapillare e l'epitelio pigmentato della retina (*Hamor and Ehrhart, 2006*). Nel cavallo è costituito da uno strato di collagene frapposto tra due lamine basali (*Hamor and Ehrhart, 2006*).

1.2.5 Iride

L'iride è un organo di forma anulare che separa la camera anteriore dalla camera posteriore. È fissato alla giunzione corneo-sclerale tramite i legamenti pettinati (*Hamor and Ehrhart, 2006; Cooley et al., 1992*).

Il collaretto divide l'iride in due aree concentriche: la zona pupillare più sottile e la zona periferica più spessa (*Cooley et al., 1992*).

Lo strato più superficiale dell'iride, rivolto verso la camera anteriore, non è un epitelio bensì tessuto connettivo formato da fibrociti separati da larghi spazi intercellulari e melanociti (*Hamor and Ehrhart, 2006*). Viene detto "*tonaca non vascolare*" (*Hamor and Ehrhart, 2006*). Profondamente a questo, si trova la tonaca vascolare dello stroma costituita da fasci arcuati di fibre di collagene e fibrociti immersi in connettivo lasso riccamente vascolarizzato (*Hamor and Ehrhart, 2006*). Sono altresì presenti due muscoli lisci: il muscolo sfintere, innervato dalla branca parasimpatica del nervo oculomotore e responsabile della costrizione della pupilla e il muscolo dilatatore responsabile invece della dilatazione della pupilla ed innervato dal simpatico (*Hollingsworth, 2005*). Questi muscoli si trovano rispettivamente all'interno dello

stroma e posteriormente ad esso (*Hollingsworth, 2005*).

Lo strato posteriore dell'iride è l'epitelio pigmentato che si organizza in due strati sostenuti, nella faccia rivolta verso la camera posteriore, da una lamina basale (*Hollingsworth, 2005; Hamor and Ehrhart, 2006*). Rappresenta il prolungamento dell'epitelio non pigmentato dei corpi ciliari che diviene progressivamente melanotico verso la base dell'iride (*Hamor and Ehrhart, 2006*). Il colore dell'iride è dato dalla quantità di melanociti presenti e dal tipo di pigmento in essi contenuto (*Dyce et al., 2009*).

L'apertura al centro dell'iride è la *pupilla*, che nel cavallo si presenta maggiormente lunga sull'asse orizzontale, con una apertura più ampia verso la regione nasale (*Carastro et al., 2004*). Nei puledri la pupilla è di forma sferica (*Carastro et al., 2004*). Il livello di apertura della pupilla viene modificato per regolare la quantità di luce che entra nell'occhio.

1.2.6 Corpora nigra

Una particolarità dell'occhio di cavallo è la presenza dei *granuli iridei* o *corpora nigra*, che sono delle protuberanze ben visibili sul margine dorsale della pupilla e presenti in dimensioni più piccole sul margine inferiore (*Carastro et al., 2004*). Originano da una proliferazione dell'epitelio posteriore pigmentato dell'iride (*Carastro et al., 2004*).

1.2.7 Corpo ciliare

Il corpo ciliare è un organo deputato alla produzione dell'umore acqueo. Appartiene alla tonaca vascolare tant'è vero che rappresenta una continuazione anteriore della coroide (*Hamor and Ehrhart, 2006*). Il corpo ciliare è diviso in due porzioni: la *pars plicata* e la *pars plana*. La *pars plicata* consiste in circa cento processi ciliari che si estendono nella camera posteriore (*Carastro et al., 2004*). Ogni processo è composto da uno stroma di connettivo lasso ricoperto da due strati di epitelio cuboidale (*Hamor and Ehrhart, 2006*). Lo strato più interno, rivolto verso la camera posteriore, è formato da cellule non pigmentate che poggiano su una lamina basale, la quale le separa dalla suddetta camera (*Hamor and Ehrhart, 2006*). Lo strato di cellule non pigmentate è la continuazione dello

strato neurosensitivo della retina e si prolunga in seguito nell'epitelio pigmentato posteriore dell'iride (*Hamor and Ehrhart, 2006*). Le cellule dello strato non pigmentato contengono numerosi reticoli endoplasmatici ruvidi (RER) e apparati di Golgi a livello apicale (*Hamor and Ehrhart, 2006*). Sono unite tra loro da *tight junctions* e per tale motivo si pensa che lo strato epiteliale non pigmentato rappresenti, assieme all'endotelio dell'iride, la barriera ematoacquosa nel cavallo (*Hollingsworth, 2005; Cooley et al., 1992*). Lo strato epiteliale più esterno è dato da cellule pigmentate che sono la prosecuzione dell'epitelio pigmentato della parte ottica della retina (*Hamor and Ehrhart, 2006*).

La porzione centrale di ogni processo ciliare è formata da connettivo lasso pervaso da una fitta rete di capillari fenestrati, i quali permettono il passaggio del plasma nello stroma affinché venga in seguito filtrato dalle cellule epiteliali che rimuovono proteine e cellule producendo così l'umore acqueo (*Hollingsworth, 2005*).

L'umore acqueo scorre dalla camera posteriore attraverso la pupilla alla camera anteriore e poi nell'angolo iridocorneale dove viene drenato.

Tra i processi del corpo ciliare prendono attacco anche le *fibre zonulari* che si inseriscono sull'equatore del cristallino sostenendolo (*Carastro et al., 2004*).

Dietro ai processi ciliari sono presenti diverse fibre muscolari lisce che rappresentano il *muscolo ciliare* (*Carastro et al., 2004*).

La *pars plana* è la porzione posteriore del corpo ciliare e rappresenta un punto di transizione con la retina (*Carastro et al., 2004*).

1.2.8 Cristallino

Il cristallino, o lente, è una struttura biconvessa sospesa tra camera posteriore e camera vitrea per mezzo delle fibre zonulari, che prendono attacco a livello del corpo ciliare e si inseriscono sulla capsula del cristallino in prossimità dell'equatore (*Whitley, 2005*). La funzione del cristallino è quella di rifrangere la luce a seconda della distanza dell'oggetto (il potere rifrattivo della lente di cavallo è di 14.88 diottrie), un fenomeno chiamato accomodazione, che si ottiene tramite la variazione della curvatura del cristallino a seconda della maggiore o minore tensione delle fibre zonulari (*Whitley, 2005*). In particolare, la contrazione del muscolo ciliare provoca un rilassamento delle

fibre zonulari con conseguente assunzione di una forma più sferica da parte del cristallino che mette a fuoco così l'immagine sulla retina (*Whitley, 2005; Hamor and Ehrhart, 2006*). Viceversa, il rilassamento del muscolo ciliare causa una maggior tensione delle fibre zonulari con l'effetto opposto sul cristallino.

La lente di equino ha un diametro di 20 mm, una lunghezza assiale tra 11 mm e 13,5 mm e un volume approssimativo tra 2,5 ml e 3,2 ml (*Whitley, 2005*). La sua caratteristica trasparenza è dovuta alla mancanza di vascolarizzazione e di fluidi e alla particolare disposizione delle fibre (*Whitley, 2005*).

Dall'esterno verso l'interno, il cristallino è formato da una capsula, dall'epitelio e dalle fibre. La capsula, che funge da membrana basale per l'epitelio, è strutturata come diversi strati di fibrille di collagene miste a cellule e si presenta più spessa sulla superficie anteriore della lente (*Whitley, 2005; Hamor and Ehrhart, 2006*).

L'epitelio del cristallino si trova dietro la parte anteriore della capsula ed è di tipo monostratificato cubico (*Whitley, 2005; Hamor and Ehrhart, 2006*). A livello equatoriale, le cellule epiteliali vanno incontro a numerose mitosi, si allungano e maturano in fibre del cristallino (*Whitley, 2005; Hamor and Ehrhart, 2006*). La continua produzione di fibre aumenta la densità del cristallino con l'età tant'è vero che al microscopio si osservano delle zone di discontinuità nel cristallino che rappresentano il nucleo embrionale, il nucleo fetale e il nucleo adulto (*Whitley, 2005; Hamor and Ehrhart, 2006*).

Le fibre del cristallino sono prive di nucleo ed organelli (*Hamor and Ehrhart, 2006*). Hanno forma ad U e le estremità di fibre opposte si incontrano a circa metà dello spessore del cristallino formando le cosiddette “*suture a forma di Y*” (*Hamor and Ehrhart, 2006*).

1.2.9 Umore vitreo

L'umore vitreo, detto anche corpo vitreo, è una sostanza trasparente costituita per il 99% da acqua e per l'1% da acido ialuronico, ialociti e fibrille di collagene (*Carastro et al., 2004*). L'acido ialuronico conferisce all'umore vitreo la caratteristica consistenza gelatinosa (*Cooley et al., 1992*).

Esistono tre tipi di corpo vitreo: primario, secondario e terziario. Il primario è deputato

al nutrimento del globo oculare in formazione durante l'organogenesi e regredisce poco prima della nascita (*Hamor and Ehrhart, 2006*). Al suo posto, si forma il corpo vitreo secondario che è normalmente presente nell'adulto e viene prodotto dalle cellule gliali della retina e dall'epitelio del corpo ciliare (*Carastro et al., 2004; Hamor and Ehrhart, 2006*). Il corpo vitreo terziario consiste nelle fibre zonulari la cui esatta origine è incerta (*Hamor and Ehrhart, 2006*).

Il corpo vitreo aderisce saldamente alla capsula posteriore del cristallino, all'*ora ciliaris retinae*, all'emergenza del nervo ottico mentre è lassamente attaccato alla retina (*Cooley et al., 1992*).

Nel cavallo adulto, dalla papilla ottica alla capsula posteriore del cristallino si estende, attraversando l'umore vitreo, il *canale di Cloquet*, vestigio dell'arteria ialoidea che atrofizza tra i sei e i nove mesi di età (*Carastro et al., 2004*). Nei puledri fino ai quattro mesi sono frequenti altre strutture residuali ialoidee tra cui il *punto di Mittendorf*, ossia un'opacità grigio-bianca sulla capsula posteriore del cristallino nel punto in cui, nel feto, l'arteria ialoidea si inserisce sulla membrana ialoidea anteriore, una struttura fetale posteriore alla capsula del cristallino (*Cooley et al., 1992; Carastro et al., 2004*). Altre anomalie nei puledri riguardano veri e propri residui vascolari riempiti di sangue nel canale ialoideo (*Cooley et al., 1992*).

Nel cavallo anziano è probabile riscontrare nel corpo vitreo dei filamenti e degli aggregati galleggianti di cellule epiteliali pigmentate che si desquamano (*Cooley et al., 1992*).

Il corpo vitreo funge da sostegno di retina e cristallino nonché da mezzo di rifrazione della luce.

1.2.10 Retina

La retina è classificata come la tonaca nervosa del globo oculare essendo formata da neuroni. Assieme alla parte iniziale del nervo ottico e alla coroide forma il *fundus* dell'occhio, ossia il settore che viene esaminato tramite l'oftalmoscopio (*Carastro et al., 2004*). La porzione sensoriale, detta retina "ottica", riveste la superficie interna del globo oculare arrestandosi anteriormente a livello dell'*ora ciliaris*, dove si congiunge con la retina "ciliare" che non concorre alla visione ma costituisce l'epitelio di

rivestimento del corpo ciliare (*Hamor and Ehrhart, 2006*). La retina ciliare si prolunga nella retina “iridea” che consiste nell’epitelio posteriore dell’iride. Retina “ciliare” ed “iridea” formano insieme la retina “cieca”, cioè priva di fotorecettori (*Hamor and Ehrhart, 2006*).

Le fibre postgangliari dei neuroni presenti nella retina formano il nervo ottico convergendo a livello della *papilla ottica* o *disco ottico*, che nel cavallo è eccezionalmente di forma ellittica (*Cooley et al., 1992*). La papilla ottica è anche il punto di emergenza dei vasi che irrorano la retina (*Carastro et al., 2004*). La retina di cavallo è definita paurangiotica dal momento che è solo parzialmente vascolarizzata (*Wilkie, 2005*). Tra trenta e sessanta piccoli vasi si irradiano dalla papilla ottica e si estendono per una distanza pari a circa il doppio del diametro del disco (*Wilkie, 2005*). Tali vasi irrorano la regione peripapillare mentre il resto della retina dipende strettamente dalla sottostante coroide (*Wilkie, 2005*). Non a caso, la sottigliezza della retina equina, che non supera i 130 µm, facilita la diffusione dell’ossigeno (*Wilkie, 2005*).

La retina del cavallo comprende dieci strati. Il più interno è la *membrana limitante interna* data da processi delle cellule gliali e separata dal corpo vitreo da una lamina basale (*Hamor and Ehrhart, 2006*). Procedendo verso l’esterno si trovano lo *strato delle fibre nervose*, composto dagli assoni dei neuroni gangliari che formeranno il nervo ottico, e lo *strato delle cellule gangliari* dato dai somi dei neuroni gangliari (*Hamor and Ehrhart, 2006*). Il terzo strato è lo *strato plessiforme interno* nel quale avvengono le sinapsi tra cellule bipolari e gangliari, tra cellule amacrine e gangliari e tra amacrine stesse (*Hamor and Ehrhart, 2006*). Le cellule bipolari e le cellule amacrine sono degli interneuroni (*Sjastaad et al., 2010*). Le bipolari si trovano tra le cellule gangliari e le cellule contenenti fotorecettori (*Sjastaad et al., 2010*). Le cellule orizzontali, invece, sono interneuroni che collegano coni e bastoncelli (*Sjastaad et al., 2010*). I nuclei delle cellule amacrine e delle cellule orizzontali si trovano nello *strato interno nucleare*, dove tra di essi si trovano inoltre i nuclei delle cellule di Muller, ossia le cellule gliali (*Hamor and Ehrhart, 2006*).

Coni e bastoncelli prendono sinapsi con le cellule bipolari e orizzontali a livello dello *strato plessiforme esterno* (*Hamor and Ehrhart, 2006*). Nello strato esterno a questo, lo *strato nucleare esterno*, si trovano i somi di coni e bastoncelli (*Hamor and Ehrhart,*

2006). La *membrana limitante esterna* è formata dalle zonule aderenti tra i processi delle cellule di Muller e i fotorecettori (*Hamor and Ehrhart, 2006*). Lo strato successivo è diviso in *segmento interno* e *segmento esterno* (*Hamor and Ehrhart, 2006*). Il primo contiene un'alta densità di organelli come mitocondri e reticoli endoplasmatici lisci (REL) appartenenti a coni e bastoncelli mentre il secondo ospita i loro dischi membranosi sui quali sono posizionati i pigmenti che reagiscono con la luce (*Hamor and Ehrhart, 2006*). Lo strato più esterno della retina è l'*epitelio pigmentato* formato da cellule poligonali che giacciono su una lamina basale (*Hamor and Ehrhart, 2006*). La base delle cellule contiene numerose invaginazioni della membrana plasmatica che si interdigitano con i capillari dello strato coriocapillare corioideo (*Hamor and Ehrhart, 2006*). Diversamente, gli apici sono collegati da giunzioni aderenti ed occludenti (*Hamor and Ehrhart, 2006*). Ad eccezione di quelle che ricoprono il tappeto lucido, le cellule epiteliali contengono melanina (*Hamor and Ehrhart, 2006*). La funzione dell'epitelio è il trasporto di nutrienti a coni e bastoncelli, fagocitosi, assorbimento della luce da parte della melanina (*Hamor and Ehrhart, 2006*).

I bastoncelli permettono la visione in scala di grigi e sono molto più sensibili alla luce. I coni consentono la visione a colori ma la loro stimolazione richiede una maggior quantità di luce (*Sjastaad et al., 2010*). Il fotopigmento dei bastoncelli è la *rodopsina* mentre differenti tipi di coni hanno il proprio fotopigmento specifico (*Sjastaad et al., 2010*). Quando assorbono il fotone luminoso, i fotopigmenti vengono attivati attivando una proteina G (*Sjastaad et al., 2010*). Ne consegue l'innesco di una serie di reazioni a cascata che provocano infine l'iperpolarizzazione della cellula, in contrasto alla consueta successione di stimolazione-depolarizzazione che avviene nella maggior parte delle cellule dell'organismo (*Sjastaad et al., 2010*). In seguito, coni e bastoncelli prendono sinapsi con le cellule bipolari che trasmettono il segnale alle cellule gangliari, i cui assoni formano il nervo ottico (*Sjastaad et al., 2010*). Quest'ultimo si dirige al chiasma ottico, dove la maggior parte degli assoni si incrocia con quelli del nervo ottico controlaterale per giungere infine al corpo genicolato laterale nel talamo. I neuroni del talamo proiettano i propri assoni alla corteccia visiva primaria dove lo stimolo visivo viene elaborato.

1.3 Annessi oculari

1.3.1 Palpebre e congiuntiva

Le palpebre sono strutture cutanee volte a proteggere l'occhio, distribuire il film lacrimale e regolare la quantità di luce che penetra. Procedendo dall'esterno verso l'interno, esse sono formate dalla cute, dal connettivo sottocutaneo, dalla tonaca muscolare, dal piatto tarsale e dalla congiuntiva.

La cute palpebrale del cavallo è provvista di peli che possono essere raggruppati in tre tipologie: vibrisse, ciglia e peli dermici (*Gilger and Stoppini, 2005*). Le vibrisse sono peli specializzati nella captazione di stimoli tattili che vengono in seguito trasmessi al sistema nervoso centrale tramite il nervo trigemino (*Gilger and Stoppini, 2005*). Solitamente nella palpebra superiore sono presenti da due a quattro vibrisse a 2-3 cm dal canto mediale dell'occhio mentre lungo la palpebra inferiore se ne possono trovare da otto a dieci a circa 1 cm di distanza dalla rima palpebrale (*Gilger and Stoppini, 2005*). Diversamente le ciglia, che hanno una funzione essenzialmente protettiva nei confronti della cornea, sono posizionate lungo la rima palpebrale e sono molto meno numerose o addirittura assenti nella palpebra inferiore (*Gilger and Stoppini, 2005*). Associate ai follicoli ciliari si trovano le ghiandole di Zeis e di Moll. Le prime sono di tipo sebaceo e riversano il loro secreto nel lume del follicolo ciliare (*Cooley et al., 1992*). Le ghiandole di Moll sono ghiandole sudoripare modificate apocrine e riversano anch'esse il loro secreto nel lume follicolare (*Cooley et al., 1992*).

Al di sotto del sottocute si trova lo strato muscolare. Il principale muscolo palpebrale è l'orbicolare, che circonda la rima e determina, se contratto, la chiusura delle palpebre (*Gilger and Stoppini, 2005*). Il muscolo elevatore della palpebra superiore, invece, origina dorsalmente al canale ottico e si inserisce nella parte superiore del muscolo orbicolare (*Gilger and Stoppini, 2005*). La sua funzione è il sollevamento della palpebra superiore (*Gilger and Stoppini, 2005*). Un muscolo palpebrale liscio è il muscolo di Muller, che si dirige perpendicolarmente al margine palpebrale superiore e sostiene il tarso e, con esso, la palpebra (*Gilger and Stoppini, 2005*). L'orbicolare è innervato dal nervo facciale mentre l'elevatore della palpebra superiore dall'oculomotore (*Gilger and Stoppini, 2005*). Il muscolo di Muller è sotto il controllo del sistema nervoso simpatico, un cui deficit causa la sindrome di Horner che si manifesta con ptosi palpebrale, causata dal malfunzionamento del suddetto muscolo (*Gilger and Stoppini, 2005*). Altri segni

della sindrome di Horner nel cavallo includono sudorazione su testa e collo e aumento della temperatura cutanea nell'area denervata (*Gilger and Stoppini, 2005*).

Sotto la tonaca muscolare si trova il *tarso*, un'area di tessuto connettivo denso che conferisce rigidità e sostegno al margine palpebrale (*Gilger and Stoppini, 2005*; *Carastro et al., 2004*). Il tarso della palpebra superiore è più largo e di consistenza più rigida (*Gilger and Stoppini, 2005*). All'interno del piatto tarsale si trovano le ghiandole di Meibomio, deputate alla secrezione della parte lipidica del film lacrimale. Nella palpebra superiore sono presenti circa cinquanta ghiandole mentre in quella inferiore il loro numero si abbassa a circa quaranta (*Cooley et al., 1992*). Le ghiandole di Meibomio sono disposte in serie perpendicolarmente alla rima e i loro dotti escretori sboccano lungo il margine palpebrale formando la cosiddetta "*linea grigia*" (*Carastro et al., 2004*).

Lo strato più interno della palpebra è la congiuntiva, che rappresenta la membrana mucosa palpebrale. La *congiuntiva palpebrale* ricopre la superficie posteriore delle palpebre per poi ripiegarsi e proseguire sul globo oculare nella "*congiuntiva bulbare*" che si arresta a livello di limbo (*Gilger and Stoppini, 2005*). I punti di unione tra congiuntiva palpebrale e bulbare sono il "*fornice*" nella palpebra superiore e il "*cul de sac*" in quella inferiore (*Gilger and Stoppini, 2005*). La congiuntiva ricopre anche le facce anteriore e posteriore della membrana nittitante (*Gilger and Stoppini, 2005*).

Dal punto di vista istologico, la congiuntiva è costituita da una lamina propria di connettivo che sostiene un epitelio di tipo cilindrico stratificato non cheratinizzato, che diventa progressivamente pavimentoso avvicinandosi al limbo (*Cooley et al., 1992*). Tra le cellule epiteliali sono altresì presenti numerose cellule caliciformi mucipare ("*goblet cells*"), responsabili della produzione dello strato mucoso del film lacrimale (*Cooley et al., 1992*). La congiuntiva bulbare è spesso pigmentata (*Cooley et al., 1992*).

Prossimalmente al limbo, nel cavallo si trovano degli aggregati linfoidi e linfatici costituenti il "*tessuto linfatico associato alla congiuntiva*", che si attiva durante la risposta immunitaria (*Gilger and Stoppini, 2005*).

1.3.2 Terza palpebra

La terza palpebra, o *membrana nittitante*, è costituita da un'impalcatura cartilaginea

ricoperta da congiuntiva (*Gilger and Stoppini, 2005*). Oltre a proteggere l'occhio, la terza palpebra distribuisce il film lacrimale e rimuove eventuale materiale estraneo dalla superficie corneale. Essa origina dall'angolo medioventrale dell'occhio e scorre in direzione dorsolaterale qualora il globo oculare sia retratto, come avviene nell'ammiccamento (*Gilger and Stoppini, 2005*).

Nel cavallo, la cartilagine di sostegno della membrana nittitante è di tipo elastico (*Hamor and Ehrhart, 2006*) e presenta una forma a "T", con il tratto orizzontale che segue il margine libero della palpebra (*Gilger and Stoppini, 2005*).

La ghiandola superficiale della terza palpebra è una ghiandola lacrimale accessoria di tipo tubuloacinare che circonda la base della cartilagine a "T", con un ancoraggio che nel cavallo risulta essere notevolmente saldo (*Gilger and Stoppini, 2005; Hamor and Ehrhart, 2006*). Essa produce un secreto sieroso che contribuisce alla formazione del film lacrimale. Ventralmente alla ghiandola, è presente un pannicolo adiposo (*Gilger and Stoppini, 2005*).

La congiuntiva è ricca di cellule calciformi e si presenta frequentemente pigmentata lungo il margine libero; i cavalli con membrana nittitante priva di pigmentazione sono più soggetti a patologie di tipo infiammatorio provocate dalla luce solare (*Carastro et al., 2004*). L'epitelio congiuntivale è squamoso stratificato ma diventa cilindrico alla base della terza palpebra (*Cooley et al., 1992*).

1.3.3 Sistema nasolacrimale

Il film lacrimale è composto da tre strati. Il più interno, di tipo mucoso, è prodotto dalle *goblet cells* congiuntivali e garantisce l'aderenza del film alla superficie oculare; lo strato intermedio acquoso è secreto dalla ghiandola lacrimale ed ha funzione di nutrimento e protezione per la cornea; le ghiandole di Meibomio producono lo strato lipidico esterno che ritarda l'evaporazione delle lacrime (*Gilger and Stoppini, 2005*). Il sistema nasolacrimale è diviso in una parte deputata alla secrezione e in una parte volta al drenaggio. Nel cavallo, la ghiandola lacrimale è posta dorsolateralmente all'occhio e riversa il secreto nel fornice congiuntivale dorsale attraverso tre o cinque piccoli dotti (*Gilger and Stoppini, 2005*). Anche la ghiandola della terza palpebra appartiene al sistema nasolacrimale sebbene il suo contributo alla secrezione del film sia minimo

(*Gilger and Stoppini, 2005*).

Il cavallo è in grado di secernere una grande quantità di liquido lacrimale (*Gilger and Stoppini, 2005*).

L'apparato di drenaggio del sistema nasolacrimale è posto nella parte mediale dell'occhio. Non a caso, le palpebre si chiudono dalla commessura laterale verso quella mediale favorendo il deflusso del film lacrimale verso il sistema di drenaggio (*Gilger and Stoppini, 2005*). Dopo che i muscoli si rilassano, il liquido entra per capillarità nei *punti lacrimali*, due aperture di 2 mm di diametro posti sul margine delle palpebre superiore ed inferiore, a circa 9 mm dal canto mediale dell'occhio (*Gilger and Stoppini, 2005*). Attraverso i punti lacrimali, il liquido entra nei *canalicoli* che convergono per formare il *sacco lacrimale*, posto in una depressione dell'omonimo osso (*Carastro et al., 2004*). Da questa struttura trae origine il *dotto lacrimale* che passa per 7-8 cm nel canale lacrimale presente nelle ossa lacrimale e mascellare (*Gilger and Stoppini, 2005*). All'uscita da tale canale, il dotto forma un restringimento e poi prosegue nella sottomucosa nel meato medio (*Gilger and Stoppini, 2005*). Il dotto lacrimale sbocca con un orifizio ovale di una grandezza da 3 mm a 10 mm nel pavimento del vestibolo nasale, a livello della giunzione mucocutanea (*Cooley et al., 1992*).

1.3.4 Muscoli estrinseci dell'occhio

L'occhio di cavallo possiede quattro muscoli retti, due obliqui e un retrattore. I muscoli retti dorsale, laterale, ventrale e mediale originano in prossimità del foro ottico e si inseriscono anteriormente all'equatore (*Dyce et al., 2009*). Il muscolo obliquo dorsale origina anch'esso nei pressi del foro ottico, si porta anteriormente sulla parete dorsomediale dell'orbita per poi dirigersi lateralmente ed inserirsi sulla superficie dorsolaterale del globo oculare (*Dyce et al., 2009*). Se si contraesse da solo provocherebbe la deviazione mediale della parte dorsale dell'occhio (*Dyce et al., 2009*). Il muscolo obliquo ventrale, invece, prende origine da una depressione ventromediale dell'orbita per poi decorrere lateralmente sotto al muscolo retto ventrale ed andare ad inserirsi sulla porzione ventrolaterale del globo oculare (*Dyce et al., 2009*). La sua contrazione isolata da quella di altri muscoli causa la rotazione del globo attorno all'asse visivo e la deviazione laterale della parte dorsale (*Dyce et al., 2009*). Il muscolo

retrattore del bulbo trae origine in prossimità del foro ottico e termina sul globo posteriormente all'equatore formando un cono muscolare attorno al nervo ottico (Dyce et al., 2009).

I muscoli palpebrali sono anch'essi dei muscoli estrinseci dell'occhio e sono stati trattati nel paragrafo dedicato alle palpebre.

1.4 Vascolarizzazione dell'occhio

I vasi che irrorano globo ed annessi oculari derivano da due rami dell'arteria mascellare, vale a dire l'*arteria oftalmica esterna* e l'*arteria malare* (Dyce et al., 2009). Queste si suddividono in numerose arterie minori che si raggruppano in quelle destinate al globo, quelle destinate ai muscoli estrinseci e quelle dirette ad altri annessi oculari (Dyce et al., 2009). L'arteria oftalmica esterna penetra nell'orbita attraverso il foro alare e raggiunge con un'anastomosi l'arteria oftalmica interna (un vaso rudimentale che entra nell'orbita assieme al nervo ottico) (Dyce et al., 2009). Dopodichè, manda i seguenti rami diretti al bulbo oculare che perforano la sclera arrivando a coroide e retina:

-le *arterie ciliari posteriori brevi*, destinate alla coroide adiacente al nervo ottico nonché al nervo ottico stesso (Dyce et al., 2009);

-le *arterie ciliari posteriori lunghe*, che decorrono lungo la lamina sovracoroidea per raggiungere il corpo ciliare e l'iride (Schaller, 2008);

-le *arterie ciliari anteriori*, molto sviluppate nel cavallo rispetto alle altre specie domestiche, che entrano in prossimità del limbo e vascolarizzano la parte anteriore della coroide, il corpo ciliare e l'iride (Dyce et al., 2009). Anastomizzano formando il *circolo arterioso maggiore dell'iride* da cui dipartono rami che entrano nella pupilla e si dirigono al corpo ciliare (Dyce et al., 2009). Questi capillari che entrano nel limbo contribuiscono a nutrire per diffusione la cornea (Dyce et al., 2009).

Dall'arteria oftalmica esterna originano anche i *rami muscolari* diretti ai muscoli estrinseci (Schaller, 2008).

I vasi che irrorano gli annessi includono l'*arteria lacrimale* che si dirige rostrorodorsalmente ed entra nell'omonima ghiandola dopo aver dato origine alle arterie *palpebrale laterale superiore* ed *inferiore*, l'*arteria sopraorbitale* che esce dall'omonimo foro e vascolarizza la palpebra superiore e la già menzionata arteria

malare (non derivante dall'arteria oftalmica esterna) che si porta all'angolo mediale dell'occhio per poi vascolarizzare le palpebre e la zona circostante (Dyce et al., 2009).

1.5 Innervazione dell'occhio

Globo ed annessi oculari sono innervati da sei nervi cranici (Dyce et al., 2009).

Il *nervo ottico* è il secondo nervo cranico ed è formato dagli assoni dei neuroni gangliari della retina (Dyce et al., 2009).

Il *nervo oculomotore* (III) entra nell'orbita attraverso il forame orbitario e innerva i muscoli retto dorsale, retto mediale, retto ventrale, obliquo ventrale ed elevatore della palpebra superiore (Dyce et al., 2009).

Il *nervo trocleare* (IV) entra nell'orbita assieme all'oculomotore ed innerva il muscolo obliquo dorsale (Dyce et al., 2009).

L'occhio è altresì innervato dalla componente sensitiva della *branca oftalmica* del quinto nervo cranico, il *trigemino* (Dyce et al., 2009). La branca oftalmica manda diversi nervi a strutture particolari dell'occhio: i nervi ciliari lunghi diretti alla cornea e al bulbo in generale; il nervo lacrimale che innerva palpebre e congiuntiva; il nervo sovraorbitario che passa attraverso l'omonimo foro per giungere alla palpebra superiore e alla pelle mediale dell'orbita; il nervo infraorbitario che porta la sensibilità delle strutture presso il canto mediale dell'occhio; il nervo etmoidale che innerva la parte caudale delle cavità nasali (Dyce et al., 2009). Il nervo mascellare, che rappresenta la componente motoria del trigemino, invia anch'esso un ramo d'interesse per quanto riguarda l'innervazione dell'occhio: il ramo zigomatico, che manda a sua volta il ramo zigomatico-facciale che raggiunge il segmento lateroventrale delle palpebre e il ramo zigomatico-temporale che innerva la porzione anteriore della regione temporale (Dyce et al., 2009).

Il *nervo abducente* (VI) innerva i muscoli retrattore del bulbo e retto laterale (Dyce et al., 2009).

Il ramo auricolopalpebrale del *nervo facciale* (VII), invece, è diretto al muscolo orbicolare, che funge da sfintere delle palpebre (Dyce et al., 2009).

L'occhio riceve un'innervazione anche dal sistema nervoso autonomo. In particolare, le fibre simpatiche provengono dal ganglio cervicale e si dirigono al muscolo dilatatore

della pupilla e al muscolo orbitario, il quale è responsabile della protrusione del globo, della retrazione della terza palpebra e dell'apertura della fessura palpebrale (*Dyce et al., 2009*). Le fibre parasimpatiche, d'altro canto, derivano dal ganglio ciliare e, formando i nervi ciliari brevi, innervano i muscoli ciliare e costrittore della pupilla (*Dyce et al., 2009*).

2. Visita oftalmologica nel cavallo

E' fondamentale che ogni visita oftalmologica inizi dal segnalamento e dall'anamnesi. Nel segnalamento occorre indicare età, sesso, razza e attitudine del soggetto. L'anamnesi non deve prescindere dal riportare informazioni essenziali quali vaccinazioni eseguite, eventuali spostamenti nel territorio, ambiente in cui vive l'animale, terapie pregresse sia oftalmologiche che sistemiche, patologie passate, insorgenza e durata dell'attuale disturbo.

La visita procede con l'osservazione del cavallo libero in un ambiente ben illuminato. Lo scopo è rilevare eventuali anomalie nel modo in cui si sposta nello spazio e nella posizione della testa, che possono essere indici di deficit visivi (*Cooley et al., 1992*).

Il passo successivo della visita oftalmologica si compie ponendosi di fronte al cavallo al fine di esaminare la simmetria di testa, orbite, palpebre, globi oculari e pupille (*Miller Michau, 2005*). Particolare attenzione va riservata alla posizione delle ciglia superiori, le quali, in un cavallo sano, formano un angolo di 90° con la cornea (*Miller Michau, 2005*). Una variazione di tale angolo può essere indice di blefarospasmo, enoftalmo, esoftalmo o ptosi (*Miller Michau, 2005*).

E' necessario inoltre rilevare la frequenza dell'ammicciamento, seguire il movimento dei globi oculari e prestare attenzione all'eventuale presenza di scolo oculare o nasale, blefarospasmo, epifora (*Miller Michau, 2005*).

Terminate queste valutazioni, l'esaminatore deve porsi di lato al cavallo per visitare ogni occhio singolarmente (*Miller Michau, 2005*). Si inizia con l'ispezione di posizione, conformazione e movimento della palpebra per proseguire con la palpazione del margine orbitario e con la retropulsione del globo a palpebre chiuse, manovra che deve essere evitata in caso di lesioni corneali (*Miller Michau, 2005*).

2.1 Riflessi associati all'occhio

La stimolazione dei riflessi oculari serve per testare sia la funzionalità dei nervi cranici che la visione (*Miller Michau, 2005*). Per accreditare un'ipotesi di anomalie visive, è possibile effettuare il "test del labirinto", ponendo strategicamente nell'ambiente degli ostacoli per valutare in seguito come il cavallo si rapporti ad essi (*Carastro et al., 2004*).

L'efficienza visiva di un singolo occhio si controlla coprendo l'occhio controlaterale (Carastro et al., 2004).

Riflesso della minaccia

Il riflesso della minaccia si evoca avvicinando repentinamente una mano verso l'occhio, gesto che provoca la chiusura delle palpebre e un possibile movimento della testa. La porzione afferente è costituita dal nervo ottico mentre quella efferente dal nervo facciale che innerva il muscolo orbicolare (Miller Michau, 2005). Poiché lo stimolo passa attraverso la corteccia visiva, il riflesso della minaccia dovrebbe essere meglio definito "reazione". Una mancata risposta alla minaccia può indicare un danno alla retina, al nervo ottico, alla corteccia visiva, al nervo facciale o lesioni cerebellari (Miller Michau, 2005).

Nell'evocazione di questo riflesso è importante non creare correnti d'aria o toccare peli e vibrisse che stimolerebbero le afferenze del nervo trigemino provocando un test falsamente positivo (Carastro et al., 2004). Nel puledro, il riflesso della minaccia compare a due settimane d'età (Carastro et al., 2004).

E' opportuno valutare ogni quadrante del campo visivo dal momento che il deficit visivo può essere solo parziale (Carastro et al., 2004).

Riflesso pupillare

Prima di stimolare il riflesso pupillare, è opportuno valutare simmetria e dimensioni delle pupille (Miller Michau, 2005). Ciò si può effettuare al buio con l'utilizzo di un oftalmoscopio indiretto puntato verso il centro della fronte, ad una distanza di circa 2 m dal cavallo (Miller Michau, 2005). In questo modo si illuminano entrambi i riflessi tappetali e si può individuare un'eventuale anisocoria (Miller Michau, 2005).

Il riflesso pupillare si stimola puntando una sorgente luminosa (oftalmoscopio indiretto) verso un occhio. Ne conseguono una risposta diretta, che consiste nella miosi nell'occhio stimolato, e una risposta consensuale, ossia la miosi nell'occhio controlaterale (Miller Michau, 2005). Il nervo ottico costituisce la via afferente mentre quella efferente è data dal nervo oculomotore (Carastro et al., 2004). Quest'ultimo prende sinapsi con i neuroni del ganglio ciliare, i cui assoni formano il nervo ciliare diretto al muscolo costrittore della pupilla. Con il riflesso in questione si valuta l'integrità di

retina, nervo ottico, nucleo pretettale, nucleo e nervo oculomotore, ganglio e nervo ciliare (Miller Michau, 2005). La contrazione di entrambe le pupille a seguito della stimolazione di un solo occhio si spiega grazie alla comunicazione dei nuclei pretettali a livello mesencefalico (Miller Michau, 2005).

La pupilla del cavallo risponde alla luce in maniera bifasica: inizialmente si contrae velocemente ma in piccola misura e in seguito si contrae completamente ma con un movimento lento (Miller Michau, 2005). La risposta consensuale è di entità minore rispetto alla risposta diretta (Carastro et al., 2004).

Riflesso dell'abbagliamento

Il riflesso dell'abbagliamento si ottiene nel momento in cui il cavallo chiude le palpebre in seguito alla proiezione di un'intensa sorgente luminosa verso un occhio. La via afferente è il nervo ottico mentre quella efferente è il nervo facciale (Carastro et al., 2004). E' un riflesso subcorticale che coinvolge retina, nervo ottico, collicolo rostrale e nucleo e nervo facciale (Miller Michau, 2005).

Riflesso palpebrale

Il riflesso palpebrale coinvolge il nervo trigemino come via afferente il nervo facciale come via efferente (Carastro et al., 2004). Si stimola toccando la cute del canto mediale o laterale dell'occhio. In caso di mancata risposta alla minaccia, testare il riflesso palpebrale è utile per discernere se il problema sussista nelle strutture coinvolte nella visione o se sia a livello del nervo facciale (Carastro et al., 2004).

Riflesso corneale

Il riflesso corneale è di tipo subcorticale e si ottiene toccando la cornea, gesto a cui segue la chiusura delle palpebre e la retrazione del globo oculare. La via afferente è data dal nervo trigemino mentre quella efferente coinvolge i nervi facciale, responsabile della chiusura delle palpebre, e abducente, che provoca la retrazione del globo (Carastro et al., 2004).

2.2 Anestesia locoregionale

Il cavallo è dotato di un potente muscolo orbicolare che, provocando la chiusura delle palpebre, impedisce qualsiasi esame del globo oculare rendendo dunque necessario il ricorso all'anestesia locoregionale. I nervi che vengono più frequentemente anestetizzati sono l'auricolopalpebrale, branca del nervo facciale, e il sovraorbitario, ramo del trigemino (*Miller Michau, 2005*).

Gli anestetici più usati includono lidocaina al 2%, la cui azione inizia dopo quattro o sei minuti e dura dai sessanta ai novanta minuti, e mepivacaina, il cui effetto insorge dopo tre o cinque minuti e dura dai novanta ai centoventi minuti; possono essere usate anche procaina o bupivacaina (*Miller Michau, 2005*).

Il *blocco del nervo auricolopalpebrale* si effettua iniettando 2 ml di anestetico in una depressione anteriormente alla base dell'orecchio, dove il bordo caudale del processo coronoideo della mandibola incontra il processo zigomatico dell'osso temporale (*Miller Michau, 2005*). In questo punto, il nervo emerge dalla ghiandola parotide e decorre nel sottocute lateralmente all'estremità dorsale del processo coronoideo (*Miller Michau, 2005*). Il nervo può essere bloccato anche lateralmente al punto più alto della porzione più caudale dell'arco zigomatico (*Miller Michau, 2005*). Un terzo sito dove effettuare l'anestesia è il punto in cui il nervo giace sull'arco zigomatico caudale al processo dell'osso frontale (*Miller Michau, 2005*). Il blocco di questo nervo risulta nella paralisi del muscolo orbicolare della palpebra superiore che può quindi essere sollevata manualmente con facilità. La sensibilità resta inalterata poiché l'anestesia coinvolge un nervo motorio (*Miller Michau, 2005*).

Il *blocco del nervo sovraorbitario* è normalmente l'unico blocco di un nervo sensitivo richiesto per l'esame oculare (*Miller Michau, 2005*). Il sito di iniezione si localizza nel punto in cui il nervo fuoriesce dal forame sovraorbitario dell'osso frontale (*Miller Michau, 2005*). Per identificare tale punto si piazzano pollice e medio rispettivamente sul margine craniale e caudale del processo sovraorbitario e si spostano le dita medialmente finché non si percepisce un allargamento dell'osso (*Miller Michau, 2005*). A questo punto, si pone l'indice a metà tra le altre due dita e si palpa una depressione, che coincide con il forame sovraorbitario (*Miller Michau, 2005*). Per effettuare il blocco, si iniettano 2 ml di anestetico all'interno o appena fuori il forame (*Miller Michau, 2005*). In tal modo, si ottiene l'anestesia della parte centrale della palpebra

superiore.

Una volta effettuata l'anestesia locoregionale, si può procedere con l'esame del globo oculare. Inizialmente si ispeziona l'integrità della cornea, normalmente con l'aiuto di coloranti oftalmici. Si procede con l'esame del segmento anteriore, dapprima tramite transilluminatore e in seguito con la biomicroscopia che fornisce un'indagine più dettagliata. Il passo successivo è l'esame del segmento posteriore. Dopo l'ispezione del corpo vitreo si valuta il *fundus* con l'oftalmoscopia diretta o indiretta. Se necessario, si effettuano ulteriori esami specialistici.

2.3 Coloranti oftalmici

Il colorante più usato nella visita oftalmologica è la fluoresceina sodica, la quale, legandosi allo stroma corneale, è utile nella diagnosi di cheratite ulcerativa. Essendo idrofilica, la fluoresceina può accumularsi nell'umore acqueo e viene perciò utilizzata anche nell'esecuzione del Seidel test, che si attua per verificare la presenza di fuoriuscita di umore acqueo in caso di ferite a tutto spessore della cornea (*Miller Michau, 2005*). Un altro colorante è il Rosa Bengala che si lega alle cellule morte o degenerate e al muco (*Miller Michau, 2005*).

2.4 Esame del segmento anteriore

Le componenti del segmento anteriore vanno esaminate sia tramite transilluminazione che retroilluminazione. La transilluminazione è la tecnica attraverso la quale si ispezionano le strutture dell'occhio con un'illuminazione focale diretta. Si utilizza dunque un transilluminatore di Finoff o un oftalmoscopio diretto per rilevare eventuali anomalie grossolane di palpebre, nittitante, congiuntiva, cornea, camera anteriore, iride e cristallino (*Miller Michau, 2005*). La retroilluminazione, invece, è un fenomeno per cui la luce viene riflessa da strutture posteriori mentre l'osservatore è concentrato su strutture anteriori (*Miller Michau, 2005*). Questa tecnica permette di risaltare delle opacità ad esempio in cornea, umore acqueo o lente in quanto esse rappresentano un

ostacolo al ritorno della luce (*Miller Michau, 2005*).

In seguito, si procede ad un esame più dettagliato di annessi oculari e del segmento anteriore avvalendosi di una lampada a fessura (biomicroscopia) (*Miller Michau, 2005*). Questo strumento consiste in una sorgente luminosa, che può creare sia un'illuminazione diffusa sia un raggio di luce ristretto, e di un sistema binoculare di ingrandimento che può essere spostato in base alla sorgente luminosa (*Crispin, 2004*). La biomicroscopia è una tecnica più precisa perché, avendo un maggior potere d'ingrandimento, consente di visualizzare e localizzare lesioni di minor calibro (*Miller Michau, 2005*). Permette di osservare sia con transilluminazione che retroilluminazione. Per un corretto esame del cristallino e per rilevare eventuali lesioni sulla faccia posteriore dell'iride, spesso è necessario dilatare la pupilla con la somministrazione di tropicamide, un farmaco midriatico.

2.5 Esame del segmento posteriore

L'esame del segmento posteriore, che comprende l'esame del corpo vitreo e del *fundus oculare*, richiede la somministrazione di tropicamide. L'umore vitreo va valutato tramite transilluminazione. La valutazione del *fundus oculare*, ossia di corioide, retina e papilla ottica, si esegue mediante l'oftalmoscopio *diretto* o *indiretto* (*Miller Michau, 2005*). Il primo offre un'immagine reale, magnificata di circa quindici volte e dotata di un alto livello di dettaglio; tuttavia il campo di visualizzazione è ristretto (*Cooley et al., 1992*). E' utile quando si deve eseguire una valutazione rapida del fundus (*Miller Michau, 2005*). L'uso dell'oftalmoscopio indiretto richiede l'interposizione di una lente tra osservatore e paziente e si adoperava ponendosi a una distanza maggiore dall'occhio del cavallo (*Miller Michau, 2005*). Questo tipo di oftalmoscopio fornisce un'immagine rovesciata e meno ingrandita. Dunque il campo di visualizzazione è più ampio ma il dettaglio è minore (*Miller Michau, 2005*).

2.6 Tonografia

La misurazione della Pressione Intraoculare (IOP) è consigliata nei soggetti con edema

corneale, glaucoma, lussazione del cristallino o occhio rosso e dolorante (Miller Michau, 2005). Nel cavallo si usa un tonometro per appianazione (Tonopen), che stima la IOP calcolando la forza necessaria per spianare una precisa area corneale (Carastro et al., 2004). Fisiologicamente la IOP del cavallo va dai 16 mmHg ai 30 mmHg (Carastro et al., 2004). Prima di appoggiare il tonometro sulla superficie oculare è necessario avere effettuato il blocco del nervo auricolopalpebrale e instillare proparacaina 0.5% come anestetico locale (Carastro et al., 2004).

2.7 Esame del sistema lacrimale

Durante la visita oftalmologica, occorre assicurarsi della pervietà del sistema lacrimale tramite l'esecuzione del *test di Jones*: si applica fluoresceina sodica sulla superficie oculare e si misura il tempo in cui il colorante passa dai *punti lacrimali inferiori* fino alle narici (Miller Michau, 2005). Nel cavallo tale intervallo di tempo va dai cinque ai venti minuti (Miller Michau, 2005). Se la fluoresceina non fuoriesce dall'ostio nasale, si procede con il lavaggio manuale del dotto lacrimale per confermare il sospetto di ostruzione (Miller Michau, 2005).

2.8 Citologia

La citologia, al pari dell'esame colturale, riveste un ruolo di fondamentale importanza nella visita oftalmologica del cavallo poiché in questa specie la maggior parte delle patologie oculari è di tipo infettivo (Miller Michau, 2005). La citologia della superficie oculare è indicata in tutti i casi cheratite ulcerativa, scolo purulento oculare o nasolacrimale, blefarite, congiuntivite, masse su cornea, congiuntiva e nittitante (Miller Michau, 2005). Essa serve a riconoscere il tipo di cellule presenti e talvolta può rivelarsi un efficace strumento per la diagnosi eziologica nelle flogosi, come nel caso della presenza di batteri o ife funginee nel campione (Miller Michau, 2005). E' una tecnica molto vantaggiosa data la semplicità di esecuzione e la rapidità con cui fornisce risultati. I prelievi citologici nel cavallo vengono solitamente eseguiti in seguito al blocco del nervo auricolopalpebrale, che innerva il muscolo orbicolare, responsabile

della chiusura delle palpebre.

Esistono diversi strumenti per prelevare un campione citologico dalla superficie oculare. Il più semplice è un *tampone* (**Figura 2.1**) di cotone sterile ed umidificato che viene sfregato delicatamente sull'area da campionare per poi essere fatto rotolare su un vetrino portaoggetto. Nel caso in cui la lesione sia un'ulcera, il prelievo va effettuato sia al centro che alla periferia della stessa, tenendo presente che i batteri si moltiplicano a livello dei margini della lesione (*Crispin, 2004*). L'uso del tampone è la tecnica meno invasiva, ideale per i soggetti riluttanti alle manipolazioni.



Figura 2.1: prelievo tramite tampone

(https://www.vetstream.com/images-equis/thumbs/21_165453-thumb.jpg).

Un'altra metodica prevede l'utilizzo della *spatola di Kimura* (**Figura 2.2**), la quale consente non solo di prelevare cellule da strati più profondi ma anche di campionare con maggiore precisione aree più ristrette della superficie oculare (*Miller Michau, 2005*). Tuttavia, questa tecnica comporta un maggior rischio di danneggiare l'occhio e il campione stesso (*Miller Michau, 2005*). Nel momento in cui si striscia la spatola sul vetrino, occorre prestare difatti attenzione a non esercitare troppa pressione. Se il soggetto è particolarmente agitato può essere utile somministrare un anestetico locale.



Figura 2.2: prelievo tramite spatola di Kimura

(http://veteriankey.com/wp-content/uploads/2016/08/B9780323013178500067_f03-02-9780323013178.jpg).

Lo strumento maggiormente usato per la citologia oculare nel Cavallo è il *cytobrush* (**figura 2.3**), un dispositivo a forma di spazzolino che viene applicato sulla lesione da campionare, eventualmente in seguito all'instillazione di anestetico locale, e viene poi strisciato sul vetrino (*Miller Michau, 2005*). I campioni prelevati con tale metodica hanno dimostrato parametri citologici superiori rispetto ai campioni ricavati con tamponi cotonati o spatole (*Miller Michau, 2005*).



Figura 2.3: cytobrush per citologia oculare.

I campioni vengono poi fissati e colorati. Le colorazioni maggiormente usate per i preparati citologici sono quelle “tipo Romanowsky” come Diff Quick, Wright-Giemsa, May-Grunwald-Giemsa, che consentono il riconoscimento di batteri, ife funginee, lieviti, cellule infiammatorie e neoplastiche (*Miller Michau, 2005*).

Per ottenere maggiori informazioni circa il riconoscimento dei batteri si ricorre alla colorazione di Gram mentre elementi micotici richiedono spesso coloranti speciali come la PAS (Periodic acid–Schiff) o l’argento metenammina di Gomori (*Miller Michau, 2005*).

3. Patologie oculari che si diagnosticano con l'ausilio della citologia

3.1 Cheratite ulcerativa

La cheratite ulcerativa è uno dei principali problemi oculari nel cavallo (*Andrew et al., 2005*). La predisposizione di questa specie a sviluppare tale patologia è dovuta alla particolare prominenza della cornea che la espone a traumi con conseguente infiammazione (*Andrew et al., 2005*). In presenza di un'ulcera, la citologia è fortemente consigliata, specialmente per discernere un'etiologia batterica da una fungina.

In caso di ulcera batterica, oltre alla colorazione May-Grünwald-Giemsa è utile impiegare la colorazione di Gram per riconoscere il tipo di batterio responsabile dell'infezione, permettendo così di impostare una terapia antibiotica appropriata (*Andrew et al., 2005*). Tra i Gram-, *Pseudomonas aeruginosa* è considerato uno dei patogeni più virulenti della cornea equina (*Andrew et al., 2005*). Aderisce alle cellule dell'epitelio corneale tramite i pili e, dopo essere penetrato, migra attraverso le cellule fino ad arrivare allo stroma (*Andrew et al., 2005*). Anche i batteri Gram + sono in grado di provocare un danno altrettanto grave alla cornea, compromettendo spesso la visione (*Andrew et al., 2005*). *Staphylococcus aureus* sopravvive a lungo nei tessuti grazie alla sua resistenza alla fagocitosi e alla sua capacità di produrre ialuronidasi; *Streptococcus* spp. produce esotossine che possono provocare ipopion sterile (*Andrew et al., 2005*).

Le micosi rappresentano un'altra causa di cheratite ulcerativa nel cavallo. I funghi sono spesso dei commensali o giungono tramite corpi estranei di origine vegetale (*Andrew et al., 2005*). I microrganismi maggiormente riscontrati appartengono ai generi *Aspergillus* e *Alternaria* (*Andrew et al., 2005*). All'esame citologico, si possono riscontrare le ife funginee presenti in basso numero o intrecciate in ingenti ammassi e si nota il loro aspetto settato e ramificato (*Andrew et al., 2005*). L'infezione della cornea da parte di organismi fungini avviene usualmente in seguito ad un trauma che ha provocato la rimozione di alcune aree dell'epitelio (*Andrew et al., 2005*). Le ife funginee, dunque, invadono lo stroma moltiplicandosi; il danno ingente al tessuto stromale avviene ad opera delle proteasi prodotte dai funghi e dagli enzimi di leucociti e cheratociti (*Andrew et al., 2005*). Questi organismi patogeni sono stati maggiormente ritrovati nelle parti più

profonde dello stroma, in prossimità della membrana di Descemet (*Andrew et al., 2005*). Si è ipotizzato che questa localizzazione sia dovuta in primo luogo ad un maggior tropismo dei funghi nei confronti dei glicosaminoglicani dello stroma profondo e in secondo luogo al tentativo di evadere l'immunità locale presente sulla superficie oculare (*Andrew et al., 2005*).

Sono stati riportati casi di cheratiti ulcerative date da infezioni miste, vale a dire sia batteriche che micotiche (*Andrew et al., 2005*).

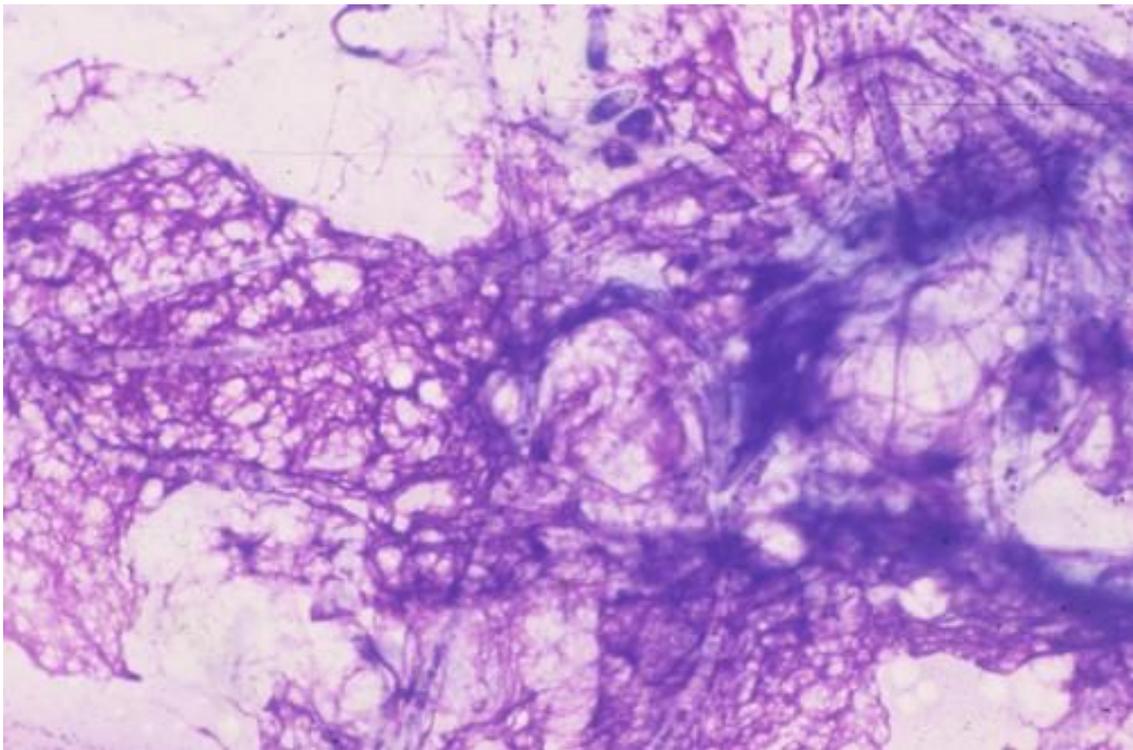


Figura 3.1: ife di *Aspergillus* spp. in un preparato citologico ottenuto per *scraping* da un cavallo con cheratite micotica

(immagine tratta da <http://www.merckvetmanual.com/mvm/multimedia/v4733645.html>, Courtesy of Dr. Sameeh M. Abutarbush).

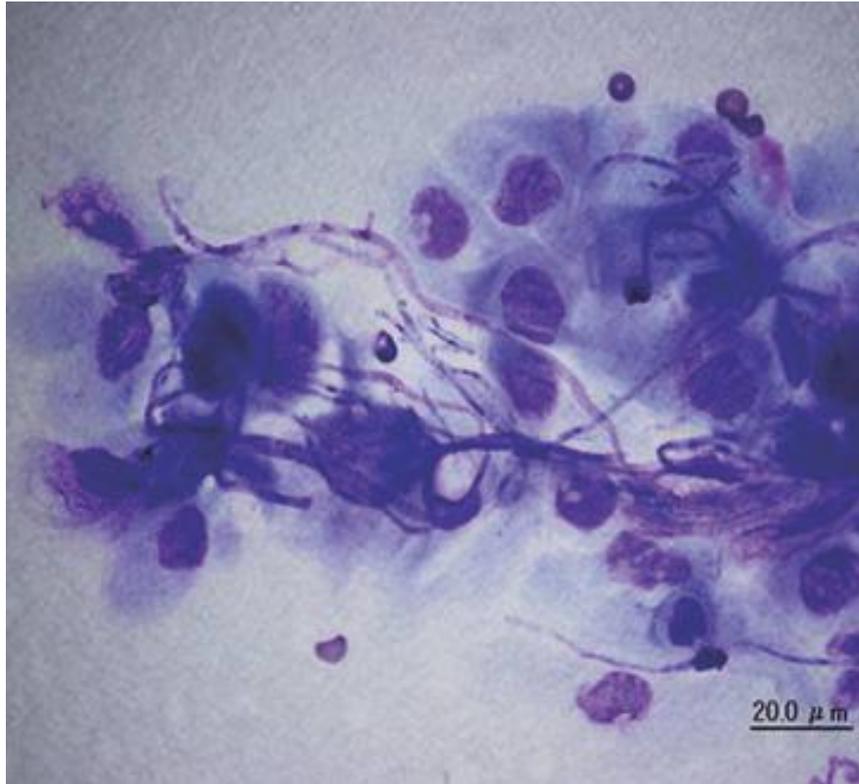


Figura 3.2: ife fungine non settate ritrovate in una citologia per *scraping* (Rapid Giemsa, bar = 20 μm) (Wada et al., 2011).

3.2 Cheratite e cheratocongiuntivite eosinofilica

La cheratite eosinofilica è una patologia rara nel cavallo, rappresentando solo lo 0.2% dei problemi corneali equini secondo il *Veterinary Medical Database* (Andrew et al., 2005). Nonostante la periferia sia la prima zona intaccata dalla patologia, le lesioni si concentrano al centro della cornea (Andrew et al., 2005). Esse consistono in ulcere coperte da placche simildifteriche bianche e necrotiche (Andrew et al., 2005).

La diagnosi di questa patologia si esegue con l'esame citologico, che dimostra numerosi eosinofili, pochi mastociti, un numero variabile di neutrofilo, linfociti, plasmacellule, macrofagi (Andrew et al., 2005). Le placche sono costituite da fibre di collagene subepiteliali infiltrate di eosinofili e neutrofilo e sono circondate da materiale acellulare, granuloso ed intensamente eosinofilo (Andrew et al., 2005).

Nella cheratocongiuntivite eosinofilica, la congiuntiva presenta un infiltrato cellulare analogo a quello della cornea (Andrew et al., 2005).

3.3 Congiuntivite

Nel cavallo la congiuntivite è frequentemente secondaria ad altre patologie di maggior gravità, quali glaucoma, uveite, dacriocistite e cheratite (Gilger and Stoppini, 2005). Tale fenomeno si spiega grazie all'elevata presenza nella congiuntiva di numerosi vasi e follicoli linfatici, che reagiscono in presenza di una infiammazione di un tessuto adiacente (Gilger and Stoppini, 2005).

In caso di congiuntivite cronica, una volta scartate le cause di congiuntivite secondaria, si procede con l'esame colturale e la citologia (Gilger and Stoppini, 2005). Tra gli agenti che causano congiuntivite si annoverano batteri (*Streptococcus equi*, *Moraxella equi*), virus (*EHV tipo 1 e 2*, *Arterivirus*), funghi (*Aspergillus*, *Rhinosporidium seeberi*), parassiti (*Onchocerca spp.*) (Gilger and Stoppini, 2005). Inoltre, esistono forme immunomediate come la congiuntivite follicolare, la congiuntivite eosinofila e la congiuntivite allergica (Gilger and Stoppini, 2005).

3.4 Neoplasie

La citologia della superficie oculare è un utile strumento diagnostico anche in caso di neoplasie. Secondo il *Veterinary Medical Database*, i tumori rappresentano l'8% delle patologie corneali nel cavallo e la razza che ne è più frequentemente affetta è l'Appaloosa (Andrew et al., 2005). Il tumore corneale più comune (91.4 % dei casi) è il *carcinoma a cellule squamose (squamous cell carcinoma, SCC)*, riscontrato prevalentemente a livello del limbo, l'area della superficie oculare maggiormente predisposta a neoplasie nel cavallo (Andrew et al., 2005). Si presenta come una massa rilevata dall'aspetto simile a un ciottolo, di colore rosa-bianco e con superficie generalmente ruvida (Andrew et al., 2005). Il SCC si sviluppa anche a livello di congiuntiva bulbare, tant'è vero che il 34-37% di questo tipo di tumore si trova su di essa o a livello limbare (King et al., 1991; Mosunic et al. 2004). Benchè la diagnosi di SCC sia basata sui segni clinici e, dopo l'escissione, sull'istologia, nei casi in cui si sospetti una cheratite eosinofila o immunomediata la citologia è fortemente consigliata per differenziare le due patologie, in quanto l'approccio terapeutico è diverso (Montgomery, 2014).

Tumori meno frequenti della cornea sono i tumori vascolari, il mastocitoma, il melanoma e il linfosarcoma (*Andrew et al., 2005*).

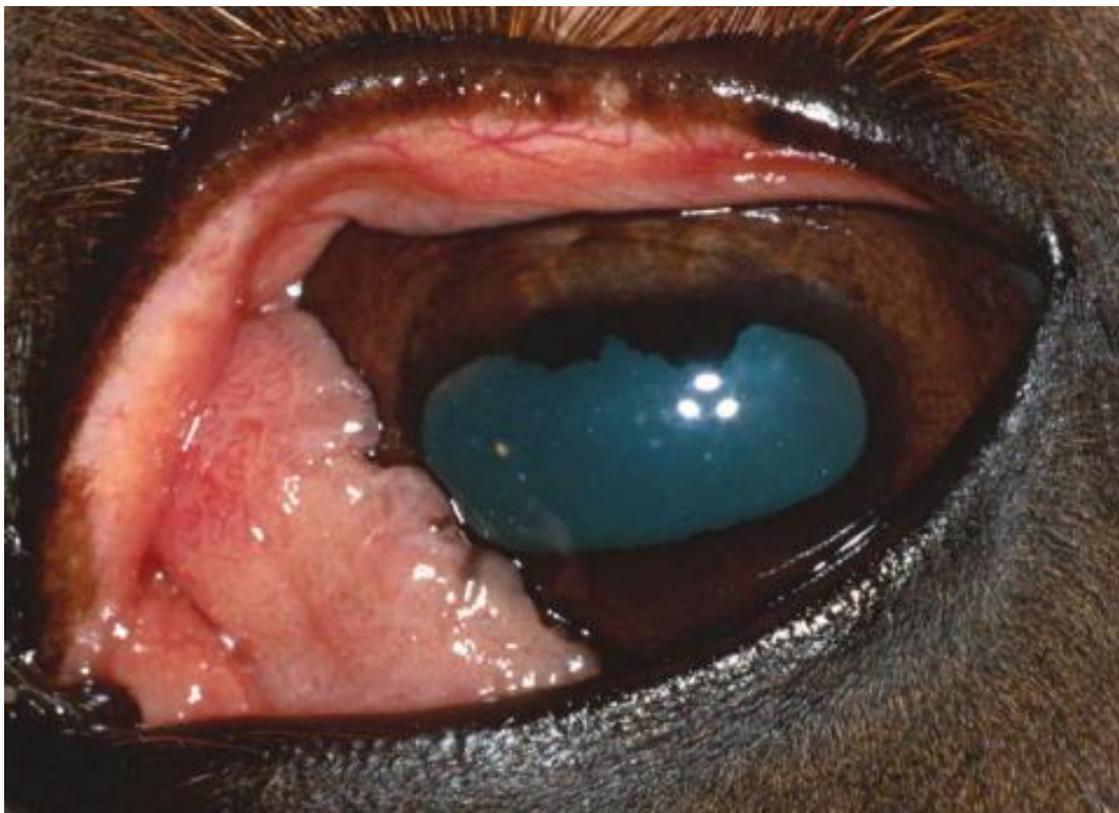


Figura 3.3: esempio di carcinoma squamoso oculare nel cavallo
(http://www.blindhorses.org/eye_disease.html).

4. Citologia ad impressione

La citologia ad impressione è una metodica innovativa che consiste nella rimozione di cellule epiteliali dalla superficie oculare attraverso l'apposizione di un filtro di cellulosa. In medicina umana, questa tecnica è ampiamente utilizzata fin dal secolo scorso. Il primo impiego risale al 1954, anno in cui Larmande e Timsit la utilizzarono per la diagnosi di carcinoma squamoso limbare (*Larmande and Timsit, 1954*). Una dettagliata descrizione della metodica ad impressione giunse negli anni Settanta, quando il dottor Peter E. Egbert dell'università di Stanford dimostrò come eseguire una "semplice biopsia congiuntivale" in un paziente con sindrome dell'occhio secco appoggiando un pezzetto di filtro Millipore sulla superficie congiuntivale, in modo tale da staccare uno o due strati di cellule epiteliali tra le quali si trovavano anche le cellule caliciformi mucipare, oggetto della sua ricerca (*Egbert et al., 1977*). Dopodichè, Egbert spiegò come fosse possibile colorare il filtro con la colorazione PAS e osservarlo al microscopio ottico per quantificare le *goblet cells* (*Egbert et al., 1977*).

Un grande passo in avanti nel campo della citologia ad impressione è stato fatto da Nelson e colleghi che nel 1983, e successivamente nel 1988 dopo opportune modifiche, misero a punto un sistema di classificazione delle cellule congiuntivali sulla base del grado di metaplasia squamosa, analizzando cambiamenti metacromatici nel citoplasma, rapporto nucleo/citoplasma, alterazioni morfologiche del nucleo e infine numero, forma e colore delle *goblet cells* presenti (*Nelson et al., 1983; Nelson, 1988; Calonge et al., 2004*). La superficie congiuntivale fu così stadiata con una numerazione da 0 a 3, dove 0 e 1 indicavano una condizione fisiologica delle cellule mentre 2 e 3 denotavano alterazioni patologiche (*Nelson et al., 1983; Nelson, 1988; Calonge et al., 2004*).

Nel 1988, Adams e colleghi idearono un altro sistema di classificazione delle cellule congiuntivali ottenute con la citologia ad impressione focalizzandosi sugli stessi criteri considerati da Nelson, con l'aggiunta della valutazione della presenza o meno di cellule infiammatorie (*Adams et al., 1988; Calonge et al., 2004*). Negli anni successivi, si cominciò così a far riferimento all' "indice di Nelson-Adams".

Attualmente, le principali patologie oculari per le quali, in medicina umana, si richiede diagnosi con citologia ad impressione includono carcinoma squamoso, sindrome dell'occhio secco, infezioni virali, deficit di cellule staminali limbari, deficit di vitamina A, forme allergiche, melanosi congiuntivale e melanoma (*McKelvie, 2003*).

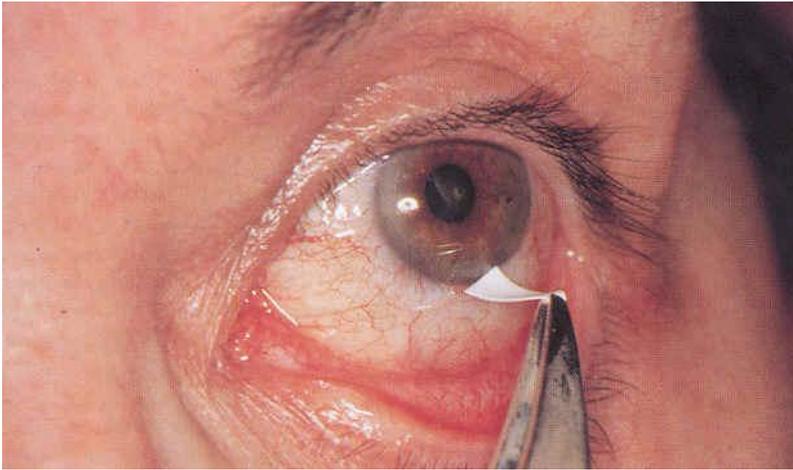


Figura 4.1: prelievo per citologia ad impressione su occhio umano (<http://members.xoom.it/Ocumed/serv01.htm>).

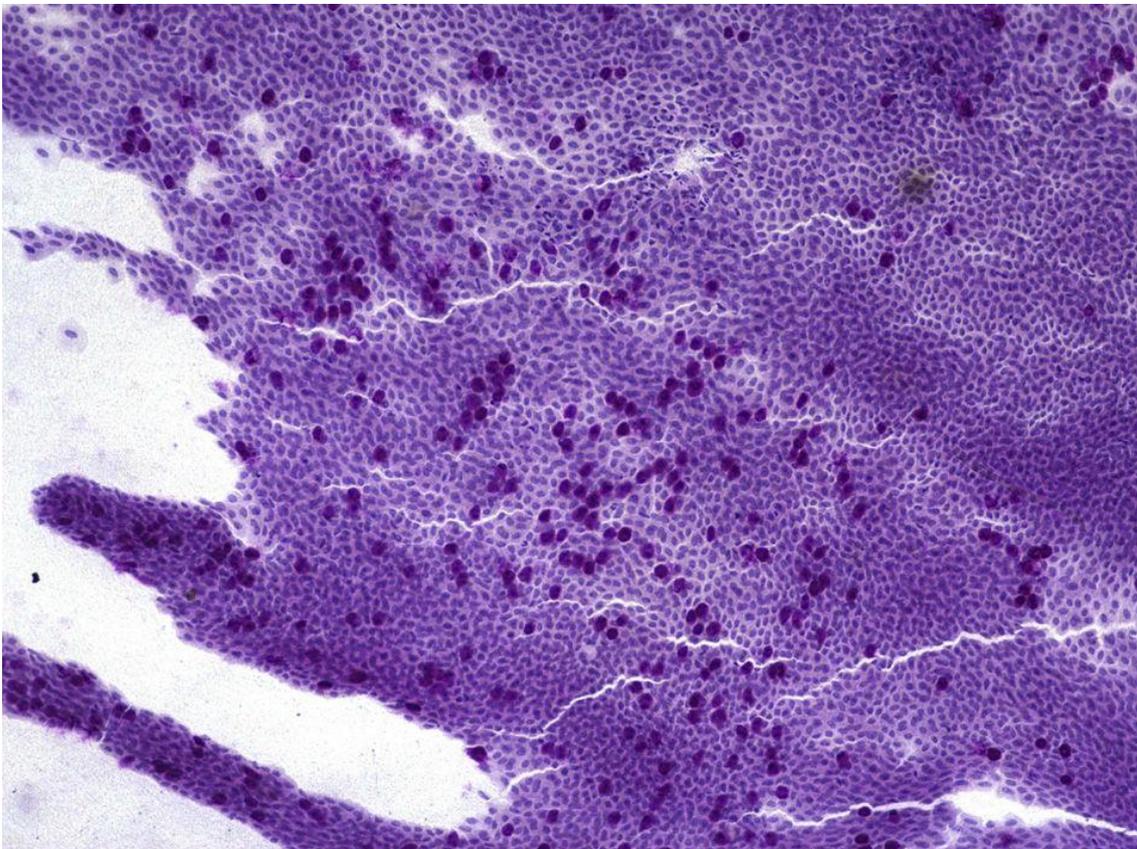


Figura 4.2: esempio di citologia ad impressione di congiuntiva umana (PAS-emetossilina, 400X) (*Muniesa et al., 2014*).

In medicina veterinaria, la citologia ad impressione è impiegata nella clinica dei piccoli animali. Nel 2005 Bolzan e colleghi eseguirono un lavoro di campionamento della congiuntiva bulbare, dopo instillazione di anestetico locale, su venti cani sani riuscendo infine a dimostrare la praticabilità della citologia ad impressione, a standardizzare il protocollo e a rilevare il pattern citologico normale della congiuntiva ottenuto con tale metodica (Bolzan *et al.*, 2005). Utilizzarono filtri Millipore con pori di 0,45 µm e i campioni furono colorati con PAS ed ematossilina, colorazioni utilizzate anche da Nelson nel 1983 (Bolzan *et al.*, 2005).

La citologia ad impressione fu adottata inoltre nel 2011 da Balicki e colleghi per valutare cornea e congiuntiva in cani affetti da cheratocongiuntivite secca (Balicki *et al.*, 2011). In questo studio furono impiegati filtri Millipore con pori del diametro di 25 µm e la colorazione utilizzata fu la PAS (Balicki *et al.*, 2011). Ciascun campione fu poi classificato secondo l'indice di Nelson-Adams, che fu applicato anche alle cellule corneali (Balicki *et al.*, 2011). Balicki e colleghi rilevarono che la gravità dei sintomi clinici dei pazienti era rispecchiata dalla citologia, sotto forma di metaplasia dell'epitelio, assenza di *goblet cells* e altre alterazioni morfologiche delle cellule; di conseguenza la citologia ad impressione è risultata un valido metodo non invasivo per monitorare il decorso della cheratocongiuntivite secca nel cane (Balicki *et al.*, 2011).

Per quanto riguarda la specie felina, è stato condotto uno studio sulla citologia ad impressione congiuntivale nel 2002, ad opera di Brandão e colleghi che compararono i risultati ottenuti da prelievi effettuati senza l'utilizzo di anestesia topica, nella regione centrale della congiuntiva palpebrale di trenta gatti (Brandão *et al.*, 2002). Al termine dello studio, poterono asserire che il prelievo era stato veloce, accurato e non invasivo e attestarono inoltre che dai risultati emergeva la presenza di cellule epiteliali intermedie e superficiali organizzate in *clusters* (Brandão *et al.*, 2002).

Un'ulteriore delucidazione circa il modo ottimale per eseguire la citologia ad impressione congiuntivale nel gatto è stata fornita da Eördögh e colleghi nel 2015, quando eseguirono uno studio sugli effetti dell'anestetico locale e sul diverso valore diagnostico dei preparati ottenuti da tipi diversi di filtri (Eördögh *et al.*, 2015). Non fu riscontrata alcuna relazione diretta tra la misura dei pori dei filtri utilizzati e la cellularità dei campioni (Eördögh *et al.*, 2015). Poterono constatare tuttavia che i campioni con migliore cellularità e conservazione erano ottenuti in seguito ad anestesia

topica, dopo aver asciugato la congiuntiva con un tampone cotonato (*Eördögh et al., 2015*).

Un lavoro di Perazzi e colleghi si era posto come obiettivo il confronto tra la citologia oculare per impressione e quella effettuata col cytobrush in cane e gatto privi di patologie oculari (*Perazzi et al., in press*). L'obiettivo principale fu eseguire il confronto tra le due metodiche esaminando in maniera quantitativa e qualitativa le popolazioni cellulari nei campioni ottenuti con l'uno e l'altro metodo (*Perazzi et al., in press*). Un ulteriore scopo fu valutare eventuali effetti dell'anestetico sulla citologia ad impressione (*Perazzi et al., in press*). Tutti i prelievi furono eseguiti a livello di limbo superiore; per quelli ad impressione furono utilizzati filtri di 8 mm di diametro e pori di 0,45 μm (*Perazzi et al., in press*). Cellularità e conservazione risultarono migliori nei campioni ottenuti per impressione (*Perazzi et al., in press*). Diversamente, caratteri citoplasmatici e nucleari erano meglio apprezzabili nei campioni ricavati con cytobrush; ciò può essere dovuto all'impossibilità di avere un ingrandimento maggiore di 200X del filtro a causa del suo largo spessore (*Perazzi et al., in press*). Il conteggio delle *goblet cells* fu più semplice ad effettuarsi nella citologia ad impressione (*Perazzi et al., in press*). L'uso dell'anestesia topica non diede segno di condizionare le caratteristiche morfologiche cellulari (*Perazzi et al., in press*).

L'uso della metodica ad impressione è stato esteso anche nelle specie non convenzionali. Nel 2005, difatti, fu utilizzata da Park e Ko al fine di studiare i cambiamenti dell'epitelio corneale nel coniglio in seguito ad infezione con *Herpes simplex virus* (**Figura 4.5**) (*Park and Ko, 2005*).



Figura 4.3: prelievo limbare da un cane per citologia ad impressione.

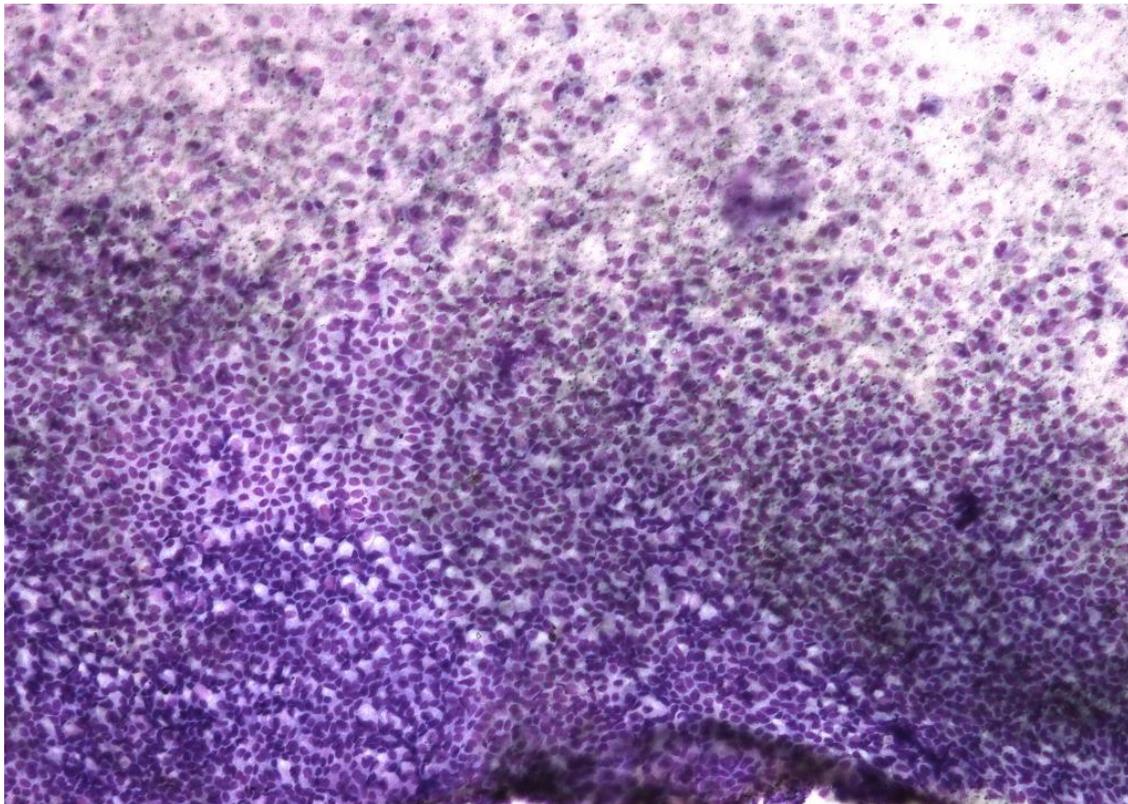


Figura 4.4: citologia ad impressione di limbo di cane. In basso si notano le cellule congiuntivali, in alto quelle corneali (May-Grunwald-Giemsa).

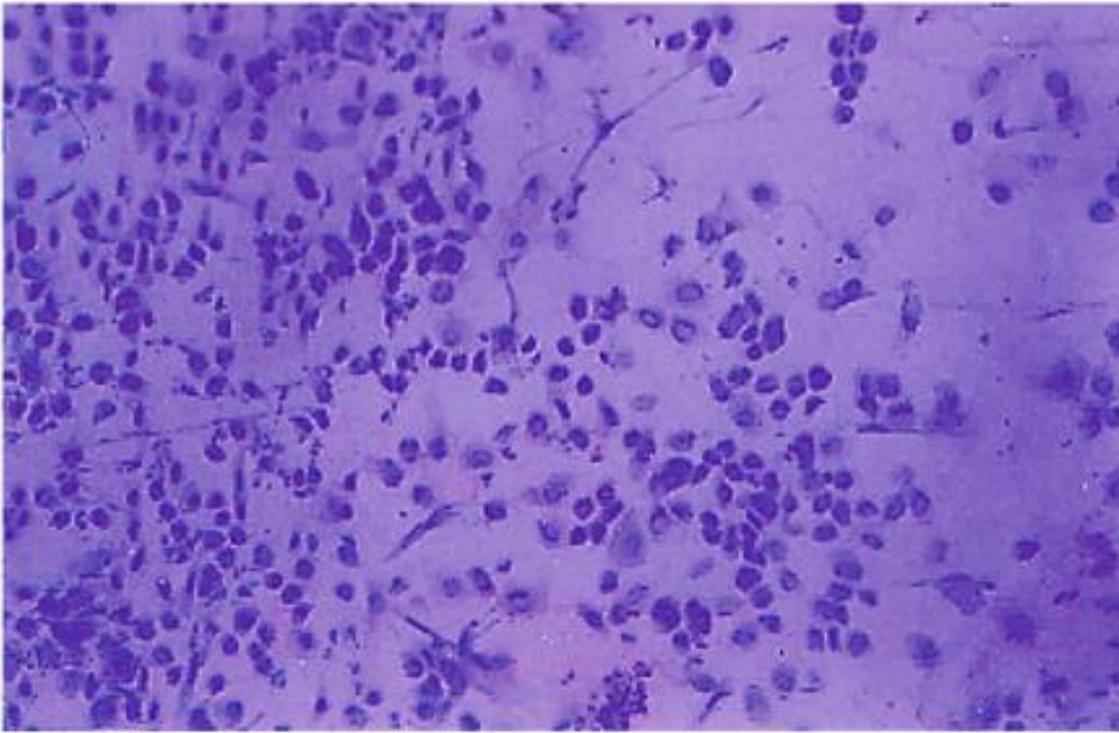


Figura 4.5: citologia ad impressione di cornea di coniglio. Si notano cellule infiammatorie e cellule epiteliali degenerate, tre giorni dopo l'inoculazione dell'*Herpes simplex virus* (H-E, 100X), (*Park and Ko, 2005*).

Nell'ambito dei grandi animali, non sono stati riportati casi di utilizzo della citologia ad impressione come strumento diagnostico nella pratica clinica. Tuttavia, son stati condotti studi per definire i parametri morfologici delle cellule prelevate con tale metodica nei ruminanti. Nel 2002 il dottor Michael J. Doughty della Glasgow-Caledonian University valutò in maniera quantitativa e qualitativa, includendo anche la microscopia elettronica, le cellule raccolte per impressione dalla congiuntiva bulbare di ottantanove occhi bovini provenienti da un macello (*Doughty, 2002*). Prima del campionamento, gli occhi furono suddivisi in cinque gruppi ognuno dei quali fu sottoposto ad uno specifico trattamento durante il trasporto dal macello al laboratorio (*Doughty, 2002*). Il protocollo in seguito al quale furono ottenuti i risultati migliori alla citologia prevedeva il trasporto degli occhi ancora umidi in buste di plastica, la riuniformazione ripetuta della superficie oculare in camera umida per quindici-venti minuti a 37°C ed infine l'esposizione all'aria per cinque minuti prima del campionamento (*Doughty, 2002*). I filtri, di tipo Biopore, erano stati tinti con la colorazione Giemsa e dopo l'osservazione al microscopio rivelarono che le cellule congiuntivali bulbari sono larghe e dotate di un basso rapporto nucleo/citoplasma (*Doughty, 2002*). L'aspetto apparentemente sconcertante di tale studio fu l'intervallo di circa un'ora e mezza tra la morte dell'animale e l'esecuzione del test; tuttavia, questo distacco temporale è considerato accettabile sia in base all'aspetto dell'epitelio corneale all'istologia e all'esaminazione con microscopio elettronico sia in base alla risposta all'irrigazione della superficie corneale nel test dell'occhio enucleato (*Doughty, 1996; Doughty, 1997*).

Lo stesso Doughty condusse, nel 2014, un'ulteriore sperimentazione su occhi provenienti dal macello (*Doughty, 2014*). L'obiettivo di quest'ultimo studio era confrontare, sulla base di valutazioni morfometriche, cellule congiuntivali ottenute con lo *scraping* e quelle ricavate per impressione (*Doughty, 2014*). Finalità aggiuntiva era valutare l'effetto dell'anestetico locale sui parametri citologici (*Doughty, 2014*). Per fare ciò, Doughty si avvalse di ottantotto occhi di pecora (*Doughty, 2014*). Di questi, ne furono campionati trentotto affinché fossero testati con verde di lissamina e rosa bengala per valutare la morte delle cellule congiuntivali; il fatto che fossero risultati tutti negativi a questo test lascia desumere che il materiale oggetto dello studio fosse ben conservato e di buona qualità (*Doughty, 2014*). I restanti cinquanta occhi, ad alcuni dei

quali fu applicato l'anestetico, furono dedicati alla raccolta dei campioni citologici: vennero effettuati trenta strisci mediante una spatola in acciaio e venti prelievi per impressione con filtri Biopore appoggiati sulla congiuntiva bulbare per dieci secondi e poi lasciati asciugare per due minuti (Doughty, 2014). Tutti i campioni furono in seguito fissati con metanolo o etanolo, risciacquati e colorati con la Giemsa (Doughty, 2014). Dopo la visualizzazione al microscopio ottico, emersero differenze morfologiche tra le cellule ottenute con i due diversi metodi oggetto di studio: le cellule ricavate con lo *scraping* risultarono mediamente più larghe di quelle prelevate col filtro ($27.7 \pm 1.3 \mu\text{m}$ versus $21.7 \pm 1.5 \mu\text{m}$, senza anestetico) ed erano caratterizzate anche da un nucleo più largo ($10.6 \pm 0.5 \mu\text{m}$ (fissate con metanolo), 10.5 ± 0.6 (fissate con etanolo) versus $8.7 \pm 0.5 \mu\text{m}$, senza anestetico) (Doughty, 2014). Differenze simili furono rilevate anche nei casi in cui i campionamenti furono eseguiti dopo aggiunta di anestetico (Doughty, 2014). Tali differenze, tuttavia, non sono da attribuirsi ad una diversa profondità a cui sia stato eseguito il campionamento bensì al fatto che le cellule ottenute con *scraping* siano separate le une dalle altre e disseminate sul vetrino (Doughty, 2014). Tale ipotesi è accreditata dal fatto che, comparando le cellule ottenute con i due metodi, il rapporto nucleo/citoplasma sia pressoché uguale (Doughty, 2014).

Da questo studio non è emerso, tra l'altro, alcun effetto rilevante provocato dalla somministrazione di anestetico sulla morfologia cellulare (Doughty, 2014).

Nel 2012, Gonçalves e colleghi eseguirono uno studio sulla citologia ad impressione oculare applicata alla specie bovina e a quella equina. In particolare, campionarono quindici bovini e quindici cavalli privi di patologie oculari allo scopo di valutare quantità e qualità di cellule della congiuntiva bulbare (Gonçalves *et al.*, 2012). Alcuni campioni furono colorati secondo la tecnica di Giemsa e altri col metodo di Schorr e le cellule furono valutate individualmente ad un ingrandimento di 400X per la conta e per la loro classificazione per tipologia (cellula epiteliale, cellula caliciforme, eritrocita, cellula infiammatoria) (Gonçalves *et al.*, 2012). La conta standard fu di ottocento cellule per animale (Gonçalves *et al.*, 2012). Al termine dello studio, gli autori conclusero che i campioni ottenuti con la citologia ad impressione erano caratterizzati da buona cellularità e conservazione, adeguate per la conta e la classificazione cellulare (Gonçalves *et al.*, 2012). Inoltre il campionamento fu ben tollerato dagli animali tanto che fu necessario solamente un loro contenimento di tipo meccanico senza ricorrere ad

anestetici topici (*Gonçalves et al., 2012*).

Un ulteriore studio, tramite citologia ad impressione, della congiuntiva bulbare del cavallo è stato condotto nel 2014 da Napoleone e colleghi, che campionarono gli occhi di venticinque cavalli sani utilizzando filtri di tipo Millipore con pori di 0,45 μm (*Napoleone et al., 2014*). Per facilitare il campionamento ricorsero all'instillazione di anestetico locale (*Napoleone et al., 2014*). In seguito, alcuni campioni furono colorati con la PAS e altri con ematossilina ed eosina (*Napoleone et al., 2014*). Dopo la visualizzazione dei campioni al microscopio ottico, gli autori constatarono che la cellularità era buona e le cellule erano omogeneamente distribuite e ben conservate (*Napoleone et al., 2014*). L'assenza di eritrociti provò che il campionamento non fu invasivo ma ben tollerato dall'animale, grazie anche all'utilizzo dell'anestetico (*Napoleone et al., 2014*). Non furono rilevate *goblet cells* nei campioni, ma si rinvennero invece cellule epiteliali congiuntivali, cellule infiammatorie, detriti cellulari e nuclei nudi (*Napoleone et al., 2014*). Un'ulteriore osservazione appurata dagli autori fu l'influenza della colorazione sulla valutazione citologica: la PAS conferiva al campione un fondo molto scuro mentre ematossilina ed eosina davano un fondo più chiaro, che meglio permetteva la valutazione delle caratteristiche morfologiche cellulari e la differenziazione delle cellule infiammatorie (*Napoleone et al., 2014*). L'anno successivo, Napoleone e colleghi condussero un altro studio allo scopo di confrontare la metodica ad impressione e il cytobrushing sulla congiuntiva di cavallo (*Napoleone et al., 2015*). Furono campionati quindici cavalli; i prelievi per impressione furono raccolti e colorati con le stesse modalità adottate l'anno precedente mentre i campioni ottenuti con cytobrush furono eseguiti da congiuntive palpebrale e bulbare e poi colorati con ematossilina ed eosina (*Napoleone et al., 2015*). Gli autori, al termine dello studio, conclusero che entrambe le metodiche offrivano campioni con buona cellularità e conservazione (*Napoleone et al., 2015*). Neutrofili ed eosinofili, nuclei nudi e detrito cellulare furono ritrovati sia in campioni ricavati per impressione che in altri ottenuti con cytobrush mentre *goblet cells* erano presenti solo in preparati raccolti con *cytobrushing* (*Napoleone et al., 2015*). Dal punto di vista del campionamento, la metodica ad impressione comportò molte più difficoltà, legate alla necessità di tenere l'occhio aperto per posizionare correttamente il filtro (*Napoleone et al., 2015*). Si richiedeva spesso un contenimento meccanico degli animali (*Napoleone et al., 2015*).

Valutando i casi in cui la citologia ad impressione è stata impiegata sia nella pratica clinica che in studi sperimentali, se ne sono potuti mettere in luce vantaggi e svantaggi rispetto al tradizionale *scraping*. In confronto a quest'ultima tecnica, la citologia ad impressione è semplice e non-invasiva e ciò consente il suo utilizzo ripetuto, il quale è richiesto ad esempio nel monitoraggio del decorso delle patologie oculari e nella valutazione dell'efficacia di un trattamento (*Balicki et al., 2011*). Inoltre, al momento dell'osservazione al microscopio, essa può fornire maggiori informazioni circa la topografia, il pattern cellulare e la relazione tra cellule epiteliali e altre componenti cellulari (*Bolzan et al., 2005*).

D'altro canto, la tecnica ad impressione richiede maggiore esperienza tecnica laboratoristica (*Bolzan et al., 2005*). Un'altra nota negativa è la difficoltà ad esaminare dettagli citoplasmatici e nucleari delle cellule, difetto che potrebbe rendere difficoltosa la diagnosi di patologie per le quali è importante valutare i dettagli cellulari più fini, come ad esempio le patologie neoplastiche (*Perazzi et al., in press*). Attualmente, un altro svantaggio riscontrato nella metodica ad impressione è il costo, decisamente superiore a quello del cytobrush.

5. Scopo della tesi

In letteratura sono riportati pochi studi sull'applicazione della citologia ad impressione nel cavallo e non vi è alcuna notizia che testimoni un suo utilizzo nella clinica equina. Il metodo fino ad oggi più diffuso per la citologia oculare in questa specie è il cytobrush, che tuttavia è invasivo e non fornisce dettagli sulla topografia e sul pattern cellulari.

Lo scopo di questa tesi è fornire dei dati qualitativi e quantitativi circa la citologia ad impressione di cornea e congiuntiva nel cavallo sano e confrontarli con quelli inerenti alla citologia ottenuta dagli stessi soggetti con il tradizionale cytobrush. Tramite questo confronto, è possibile mettere in luce vantaggi e svantaggi dell'una e dell'altra tecnica in relazione alla specie equina. Il presente lavoro è volto inoltre a valutare il pattern citologico normale ottenuto tramite tecnica ad impressione degli epitelii corneale e congiuntivale su soggetti sani. Solo l'acquisizione dei parametri normali relativi alla citologia ad impressione, derivanti da una superficie oculare sana, permette l'identificazione di alterazioni patologiche.

Un ulteriore scopo di questa tesi è determinare in che misura l'esperienza dell'operatore influenzi i risultati della valutazione citologica, in modo tale da valutare se questa metodica possa essere utilizzata anche da operatori con poca esperienza o se è necessario che i campioni ottenuti tramite citologia ad impressione siano valutati da osservatori esperti e per stimare la ripetibilità della metodica ad impressione nella specie equina.

6. Materiali e metodi

6.1 Raccolta dei campioni

I campioni sono stati prelevati da cavalli macellati, in un periodo di tempo compreso tra il 03/02/2016 e il 18/07/2016.

Il campionamento è avvenuto circa dieci minuti post-mortem da ventiquattro cavalli, di cui nove puledri e quindici adulti. Dopo che ogni carcassa è stata appesa, la testa è stata distaccata, agganciata alla guidovia e scuoiata ed a questo punto della catena di macellazione sono stati eseguiti, per ogni testa, un prelievo ad impressione sull'occhio sinistro e uno con cytobrush sull'occhio destro. Tutte le cornee degli occhi esaminati risultavano normali all'ispezione.

Per i prelievi ad impressione sono stati impiegati filtri sterili rotondi del diametro di 8 mm e con pori di 0.45 μm (Millicell® CM 0.4 μm , Millipore, Bedford, Massachusetts). Tali filtri sono fissati al termine di un tubo di plastica sul quale è stato applicato un punto nero, che viene indirizzato, al momento del prelievo, verso “le ore dodici” della superficie oculare, in modo tale da eseguire un campionamento corretto e ripetibile (*Perazzi et al., in press*). Ogni filtro è stato appoggiato sul limbo dorsale per circa due secondi e poi rimosso velocemente. Dopodiché, è seguita la fissazione del preparato tramite KitoFix® (Kaltek, Padova, Italy), un fissativo sotto forma di spray. Una volta asciugatosi, ciascun campione è stato riposto nella propria confezione.

Per quanto riguarda i prelievi effettuati sull'occhio destro, è stato fatto rotolare un cytobrush (Kitobrush®, Kaltek, Padova, Italy) da sinistra verso destra sul limbo, in modo tale da campionare l'analoga zona campionata per impressione sull'occhio controlaterale. Ogni brush è stato poi strisciato su un vetrino portaoggetto e il preparato così ottenuto è stato lasciato asciugare all'aria per circa quattro minuti. In seguito i campioni sono stati riposti in un portavetrini.

Con questa procedura, sono stati raccolti ventiquattro campioni per impressione e altrettanti tramite cytobrush. Sono stati tutti numerati e contrassegnati in modo tale da riconoscere i campioni ottenuti con l'una e l'altra metodica dal medesimo soggetto.

Tutti i campionamenti sono stati eseguiti dallo stesso oftalmologo al fine di standardizzare la metodica. Un secondo operatore è intervenuto per immobilizzare le teste al momento del prelievo e per sollevare la palpebra superiore, quando questa fosse

ancora presente dopo lo scuoiamento.

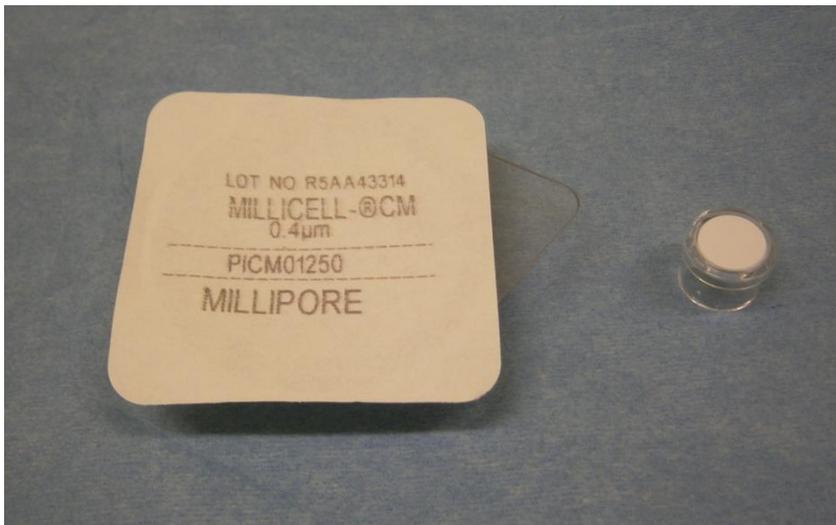


Figura 6.1: filtro Millicel Millipore.



Figura 6.2: fissativo citologico.



Figura 6.3: cytobrush.

6.2 Colorazione

Per i campioni di questo studio è stata scelta una colorazione di Romanowsky, in particolare la May-Grunwald-Giemsa.

Riguardo ai filtri, per prima cosa è stato applicato un punto chirurgico sulla membrana in corrispondenza del punto nero presente sul supporto di plastica. Ciò è stato fatto per poter orientare il filtro dopo la colorazione. Il primo passaggio della colorazione May-Grunwald-Giemsa infatti prevede un passaggio in metanolo, che cancella il punto nero che indicava la porzione di filtro diretta verso “le ore dodici”. Successivamente i filtri sono stati riposti all’interno di biocassette per istologia specifiche per l’inclusione in paraffina di occhi. Queste biocassette infatti sono più alte delle biocassette standard e quindi possono contenere il filtro. In seguito le biocassette con all’interno il filtro sono state fissate, tre per volta, con un filo di rame ad un cestello poi inserito in un coloratore automatico (Leica Autostainer XL®, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Wetzlar, Germany). Al termine della colorazione, ogni membrana è stata ritagliata dal tubo di plastica con l’utilizzo di un bisturi ed è stata poi adagiata su un vetrino portaoggetto con l’accuratezza di direzionare il punto chirurgico verso la banda sabbiata. Il filo da sutura è stato poi rimosso. Su ciascun preparato è stato apposto un vetrino coprioggetto dopo l’applicazione di una goccia di mezzo di montaggio sintetico, composto da resine acriliche al 5% disciolte in xilene al 55% (Eukitt® O. Kindler GmbH Ziegelhofstrasse 214 - D -79110 Freiburg – Germany). I campioni sono stati infine immersi per pochi secondi in xilene e poi lasciati asciugare per una notte.

Per ciò che concerne i campioni raccolti con cytobrush, essi sono stati inseriti direttamente nel coloratore automatico. Al termine della colorazione, sono stati coperti con vetrino coprioggetto analogamente a quanto eseguito per i filtri.

6.3 Valutazione citologica

I campioni sono stati valutati al microscopio ottico da due osservatori con diverso livello di esperienza, uno studente con un livello di conoscenza basilare e un patologo clinico diplomato al college europeo. Prima di procedere con l’osservazione, i numeri dei campioni ottenuti per impressione sono stati momentaneamente cambiati affinché i

preparati ricavati con le due metodiche dallo stesso soggetto venissero valutati indipendentemente l'uno dall'altro, evitando quindi il fenomeno di *recall bias*.

I filtri sono stati esaminati con l'obiettivo 20X mentre i preparati ottenuti col cytobrush con l'obiettivo 60X. Per ogni vetrino sono state valutate separatamente le popolazioni di cellule congiuntivali e corneali, attribuendo un punteggio da 0 a 3 a ciascuna delle seguenti caratteristiche: cellularità, conservazione, dimensioni, forma, rapporto nucleo/citoplasma, colore del citoplasma, presenza di granuli, cromatina. Per quanto riguarda la popolazione congiuntivale sono state valutate anche le *goblet cells*, assegnando un punteggio a numerosità, dimensioni, forma, rapporto nucleo/citoplasma, colore citoplasma, forma del nucleo, cromatina. In ogni campione è stata controllata anche la presenza di cellule infiammatorie.

Il sistema di classificazione è illustrato nella tabella 6.1.

	0	1	2	3
Cellularità	<20%	20%-50%	50%-75%	>75%
Conservazione	0%	<25%	25%-50%	>50%
Dimensioni		piccole	medie	grandi
Forma		tonde	ovali	poligonali
N/C				
Colore citoplasma	chiaro	leggermente basofilo	basofilo	
Granuli	assenti	rari	occasionalmente	frequenti
Cromatina	dispersa	finemente granulare o reticolare/punteggiata	granulare/reticolare	a zolle/addensata
Goblet cells*				
Cellule infiammatorie	assenti	presenti		

Tabella 6.1: sistema di classificazione delle cellule nei campioni.

* Le *goblet cells* sono state valutate in questo modo:

	0	1	2	3
Numerosità				
Dimensioni		piccole	medie	grandi
Forma		tonde	ovali	poligonali
N/C				
Colore citoplasma	chiaro	leggermente basofilo	basofilo	
Forma nucleo		tondo	allungato	
Cromatina	dispersa	finemente granulare o reticolare/punteggiata	granulare/reticolare	a zolle/addensata

6.4 Analisi statistica

Prima di procedere con l'analisi statistica, è stata ristabilita la numerazione originaria dei campioni ottenuti per impressione, al fine di ripristinare la corrispondenza tra filtro e campione prelevato con cytobrush ottenuti dal medesimo soggetto.

L'analisi statistica è stata svolta su due fronti: confrontare i dati ricavati dai campioni ottenuti con le due metodiche oggetto di studio e valutare il grado di concordanza tra i dati raccolti dai due osservatori. Per raggiungere il primo obiettivo è stato fatto ricorso al test di Mann-Whitney mentre per il secondo è stato usato il "k pesato di Cohen". Il livello di coerenza tra i due osservatori è stato classificato seguendo l'articolo di Landis e Kock (1977): $k < 0$ corrisponde a mancanza di concordanza ("*poor*"); $0 < k < 0.2$ corrisponde a lieve concordanza ("*slight*"); $0.21 < k < 0.40$ corrisponde a discreta concordanza ("*fair*"); $0.41 < k < 0.60$ corrisponde a moderata concordanza ("*moderate*"); $0.61 < k < 0.8$ corrisponde a sostanziale concordanza ("*substantial*"); $0.81 < k < 1.00$ corrisponde a quasi perfetta concordanza ("*almost perfect*").

Tutte le analisi statistiche sono state eseguite grazie ad un software di analisi (SPSS, version 12.0.0, SPSS Inc, Chicago, IL, USA and MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium), considerando significativo un valore P minore di 0,05.

7. Risultati

I prelievi per questo studio sono stati effettuati su ventiquattro cavalli macellati, di cui quindici adulti e nove puledri. I prelievi citologici sono stati effettuati sempre nell'area del limbo superiore, sull'occhio sinistro utilizzando la citologia per impressione e sull'occhio destro mediante cytobrush. Al termine della raccolta, sono stati ottenuti quarantotto preparati citologici, di cui ventiquattro ricavati per impressione e altri ventiquattro attraverso spazzolamento con cytobrush. Il filtro dei dispositivi per la citologia ad impressione è stato completamente adagiato senza difficoltà sulla zona limbare permettendo così una corretta raccolta del campione.

Al microscopio ottico, alcuni campioni mostravano una leggera contaminazione ematica che tuttavia non ha interferito in alcun modo con la valutazione citologica.

Secondo il primo osservatore, con conoscenze basilari, il 63% (15/24) dei filtri ha buona cellularità (gradi 2 e 3) e il 79% (19/24) di essi è ben conservato (gradi 2 e 3) mentre il 25% (6/24) e l'8% (2/24) dei filtri hanno dimostrato rispettivamente buona cellularità e conservazione per quanto riguarda solo una delle due popolazioni studiate (congiuntivale e corneale). Secondo l'analisi del secondo osservatore, dotato di maggiore esperienza, il 25% (6/24) dei filtri aveva buona cellularità e il 66% (16/24) di essi aveva buona conservazione; il 33% (8/24) e il 29% (7/24) di essi, invece, presentavano rispettivamente buona cellularità e conservazione per quanto riguarda una sola popolazione cellulare.

Le due popolazioni cellulari, nettamente separate, rilevate nei filtri sono compatibili con la popolazione corneale e quella congiuntivale (**Figura 7.1**). La prima è risultata tendenzialmente organizzata in un monostrato, con cellule grandi, poligonali, dotate generalmente di rapporto N/C pari a 3 (l'area del citoplasma è uguale a circa tre volte quella del nucleo), citoplasma chiaro, nucleo tondo centrale o paracentrale e cromatina granulare o finemente granulare (**Figura 7.2**). Questa popolazione è stata considerata valutabile, secondo il primo osservatore, nell'88% dei campioni (21/24) mentre per il secondo osservatore nel 96% di essi (23/24). La presenza di granuli di pigmento nel citoplasma, che nei campioni ottenuti per impressione è stata notata solo nelle cellule corneali, riguarda il 54% dei filtri (13/24) secondo il primo osservatore e il 13% di essi (3/24) per il secondo osservatore.

Le cellule congiuntivali, d'altro canto, si sono presentate con citoarchitettura

pavimentosa, piccole dimensioni, forma tonda od ovale, citoplasma generalmente leggermente basofilo, rapporto nucleo/citoplasma pari a 1, nucleo paracentrale e cromatina da dispersa a finemente granulare o granulare. Questo tipo cellulare è risultato valutabile nel 96% dei campioni (23/24) sia per il primo che per il secondo osservatore (**Figura 7.3**).

Disseminate tra la popolazione di cellule congiuntivali, sono state rilevate rare cellule caliciformi mucipare contrassegnate dalle seguenti caratteristiche morfologiche: medie dimensioni, forma tonda od ovale, citoplasma moderato e leggermente eosinofilo, nucleo tondo o allungato in posizione periferica, cromatina dispersa o finemente granulare. La presenza delle *goblet cells* è stata riscontrata nel 71% dei campioni (17/24) dal primo osservatore e nel 21% (5/24) dal secondo osservatore (**Figura 7.4**).

Nel 25% dei campioni ottenuti per impressione (6/24), tra l'altro, sono stati notati, sia dal primo che dal secondo osservatore, dei granulociti neutrofili.

La presenza di batteri è stata segnalata in un filtro (4%) solamente dal primo osservatore.

Per quanto riguarda i campioni ottenuti con cytobrush, per il primo osservatore il 50% (12/24) presentava buona cellularità e il 75% (18/24) buona conservazione; il 4% (1/24) e il 13% (3/24) di essi erano dotati rispettivamente di buona cellularità e conservazione per quanto riguarda solo una popolazione cellulare.

Secondo il secondo osservatore, invece, il 29% (7/24) e il 63% (15/24) dei campioni ottenuti con cytobrush godevano rispettivamente di buona cellularità e buona conservazione mentre il 42% (10/24) e l'8% (2/24) di essi dimostravano rispettivamente buona cellularità e conservazione per quanto riguarda una sola popolazione di cellule.

In questo tipo di preparati, le due popolazioni cellulari non sono nettamente separate tra di loro come nei filtri (**Figura 7.5**). Le cellule corneali si presentano isolate od organizzate in gruppi. Di forma poligonale, esse sono caratterizzate da una moderata o ingente quantità di citoplasma chiaro. Il nucleo è tondo e centrale, con cromatina da finemente granulare a granulare/reticolare o dispersa. Le cellule corneali sono risultate visibili nel 96% dei campioni (23/24) ottenuti con cytobrush nell'osservazione compiuta dal primo operatore e nel 79% dei preparati (19/24) nella valutazione del secondo operatore.

Le cellule congiuntivali, nei campioni ottenuti con cytobrush, si organizzano in papille,

in aggregati di due o tre cellule o si presentano isolate. Di piccole o medie dimensioni, esse hanno forma tonda od ovale, citoplasma leggermente basofilo o basofilo, nucleo centrale e cromatina per lo più finemente granulare. Sono risultate valutabili nell'83% dei campioni ricavati con *cytobushing* (20/24) secondo il primo osservatore e nel 96% di essi (23/24) per il secondo osservatore.

Nel citoplasma delle cellule ottenute con cytobrush sono risultati molto frequenti i granuli di pigmento; nella valutazione del primo osservatore sono stati notati nel 63% dei campioni (15/24) e solamente nelle cellule corneali mentre nell'osservazione del secondo operatore sono stati riscontrati nel 59% dei ventiquattro preparati (14/24) e in entrambe le popolazioni cellulari.

La presenza di *goblet cells* è stata notata solamente dal primo osservatore, in due campioni (8%) (**Figura 7.6**).

Le cellule infiammatorie sono state riscontrate nel 29% dei campioni (7/24) nell'osservazione del primo operatore e nel 21% di essi (5/24) in quella del secondo. Si tratta essenzialmente di granulociti neutrofili ad eccezione di un campione, nel quale è stata notata la presenza di plasmacellule da entrambi gli osservatori.

Inoltre, per il primo osservatore, nel 25% dei preparati (6/24) ottenuti con cytobrush sono stati rinvenuti batteri, associati in due casi anche alla presenza di spore fungine; il secondo osservatore ha evidenziato la presenza di batteri nel 4% dei campioni (1/24) (**Figura 7.7**).

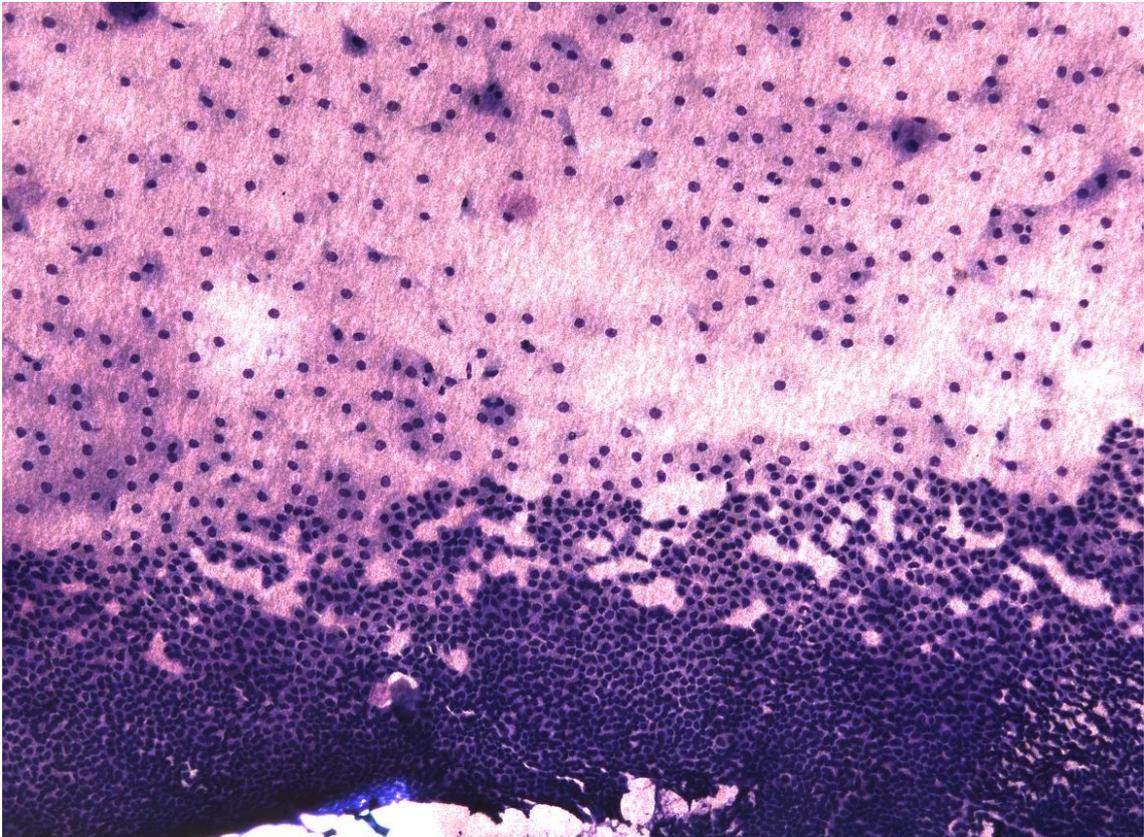


Figura 7.1: citologia per impressione del limbo. In alto si notano le cellule corneali e in basso quelle congiuntivali.

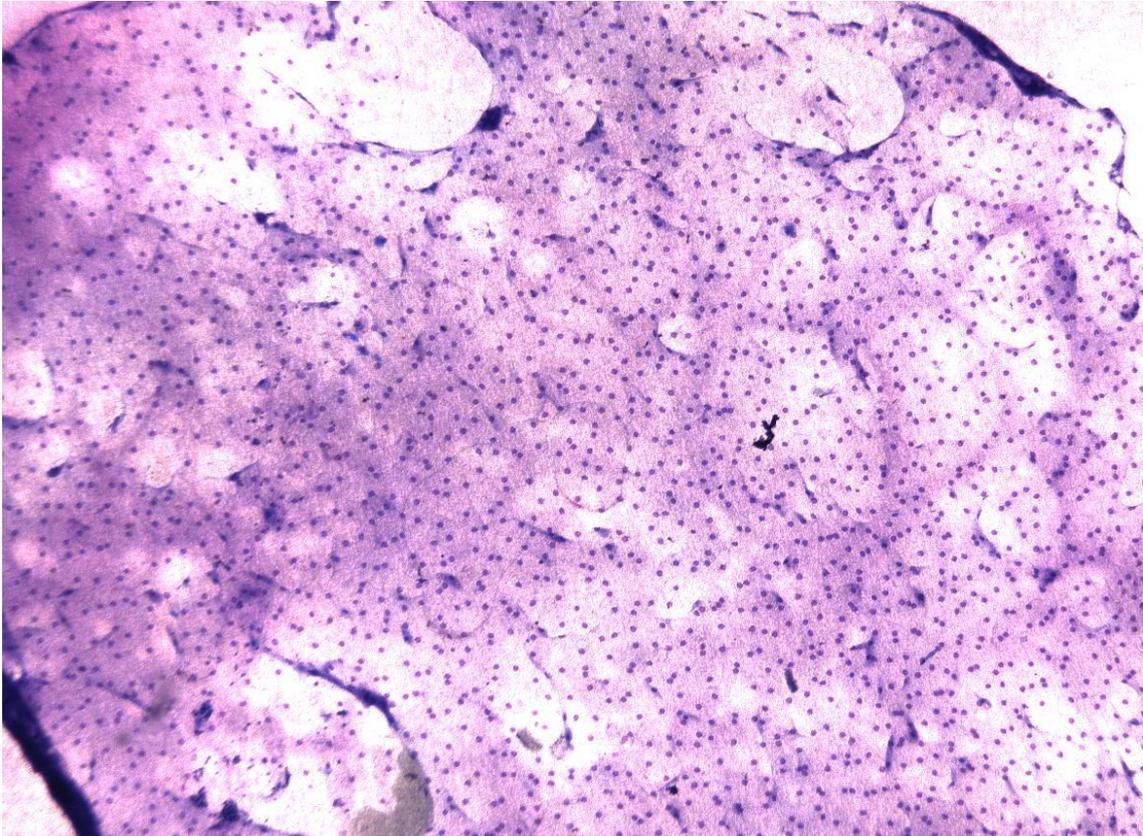


Figura 7.2: cellule corneali ottenute per impressione.

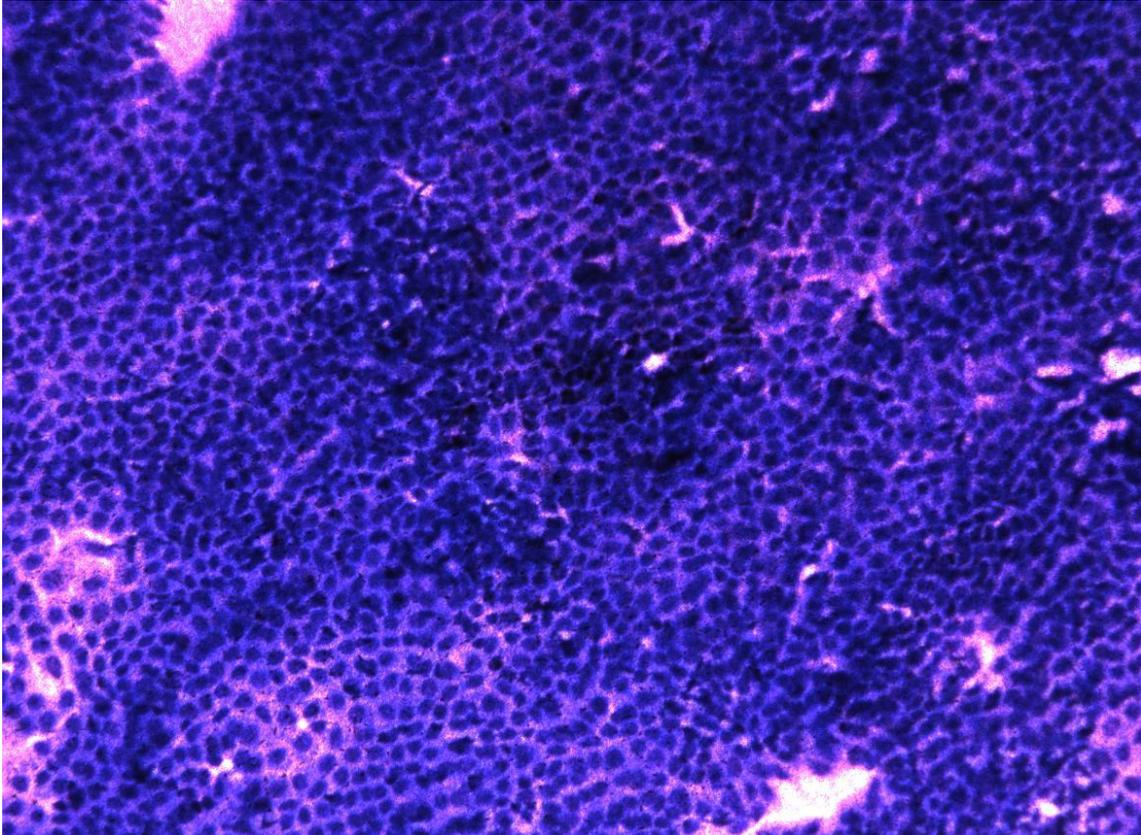


Figura 7.3: cellule congiuntivali ottenute per impressione.

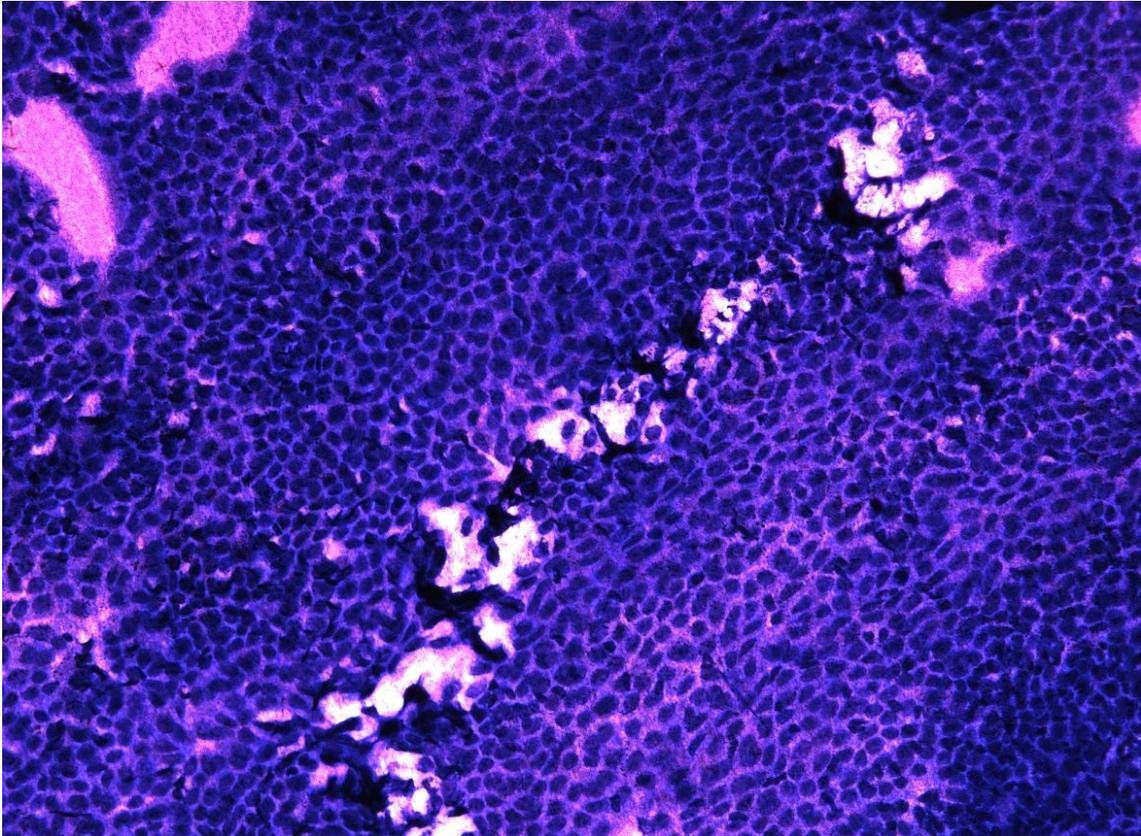


Figura 7.4: *goblet cells* tra le cellule congiuntivali ottenute per impressione.

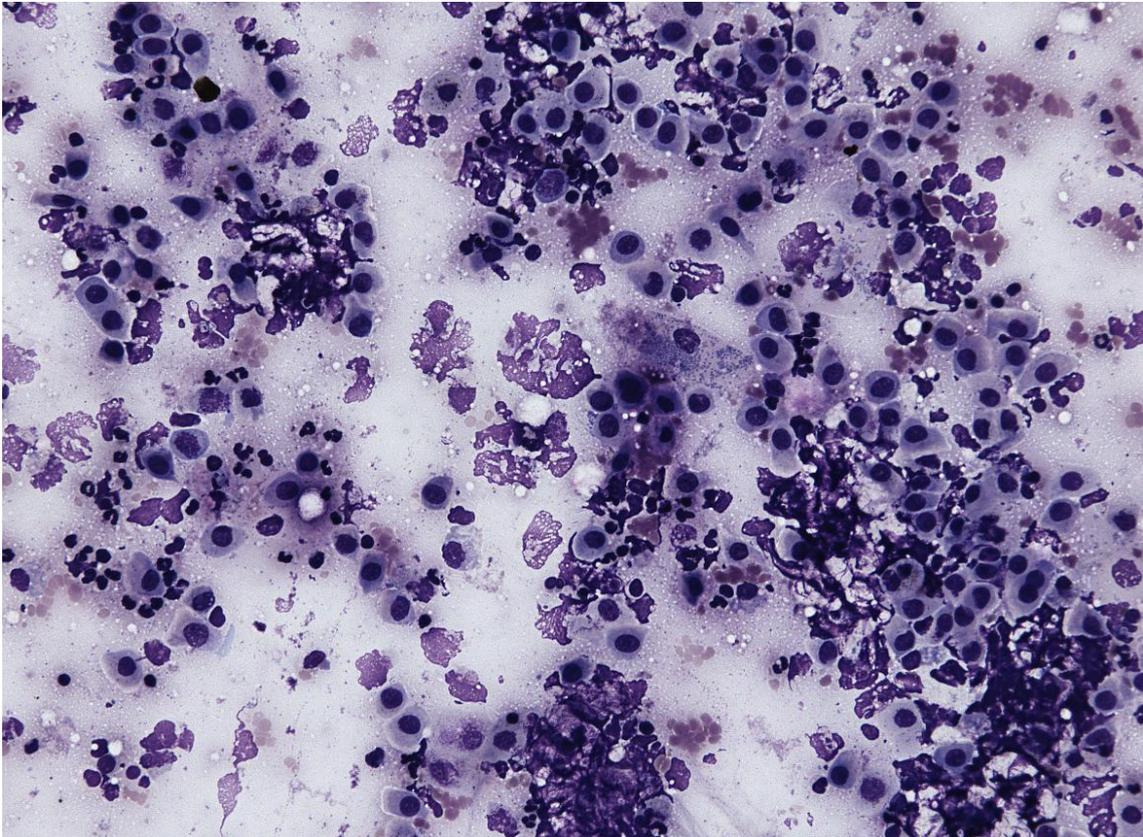


Figura 7.5: preparato ottenuto con cytobrush.

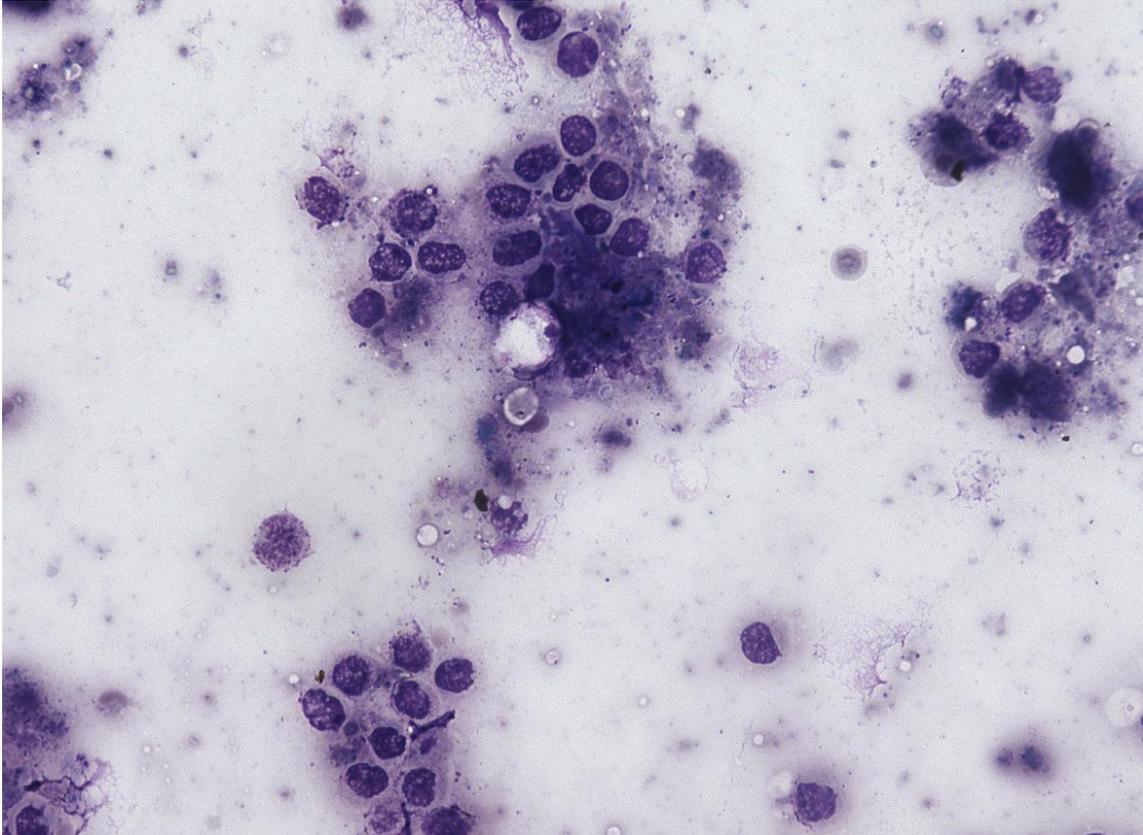


Figura 7.6: *goblet cell* (al centro dell'immagine) in un preparato ottenuto con cytobrush.

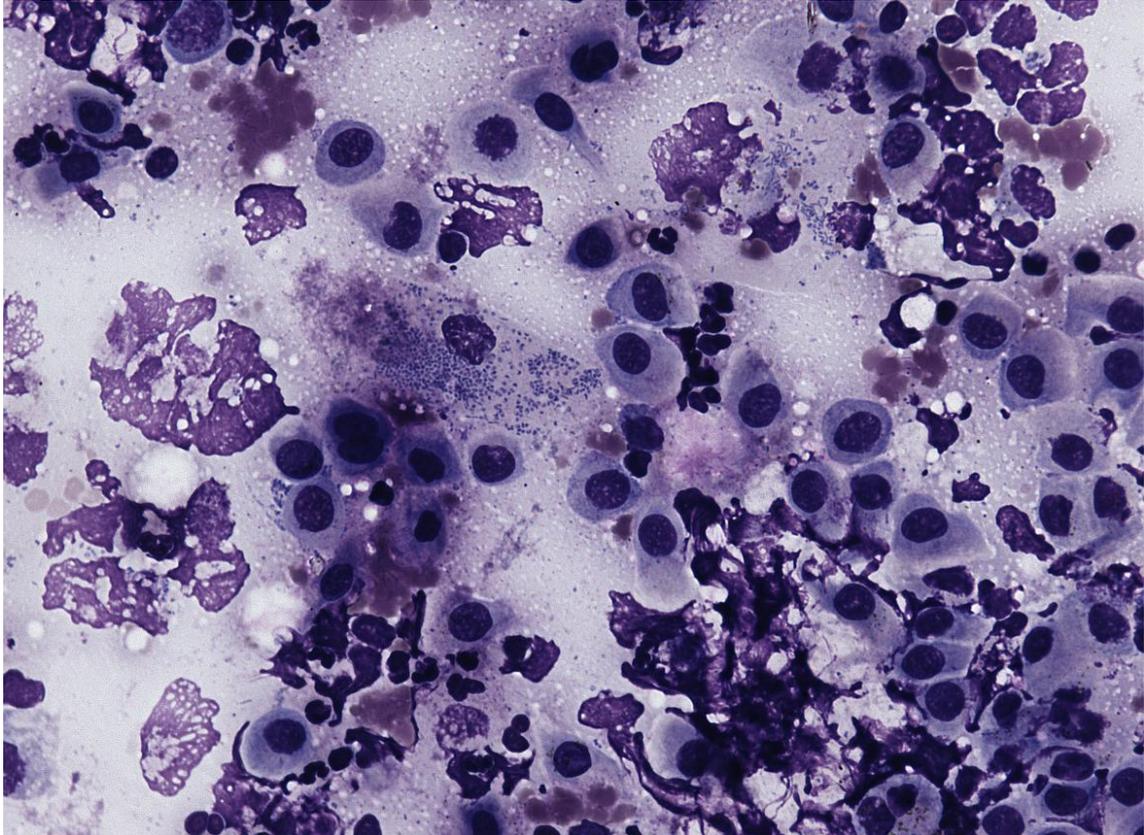


Figura 7.7: campione ottenuto con cytobrush nel quale si riscontra la presenza di batteri.

Con il test di Mann-Whitney, sono stati messi a confronto i dati ottenuti dalla valutazione dei filtri con quelli ricavati dalla valutazione dei campioni prelevati con cytobrush. Per ogni caratteristica citologica presa in esame, tale test indica il grado di somiglianza tra i dati riguardanti l'una e l'altra metodica poste a confronto. Le differenze tra le due tecniche sono state considerate statisticamente significative quando il valore di P era minore di 0,05.

Sia per il primo operatore che per il secondo sono emerse delle differenze statisticamente rilevanti, riferite a tre caratteristiche citologiche, tre le due metodiche:

- il primo di questi parametri è la conservazione delle cellule, che è risultata migliore nei filtri sia nella valutazione del primo osservatore (P=0,042) sia in quella del secondo (P=0,004);
- il secondo parametro in questione è la numerosità delle *goblet cells*, che è stata stimata maggiore nei filtri rispetto ai preparati ottenuti con cytobrush sia dal primo (P=0,014) che dal secondo osservatore (P=0,031);
- il terzo parametro è la cromatina nucleare, che secondo il primo operatore è prevalentemente granulare nei campioni ottenuti per impressione e per lo più finemente granulare in quelli prelevati con brush (P=0,005); secondo il secondo operatore, invece, nei filtri la cromatina è prevalentemente dispersa mentre nei preparati ottenuti con brush è principalmente finemente granulare (P=0,000).

Per quanto riguarda esclusivamente l'osservazione del primo operatore, ci sono state altre differenze statisticamente significative tra i dati ottenuti con le due metodiche:

- la cellularità si è rivelata maggiore nei filtri (P=0,013);
- alcune caratteristiche delle *goblet cells* ossia il N/C, forma del nucleo, cromatina nucleare, nei filtri sono state in prevalenza valutate rispettivamente come uguale a 2, tonda e finemente granulare (P=0,004 per ognuno di questi tre parametri). Nei campioni ricavati per *cytobrushing* non è possibile definire una prevalenza per quanto riguarda la classificazione di questi tre parametri cellulari dal momento che le *goblet cells* sono state individuate solo in due campioni.

Nell'osservazione del secondo operatore, invece, la valutazione della presenza di granuli ha riportato differenze significative tra i campioni ricavati con le due diverse tecniche. Infatti, essi sono stati riscontrati maggiormente nei preparati ottenuti con cytobrush rispetto a quelli ricavati per impressione (P=0,000).

Per quanto riguarda l'esame del primo osservatore, i seguenti parametri hanno riportato un valore di $P > 0,05$ secondo il test di Mann-Whitney e non sono stati quindi considerati significativamente differenti a seconda della metodica usata per il prelievo dei campioni:

- dimensioni ($P=0,258$);
- forma ($P=0,593$);
- N/C ($P=0,231$);
- colore citoplasma ($P=0,473$);
- granuli ($P=0,670$);
- dimensioni *goblet cells* ($P=1,000$);
- forma *goblet cells* ($P=1,000$);
- citoplasma *goblet cells* ($P=1,000$);
- presenza di cellule infiammatorie ($P=0,075$).

Per ciò che concerne invece la valutazione del secondo osservatore, le caratteristiche cellulari che non sono state classificate in modo significativamente diverso tra l'una e l'altra metodica sono di seguito riportate:

- cellularità ($P=0,482$);
- dimensioni ($P=0,718$);
- forma ($P=0,084$);
- N/C ($P=0,067$);
- colore citoplasma ($P=0,296$);
- presenza cellule infiammatorie ($P=0,412$).

Non è stato possibile eseguire il test di Mann-Whitney sulle caratteristiche morfologiche delle *goblet cells* (dimensioni, forma, N/C, colore citoplasma, forma del nucleo, cromatina) dal momento che il secondo osservatore non ha valutato le caratteristiche morfologiche delle *goblet cells* nei campioni ottenuti con cytobrush, non avendo ritrovato nessuna di queste cellule in essi.

Il test del “k di Cohen” è stato utilizzato per stimare l’*agreement* tra le osservazioni dei due operatori nella valutazione dei filtri e in quella dei vetrini ricavati con cytobrush. L’*agreement* viene espresso tramite il valore di *k*.

Per quanto riguarda la citologia ad impressione, la caratteristica morfologica che è stata valutata in modo più concorde è il rapporto N/C ($k=0,83$; *agreement* “almost perfect”). Essa è seguita dai caratteri forma ($k=0,46$) e presenza di cellule infiammatorie ($k=0,43$) che sono stati valutati con livello di *agreement* moderato. Le caratteristiche la cui valutazione ha ottenuto invece un livello di *agreement* discreto (“fair”) sono state presenza di granuli ($k=0,32$), dimensioni ($k=0,29$) e cellularità ($k=0,28$). I rimanenti caratteri di conservazione ($k=0,17$), numerosità delle *goblet cells* ($k=0,12$), cromatina ($k=0,08$) e colore citoplasma ($k=0,05$) sono stati classificati con un livello basso (“slight”) di *agreement*.

In merito alla citologia per *cytobrushing*, la caratteristica morfologica valutata con maggior *agreement* è la presenza di cellule infiammatorie, classificata con un livello di accordo moderato tra i due osservatori ($k=0,596$). Fanno seguito rapporto N/C ($k=0,404$), dimensioni ($k=0,336$), colore citoplasma ($k=0,336$), presenza di granuli ($k=0,336$) e cromatina ($k=0,216$) che sono stati classificati con un discreto (“fair”) *agreement*. I restanti caratteri di cellularità ($k=0,179$), conservazione ($k=0,156$) e forma ($k=0,126$) sono stati valutati con basso (“slight”) *agreement*.

Non è stato possibile determinare l’*agreement* interoperatore della valutazione delle caratteristiche morfologiche delle *goblet cells* a causa del loro basso numero nei campioni.

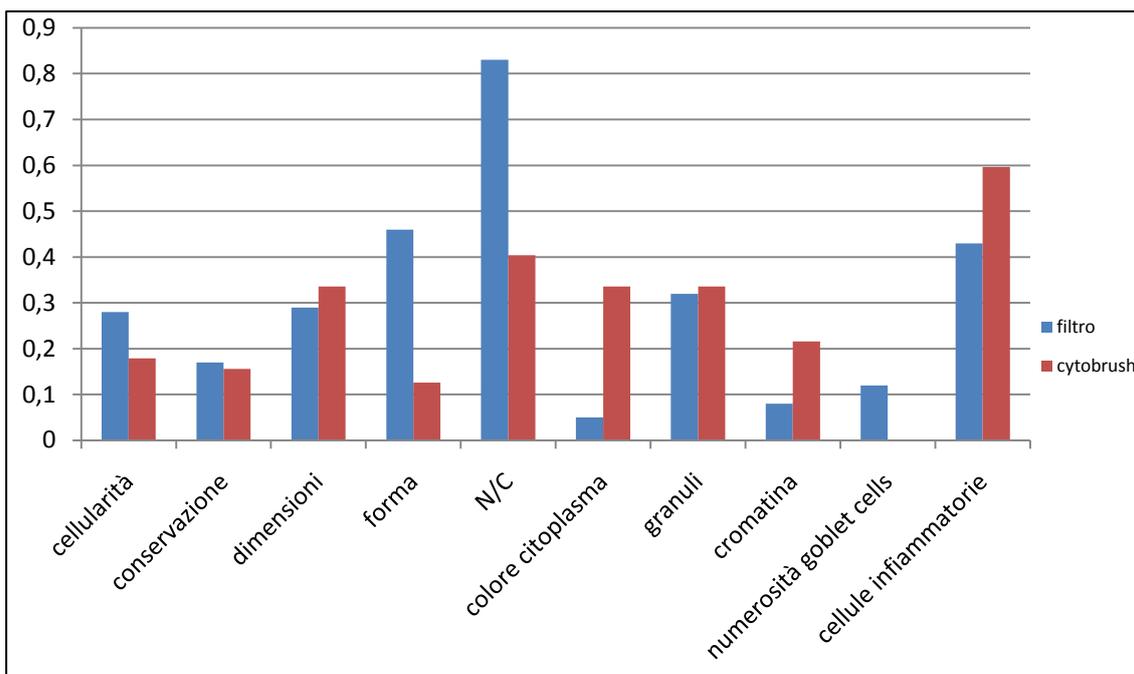


Grafico 7.1: Valori di k agreement.

$k < 0$ corrisponde a “*poor agreement*”;

$0 < k < 0.2$ corrisponde a “*slight agreement*”;

$0.21 < k < 0.40$ corrisponde a “*fair agreement*”;

$0.41 < k < 0.60$ corrisponde a “*moderate agreement*”;

$0.61 < k < 0.80$ corrisponde a “*substantial agreement*”;

$0.81 < k < 1.00$ corrisponde a “*almost perfect agreement*”.

8. *Discussione*

Con il presente studio è stato dimostrato che la citologia ad impressione applicata alla superficie oculare limbare del cavallo consente di ottenere dei campioni contraddistinti da buona cellularità e conservazione, caratteristiche che sono tra l'altro risultate significativamente migliori se confrontate con quelle dei preparati ottenuti con cytobrush. Queste caratteristiche dei campioni ottenuti mediante filtro erano già state dimostrate, solamente per quanto riguarda le cellule congiuntivali, da Gonçalves e colleghi nel 2012, che campionarono la congiuntiva bulbare di quindici cavalli per eseguire la conta cellulare e valutare il tipo di altre cellule presenti (Gonçalves *et al.*, 2012). Tuttavia, nel loro studio non fu eseguito alcun confronto tra i filtri e campioni ottenuti con altre metodiche. La buona cellularità e conservazione dei preparati ottenuti per impressione sono un vantaggio rilevato anche in altre specie. A tal proposito, Bolzan e colleghi nel 2005 dimostrarono che la citologia ad impressione eseguita sulla congiuntiva bulbare di cane forniva campioni con sufficienti quantità di epitelio congiuntivale che presentava buona conservazione delle caratteristiche morfologiche (Bolzan *et al.*, 2005). Inoltre, Perazzi e colleghi osservarono, nel loro studio eseguito in cane e gatto, miglior cellularità e conservazione dei filtri rispetto ai campioni ottenuti con cytobrush (Perazzi *et al.*, *in press*). Un'ulteriore conferma di questo aspetto è da ricercarsi nello studio portato a termine da Doughty nel 2014 su occhi di pecora provenienti dal macello. Confrontando le due metodiche, Doughty poté affermare che la tecnica ad impressione fornisce più cellule per campo di visualizzazione rispetto alla citologia per *scraping* (Doughty, 2014).

La miglior conservazione dei filtri, osservata nel presente lavoro, potrebbe essere ricondotta alla minor invasività del campionamento per impressione, che consiste nel ricavare le cellule tramite una semplice apposizione del filtro. Differentemente, nel *cytobrushing* le cellule ricavate per spazzolamento vengono poste sul vetrino portaoggetto facendo strisciare la spazzola su di esso e, durante questa azione, potrebbe avvenire un danneggiamento delle cellule che quindi all'osservazione microscopica non conservano interamente le proprie caratteristiche morfologiche.

Il fatto che i prelievi in questo studio siano stati effettuati post-mortem non sembra aver influenzato la conservazione delle cellule. Il dottor Doughty, che condusse uno studio su occhi bovini provenienti dal macello, affermò che il campionamento dopo un intervallo

di un'ora e mezza dalla morte dell'animale aveva fornito campioni di qualità accettabile, sia in base all'aspetto dell'epitelio all'istologia e alla microscopia elettronica, sia in base alla risposta della superficie oculare all'irrigazione nel test dell'occhio enucleato (*Doughty, 2002*). Nel presente studio, l'intervallo tra la morte dell'animale e la raccolta del campione è stato di circa dieci minuti, notevolmente più breve rispetto a quello riportato da Doughty. Si può quindi affermare che i cambiamenti dell'epitelio al momento della raccolta siano stati pressoché minimi, tanto da non dare alterazioni visibili al microscopio. Ciò ha contribuito alla buona conservazione di tutti i campioni, sebbene quelli ottenuti per impressione siano risultati meglio conservati.

Le caratteristiche morfologiche delle cellule corneali e congiuntivali ottenute per impressione sono risultate molto simili a quelle delle cellule ricavate tramite la stessa metodica dalla superficie oculare di cane e gatto (*Perazzi et al, in press*).

Oltre a cellularità e conservazione, il presente studio ha messo in luce un'altra differenza significativa tra la tecnica ad impressione e il cytobrushing, ossia il maggior numero di *goblet cells* rilevato nei filtri. Ciò lascia supporre il fatto che la visualizzazione delle cellule caliciformi mucipare sia agevolata nei preparati ottenuti per impressione, dove c'è meno sovrapposizione tra le cellule, la topografia di quest'ultime è mantenuta e l'area da esaminare è più ristretta rispetto al campione ottenuto con cytobrush, nel quale bisogna invece controllare un'area più estesa rischiando di tralasciare delle piccole zone del preparato. Non a caso, la citologia ad impressione si è rivelata il metodo d'elezione per la ricerca delle *goblet cells* in caso di cheratocongiuntivite secca dapprima in medicina umana (*Nelson, 1988*) e negli ultimi anni anche in veterinaria (*Balicki et al., 2011*). Nel 1988, fu introdotto in oftalmologia umana l'indice di Nelson-Adams, un sistema di classificazione delle cellule congiuntivali, ottenute per impressione, basato sul loro grado di metaplasia squamosa e su numero, forma e colore delle *goblet cells* (*Nelson, 1988; Adams et al., 1988*). Tale sistema di classificazione fu applicato in veterinaria da Balicki e colleghi nel 2011, quando validarono la citologia ad impressione come un efficace strumento per monitorare l'evoluzione della cheratocongiuntivite secca nel cane (*Balicki et al., 2011*). Nonostante non fosse negli scopi del presente studio, la miglior visualizzazione delle *goblet cells* nei preparati ottenuti mediante filtro lascia supporre che in futuro questi potranno essere impiegati per valutare patologie che interessano questo tipo cellulare.

Occorre considerare che la miglior visualizzazione delle *goblet cells* nei filtri osservata nel presente lavoro contrasta con i risultati dello studio di Napoleone e colleghi, che nel 2015, confrontando la metodica ad impressione e il *cytobrushing* applicati all'epitelio congiuntivale equino, notarono che le *goblet cells* erano presenti solamente nei preparati ottenuti con *cytobrush* (Napoleone et al., 2015). Analogamente, l'anno precedente gli stessi autori, in uno studio volto a rilevare i tipi cellulari ottenibili per impressione dalla congiuntiva bulbare equina, non rilevarono *goblet cells* dai campioni (Napoleone et al., 2014).

Nonostante le cellule caliciformi mucipare siano state meglio rilevate con la citologia ad impressione, la loro numerosità nei filtri è stato un parametro valutato con basso livello di *agreement* tra i due osservatori. Questo disaccordo potrebbe essere attribuito alla colorazione utilizzata, la May-Grunwald-Giemsa. Con questa colorazione il citoplasma delle *goblet cells* risulta essere leggermente eosinofilo, non perfettamente appariscente se frammisto a delle cellule con citoplasma leggermente basofilo come quello delle cellule congiuntivali. Una colorazione che potrebbe risultare più adeguata per la conta delle *goblet cells* è la PAS, che dà alla mucina contenuta nel citoplasma un colore rosso, meglio distinguibile. Questa colorazione non è stata utilizzata in questo studio perché può essere impiegata solo in strutture dotate di un sistema di smaltimento adeguato, data la tossicità dei suoi reagenti. Poiché la citologia è una tecnica semplice che può essere eseguita in tutte le strutture, in questo studio è stata usata una colorazione "standard", il cui impiego non richiede condizioni particolari.

Le caratteristiche delle *goblet cells* della congiuntiva di cavallo presentano caratteristiche analoghe a quelle della congiuntiva di cane e gatto, descritte da Perazzi e colleghi (Perazzi et al., *in press*).

Un'ulteriore differenza significativa tra le due metodiche oggetto di questo studio riguarda la valutazione della cromatina. Tale discordanza può essere attribuita al diverso livello di ingrandimento a cui è stata eseguita l'osservazione dei preparati ottenuti con le due diverse metodiche. Infatti, la valutazione dei preparati ottenuti con *cytobrush* è stata eseguita ad un ingrandimento di 600X mentre quella dei filtri è stata eseguita ad un ingrandimento di 200X. Ciò può aver comportato una differente visualizzazione dei dettagli nucleari tra cui la cromatina, il cui aspetto appariva quindi diversamente valutabile tra i preparati ottenuti con le due metodiche.

Dato il minor ingrandimento raggiungibile per la valutazione dei filtri, dotati di grosso spessore, è probabile che la citologia ad impressione non sia la tecnica più appropriata per valutare le caratteristiche morfologiche più fini, riguardanti citoplasma o nucleo. Tale limite era stato sottolineato anche da Perazzi e colleghi nella valutazione di campioni ottenuti per impressione dal limbo di cane e gatto (*Perazzi et al., in press*). In medicina umana, inoltre, è stato appurato che la citologia ad impressione oculare è un metodo sensibile per la diagnosi di neoplasia, ma non rappresenta il *gold standard* per riconoscere il tipo di malignità, data la maggior difficoltà ad esaminare caratteristiche morfologiche cellulari sottili rispetto al *cytobrushing* (*Tananuvat et al., 2008; Sen et al., 2015*).

Occorre considerare, tra l'altro, che la valutazione della cromatina nei filtri ha conseguito, nel presente studio, un livello basso di *agreement* ($k=0,08$) tra le analisi dei due diversi operatori. Questo disaccordo può essere anch'esso ricondotto alla poca chiarezza (dovuta al basso ingrandimento) dei dettagli nucleari, ambiguità che probabilmente ha lasciato spazio a diverse interpretazioni dello stesso particolare visualizzato al microscopio. Difatti, nei campioni ottenuti con *cytobrush*, che possono essere visualizzati ad un ingrandimento di 600X, la valutazione della cromatina è stata eseguita con un maggiore accordo ("*fair*" *agreement*). E' possibile che l'esperienza dell'osservatore giochi un ruolo considerevole nella valutazione dei caratteri più fini, che nei filtri non appaiono nitidi.

Anche la quantificazione della presenza di granuli citoplasmatici è un parametro valutato in modo significativamente differente tra le due metodiche, sebbene ciò sia avvenuto solamente da parte dell'osservatore con maggiore esperienza. In particolare, i granuli sono stati rilevati maggiormente nei campioni ottenuti con *cytobrush*. Essendo i granuli considerati anch'essi dei dettagli citoplasmatici fini, tale differenza può essere attribuita all'impossibilità di valutare i filtri ad un ingrandimento maggiore di 200X.

Il ritrovamento di granuli intracitoplasmatici può essere considerato un reperto normale dal momento che essi sono comuni nelle cellule raccolte da aree pigmentate come il limbo (*Giuliano and Moore, 2002*).

Un evidente vantaggio della citologia ad impressione confermato da questo studio è quello di fornire informazioni circa la topografia e il pattern cellulari, speculazioni non attuabili sui campioni ricavati mediante *cytobrush*. Nel cavallo, nel quale la maggior

parte delle patologie della superficie oculare è di tipo infiammatorio (*Miller Michau, 2005*), questa metodica potrebbe dare un prezioso supplemento diagnostico contribuendo a rilevare sede precisa e quantità di cellule infiammatorie. Inoltre, la possibilità di ottenere un monostrato, senza sovrapposizioni tra le cellule, consente di discriminare con più facilità le due popolazioni cellulari presenti, rispetto al *cytobrushing*.

Diversi campioni hanno dimostrato la presenza di neutrofili e in un solo campione sono state rinvenute plasmacellule. Tuttavia, considerando che i neutrofili non appaiono degenerati, si può ritenere che i leucociti non siano indice di flogosi ma rappresentino una contaminazione da macellazione o siano parte del fondo ematico. Ciò è avvalorato dal fatto che non erano presenti, al momento del campionamento, alterazioni macroscopiche della superficie oculare compatibili con segni d'infiammazione. La presenza di cellule infiammatorie in campioni ricavati da animali sani è stata segnalata anche in cane da Bolzan e colleghi (*Bolzan et al., 2005*).

I batteri che erano stati riscontrati in un filtro possono essere il risultato di una contaminazione ambientale oppure potrebbero far parte della normale flora microbica della superficie oculare che può essere ritrovata abitualmente nei campioni citologici di animali sani, come attestato da Giuliano e Moore nel 2002 (*Giuliano and Moore, 2002*). Queste due ipotesi sono accreditate dal fatto che i batteri non fossero accompagnati da una ingente quantità di cellule infiammatorie che in tale circostanza avrebbero denotato la presenza di flogosi.

Valutando l'*agreement* tra due diversi osservatori rispetto ad ogni caratteristica morfologica esaminata, uno degli scopi di questo lavoro è stato quello di definire la ripetibilità della tecnica ad impressione in ambito oftalmologico nel cavallo. I caratteri per cui è stato quantificato un basso livello di accordo tra le valutazioni dei due osservatori sono il colore del citoplasma, la conservazione e, come già menzionato, cromatina e numerosità delle *goblet cells*. Da questi risultati si può supporre che la citologia ad impressione sia una metodica ripetibile qualora non sia strettamente necessario valutare dettagli intracellulari come colore del citoplasma e caratteristiche nucleari, parametri per i quali l'*agreement* è risultato minore. Malgrado questo studio sia stato condotto su superfici oculari sane, si può dunque ipotizzare che questa tecnica rappresenti un valido strumento diagnostico per le patologie infiammatorie mentre per

quanto riguarda lesioni neoplastiche, caratterizzate da diverse alterazioni nucleari, è probabilmente più attendibile la valutazione di cellule ottenute con cytobushing, che permette l'osservazione microscopica con un maggior livello di ingrandimento.

Dai risultati ottenuti, si può inoltre affermare che l'esperienza dell'operatore non giochi un ruolo vincolante nell'interpretazione dei preparati ottenuti per impressione. Dunque questa metodica può essere ritenuta accessibile a tutti gli osservatori, con diversi livelli di esperienza.

In questo studio non è stata valutata la praticabilità della metodica ad impressione nel cavallo in quanto i prelievi sono stati eseguiti post-mortem. Tuttavia, essa fu già testata in varie occasioni. Nel 2012 Gonçalves e colleghi provarono la facilità della raccolta del prelievo per impressione nel cavallo, avendo dovuto ricorrere solamente ad un contenimento meccanico degli animali senza l'utilizzo di farmaci anestetici locali o sistemici (Gonçalves *et al.*, 2012). Un parere diverso è stato avanzato da Napoleone e colleghi, che in entrambi i loro studi precedentemente menzionati, riportarono la difficoltà del campionamento, dovuta principalmente alla necessità di tenere aperto l'occhio manualmente (Napoleone *et al.*, 2014; Napoleone *et al.*, 2015). L'applicazione di ossibuprocaina facilitò la procedura ma non eliminò completamente le difficoltà (Napoleone *et al.*, 2014; Napoleone *et al.*, 2015). Una soluzione per agevolare la manualità potrebbe essere l'esecuzione del blocco del nervo auricolopalpebrale cosicché l'operatore riesca ad aprire le palpebre dell'animale e campionare l'area interessata.

9. Conclusioni

Alla luce di questo lavoro, si può concludere che la citologia ad impressione è una valida metodica per lo studio della superficie oculare del cavallo. Rispetto alla tecnica di cytobrush, essa permette di ottenere un monostrato di cellule che mantengono il loro pattern e la loro topografia senza sovrapposizioni. I preparati ricavati per impressione presentano anche una miglior conservazione di quelli ottenuti con cytobrush e permettono una più facile rilevazione delle *goblet cells*. Tuttavia, i filtri non possono essere visualizzati ad un ingrandimento maggiore di 200X a causa del loro spessore e ciò può rappresentare un ostacolo per la valutazione dei dettagli cellulari più fini, come quelli riguardanti particolari intracitoplasmatici e i caratteri nucleari. Si può dunque ipotizzare che l'impiego della citologia ad impressione sia più adeguato nella diagnosi di patologie infiammatorie mentre la tecnica di cytobrush sia da preferirsi nella diagnosi di neoplasia, per la quale occorre valutare caratteristiche morfologiche ad un maggiore ingrandimento.

Sulla base del livello di *agreement* tra le valutazioni di più osservatori, si può affermare che la metodica ad impressione sia ripetibile, nonostante l'esperienza dell'osservatore, pur non essendo vincolante, giochi probabilmente un ruolo importante nell'esame dei dettagli più fini.

Il presente studio dimostra inoltre che il pattern citologico limbare del cavallo sano è costituito da due tipi cellulari, simili a quelli ottenuti per impressione da cane e gatto. La prima è la popolazione corneale, organizzata in un monostrato, con cellule grandi, poligonali, dotate generalmente di alto rapporto N/C, citoplasma chiaro, nucleo tondo centrale o paracentrale e cromatina granulare o finemente granulare. La seconda popolazione è quella congiuntivale, costituita da cellule con citoarchitettura pavimentosa, piccole dimensioni, forma tonda od ovale, citoplasma leggermente basofilo, basso rapporto nucleo/citoplasma, nucleo paracentrale e cromatina da dispersa a finemente granulare o granulare. Dato che il prelievo è stato effettuato in animali macellati, non è stato possibile discernere se le cellule infiammatorie e i batteri fossero presenti in quanto reperto normale nella citologia ad impressione di cavalli sani o a causa di una contaminazione ematica.

Bibliografia

1. Adams G.G.W., Dilly P.N. and Kirkness C.M. 1988. Monitoring Ocular Disease by Impression Cytology. *Eye* 2 (5): 506-516.
2. Andrew S.E., Willis A.M., Ollivier F.J. and Matthews A., Chapter 4 - Diseases of the Cornea and Sclera, 2005. In: Gilger B.C, *Equine ophthalmology*, Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri, pp. 157-160, 173-178, 192- 197, 216-218, 235-243.
3. Balicki I., Radziejewski K. and Bielecki W. 2011. Evaluation of corneal and conjunctival epithelium with the use of impression cytology in mixed-breed dogs diagnosed with keratonconjunctivits sicca. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 55 (3): 493-499.
4. Bolzan A., Brunelli A.T.G., Castro M.B., Souza M.A., Souza J.L. and Laus J.L. 2005. Conjunctival impression cytology in dogs. *Veterinary ophthalmology* 8 (6): 401-405.
5. Brandão C., Minto B., Rocha N. and Ranzani J. 2002. Citologia conjuntival por impressão em gatos (*Felis domestica*). *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia* 5 (1): 41-47.
6. Calonge M., Diebold Y., Sàez V., Enríquez de Salamanca A., García-Vàzquez C., Corrales R.M. and Herreras J.M. 2004. Impression cytology of the ocular surface: a review. *Experimental Eye Research* 78 (3): 457-472.
7. Carastro S. and Saunders B. 2004. Equine ocular anatomy and ophthalmic examination. *The Veterinary clinics of North America. Equine practice* 20 (2): 285-299.
8. Cooley P. and Saunders B. 1992. Normal equine ocular anatomy and eye examination. *The Veterinary clinics of North America. Equine practice* 8 (3): 427-449.
9. Crispin S., Chapter 1 - Examination of the eye and adnexa, 2004. In: Barnett K., Crispin S., Lavach J.D. and Matthews A.G., *Equine Ophthalmology: An Atlas and Text. 2nd edition*, Elsevier-Saunders, St. Louis, Missouri, pp. 4-9.
10. Cutler T.J., Chapter 2 - Diseases and Surgery of the Globe and Orbit, 2005. In: Gilger B.C, *Equine ophthalmology*, Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri, pp. 63.

11. Doughty M.J. 2014. Comparison of Morphology of Bulbar Conjunctival Cells Assessed by Impression Cytology versus Scrape and Smear Methods. *Current Eye Research* 39 (10): 973–981.
12. Doughty M.J. 2002. Surface features and morphology of bulbar conjunctival cells of bovine eyes obtained from a slaughterhouse: a scanning electron microscope and impression cytology study. *Current Eye Research* 24 (5): 341–353.
13. Doughty M.J. 1996. Impact of epithelial fluid or vapour phase on surfactant-induced changes in rabbit or bovine corneal thickness in vitro. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 42 (6): 411-419.
14. Doughty M.J. 1997. Evaluation of short-term bovine eye storage protocol for the enucleated eye toxicity test. *Toxicology In Vitro* 11 (3): 229–240.
15. Dyce K.M., Sack W.O. and Wensing C.J.G., Chapter 9 - Organi di senso, 2009. In: Dyce K.M., Sack W.O. and Wensing C.J.G. *Anatomia sistematica*. 3^a ed. Antonio Del-fino Editore, Rome, Italy, pp. 325-326, 330-331, 335-336.
16. Egbert P.R., Lauber S. and Maurice D.M. 1977. Simple conjunctival biopsy. *American journal of ophthalmology* 84 (6): 798-801.
17. Eördögh R., Schwendenwein I., Tichy A. and Nell B. 2015. Impression cytology: a novel sampling technique for conjunctival cytology of the feline eye. *Veterinary ophthalmology* 18 (4): 276-284.
18. Gilger B.C. and Stoppini R., Chapter 3- Diseases of the Eyelids, Conjunctiva and Nasolacrimal System, 2005. In: Gilger B.C, *Equine ophthalmology*, Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri, pp. 107-111, 125-128, 135, 141-143, 148-151.
19. Giuliano E.A, Moore C.P., Chapter 3- Eyes and Ocular Adnexa, 2002. In: Cowell R.L. and Tyler R.D. *Diagnostic Cytology and Hematology of the Horse*. Elsevier Health Sciences, St. Louis, Missouri, pp. 49-50.
20. Gonçalves R.C., Pereira E.C., Montoya L.M., Pedraza F.J., Chiacchio S.B., Amorim R.M., Borges A.S. and Rocha N.S. 2012. Contagem de células conjuntivais por citologia de impressão em bovinos e equinos. *Revista Lusófona de Ciência e Medicina Veterinária* 5 (7): 56-63.

21. Hamor R.E. and Ehrhart E.J., Chapter 17 - Eye, 2006. In: Eurell J.A. and Frappier B.L., *Dellmann's textbook of veterinary histology, 6th edition*, Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA, pp. 350-363.
22. Hollingsworth S.R., Chapter 5 - Diseases of the anterior uvea, 2005. In: Gilger B.C., *Equine ophthalmology*, Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri, pp. 253-254.
23. King T.C., Priehs D.R., Gum G.G. and Miller T.R. 1991. Therapeutic management of ocular squamous cell carcinoma in the horse: 43 cases (1979-1989). *Equine Veterinary Journal* 23 (6): 449-452.
24. Landis J.R. and Koch G.G. 1977. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics* 33 (1): 159-174.
25. Larmande A. and Timsit E. 1954. L'intérêt de cyto-diagnostic en ophtalmologie: communication préliminaire à propos d neuf cas de tumeurs du limbe scléro-cornéen. *Bulletin des sociétés d'ophtalmologie de France* 19: 415-419.
26. McKelvie P. 2003. Ocular surface impression cytology. *Advances in anatomic pathology* 10 (6): 328-337.
27. Miller Michau T., Chapter 1 - Equine Ocular Examination: Basic and Advanced Diagnostic Techniques, 2005. In: Gilger B.C., *Equine ophthalmology*, Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri, pp. 1-3, 9-13, 18-21, 25-38.
28. Montgomery K.W. 2014. Equine ocular neoplasia: A review. *Equine veterinary education* 26 (7): 372-380.
29. Mosunic C.B., Moore P.A., Carmicheal K.P., Chandler M.J., Vidyashankar A., Zhao Y., Roberts R.E. and Dietrich U.M. 2004. Effects of treatment with and without adjuvant radiation therapy on recurrence of ocular and adnexal squamous cell carcinoma in horses: 157 cases (1985-2002). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 225 (11): 1733-1738.
30. Muniesa M. 2014. Evaluation of conjunctival epithelium of filtering blebs by impression cytology. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología* 89 (6): 216-221.
31. Napoleone G., De Biase D., Lamagna B., Auletta L., Greco M., Palumbo V., Miele F. and Pasolini M.P. 2014. Conjunctival impression cytology in horses. *Atti della società italiana delle scienze veterinarie*: 54-55.

32. Napoleone G., De Biase D., Lamagna B., Auletta L., Greco M., Palumbo V., Paciello V. and Pasolini M.P. 2015. Conjunctival cytology in horses: comparison of two techniques. *Proceedings XXI Congresso Multisala SIVE*. Cremona: EV srl - Palazzo Trecchi-26100 Cremona. 6-8 febbraio 2015.
33. Nelson D.J. 1988. Impression cytology. *Cornea* 7 (1): 71-81.
34. Nelson D.J., Havener V.R. and Cameron J.D. 1983. Cellulose acetate impressions of the ocular surface. Dry eye states. *Archives of ophthalmology* 101 (12): 1869-1872.
35. Park H-J. and Ko M-K. 2005. Impression cytology of herpetic simplex keratitis in rabbits. *Korean Journal of Ophthalmology : KJO* 19 (2): 96-100.
36. Perazzi A., Bonsembiante F., Gelain M.E., Patruno M., Di Iorio V., Migliorati A. and Iacopetti I. Cytology of the healthy canine and feline ocular surface: comparison between cytobrush and impression technique. In press.
37. Schaller O., Cozzi B., Costantinescu G.M. and Mascarello F, Chapter 6 - Angiologia, 1999. In: *Nomenclatura anatomica veterinaria illustrata*. Antonio Delfino Editore, medicina-scienze, Rome, Italy, pp. 268.
38. Sen S., Lyngdoh A.D., Pushker N., Meel R., Bajaj M.S. and Chawla B. 2015. Impression cytology diagnosis of ulcerative eyelid malignancy. *Cytopathology* 26 (1): 26–30.
39. Sjastaad Ø.V., Sand O. and Hove K., Chapter 5 - The senses, 2010. In: Sjastaad Ø.V., Sand O. and Hove K., *Physiology of Domestic Animals*. 2nd edition. Scandinavian Veterinary Press, Oslo, Norway, pp. 200-217.
40. Tananuvat N., Lertprasertsuk N., Mahanupa P. and Noppanakeepong P. 2008. Role of impression cytology in diagnosis of ocular surface neoplasia. *Cornea* 27 (3): 269–274.
41. Wada S., Ode H., Hobo S., Niwa H., Katayama Y., Takatori K. 2011. *Mortierella wolfii* keratomycosis in a horse. *Veterinary Ophthalmology* 14 (4): 267-270.
42. Whitley R.D., Chapter 6 - Diseases and Surgery of the Lens, 2005. In: Gilger B.C., *Equine Ophthalmology*, Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri, p. 269.

43. Wilkie A., Chapter 9 - Diseases of the Ocular Posterior Segment, 2005. In: Gilger B.C., *Equine Ophthalmology*, Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri, p. 344.

Ringraziamenti

Voglio ringraziare innanzitutto la dottoressa Iacopetti per avermi dato la possibilità di seguire questo studio e per essere stata sempre disponibile. Ringrazio anche il dottor Bonsembiante per l'estrema pazienza e per il prezioso aiuto che mi ha dato per lo svolgimento di questa tesi. Un mio grazie va anche alla dottoressa Anna Perazzi che ha partecipato con me alla raccolta dei campioni.

E spostandosi dall'ambito universitario, desidero ringraziare i miei genitori per avermi permesso di studiare ciò che sognavo e per avermi sempre sostenuta. Grazie a mia sorella perché ha sempre creduto in me. Grazie a mio cognato che mi ha sempre incoraggiata.

E ringrazio tutti i miei amici...grazie a Francesca per le mille risate, per esserci sempre stata e per essere capace di farmi sorridere in qualsiasi momento. Grazie a Martina che è sempre stata disposta ad ascoltarmi e a darmi serenità con le sue parole gentili. Grazie alla mia cara amica Carlotta perché anche se ci siamo avvicinate in un momento di bisogno poi non mi ha più lasciata e ora non saprei che fare senza di lei. Grazie ad Alena per avermi fatto scoprire che anche dall'altra parte dell'Europa si può trovare una persona così affine. Grazie a Federico perché a suo modo mi ha sempre dato coraggio. E grazie ad Alessia, Livia, Federica, Jacopo, Alice, Matteo, Martina, Jessica, Riccardo, Chiara, Eleonora...a tutti gli altri che non posso elencare altrimenti servirebbe un libro intero...veramente a tutti grazie!

E infine, non posso non farlo, grazie ad ogni singolo animale che ha fatto e che fa parte della mia vita. Grazie al ricordo di Bleck, Pepe e Bijou che mi hanno regalato momenti di pura gioia e mi hanno insegnato ciò che è veramente importante. So che il loro dolce ricordo sarà sempre con me.

A tutti grazie di cuore.