

UTILIZZO DELL'IMPRINTING CONGIUNTIVALE IN OFTALMOLOGIA

dott.ssa Simona Destefanis, *DVM*, Clinica Veterinaria Sempione – Milano

dott.ssa M. Cristina Muscolo, *DVM*, Clinica Veterinaria Basiglio – Basiglio (Mi)

dott.ssa Daniela Olivero, *DVM*, **BiesseA** Laboratorio di Analisi Veterinarie - Milano

Premessa

La corretta esecuzione di una visita oftalmica non dovrebbe tralasciare l'esame citologico, grazie al quale si possono ottenere importanti informazioni diagnostiche. Si tratta di un'indagine pratica, veloce e sicura, che può essere facilmente eseguita e interpretata in qualunque ambulatorio veterinario.

La congiuntiva è costituita da due strati continui di cellule epiteliali: la congiuntiva palpebrale e quella bulbare. La prima è composta da epitelio colonnare pseudostratificato con cellule mucipare diffuse. Le cellule colonnari presentano normalmente uno strato di microcilia. Nel canto nasale dell'occhio si riscontra fisiologicamente un accumulo di linfociti. La congiuntiva bulbare è composta invece da un epitelio squamoso stratificato in continuità con l'epitelio corneale. Le cellule di questa regione presentano spesso pigmento melanico.

L'impiego della citologia in oftalmologia

Le pratiche citologiche più comunemente utilizzate in oftalmologia veterinaria sono lo scraping e il citobrushing o spazzolato congiuntivale.

Lo scraping consiste nell'asportazione dello strato superficiale della congiuntiva tramite una lama da bisturi. Deve essere effettuato sulla congiuntiva bulbare o limbare e richiede una certa capacità manuale da parte dell'operatore, in quanto è necessario, per ottenere buoni preparati, distendere uniformemente le cellule sul vetrino, in modo da ottenere una sorta di "strato sottile" senza danneggiare le cellule (artefatto della triconucleosi). Se non correttamente eseguito, può rendere la lettura difficoltosa o impossibile, a causa della presenza di emazie.

Il citobrushing consiste nel prelievo tramite spazzolatura delle cellule congiuntivali e successiva stesura del materiale per rotazione della spazzola su un vetrino portaoggetti. Anche questa tecnica necessita di una certa abilità manuale nel trasferire il campione sul vetrino. Con questa metodica, inoltre, si rischia di raccogliere cellule profonde, che possono confondere il citologo, determinando così l'emissione di una diagnosi non corretta.

La tecnica dell'imprinting congiuntivale

Questo lavoro si propone di portare a conoscenza una tecnica diagnostica originale e innovativa in medicina veterinaria, chiamata imprinting congiuntivale o citologia per impressione. Tale metodica si avvale dell'utilizzo di una membrana porosa di nitrato di cellulosa (Millipore) delle dimensioni di circa 1 x 1.5 cm, che viene semplicemente apposta, mediante l'uso di pinzette atraumatiche, sulla cornea o sulla congiuntiva del paziente da esaminare. Come si può facilmente immaginare, si tratta di un esame di rapida e semplice esecuzione (i risultati sono generalmente disponibili nel giro di alcune ore), che non necessita di sedazione o anestesia, né causa sanguinamenti. A differenza dello scraping e del citobrushing, l'imprinting congiuntivale permette di ottenere campioni sempre ben cellulati e ben conservati, non contaminati, i quali possono poi essere valutati secondo diversi parametri: cellularità, rapporto nucleo-citoplasma, presenza di particolari categorie cellulari (per esempio cellule infiammatorie e mucipare) e/o di agenti patogeni (quali batteri, virus, miceti e così via). La citologia per impressione, inoltre, consente di ricevere informazioni sui rapporti tra i vari elementi epiteliali. L'imprinting congiuntivale deve essere considerato l'esame d'elezione in corso di patologie che necessitano l'instaurazione di un trattamento terapeutico in tempi rapidi (come per esempio la chlamidiosi o le infezioni virali): infatti, permette di evidenziare alterazioni quali inclusi intra-citoplasmatici (caratteristici della chlamidiosi), perdita delle adesioni intracellulari e lesioni nucleari (tipiche delle infezioni virali, come è il caso della congiuntivite erpetica). Sui filtri Millipore, inoltre, è possibile effettuare tecniche di immunofluorescenza o immunoperossidasi. Un'ulteriore indicazione per l'impiego dell'imprinting congiuntivale è la cheratocongiuntivite secca, nelle cui forme si può valutare la presenza o meno delle cellule mucipare, il loro grado di adesione e l'eventuale metaplasia squamosa. Per quanto riguarda la colorazione, la nostra metodica prevede di routine il PAS .

Rassegna delle patologie oculari riscontrate

È stato effettuato l'imprinting congiuntivale su 200 soggetti, di cui 100 cani e 100 gatti.

Il 50% degli animali esaminati non presentava sintomi oculari e l'esame citologico ha messo in evidenza una congiuntiva sana, con grandi cellule epiteliali regolari e cellule caliciformi mucipare senza cellule infiammatorie, ad eccezione di una popolazione di piccoli linfociti , fisiologica nel canto nasale..

Il restante 50%, invece, presentava alterazioni congiuntivali con sintomatologia variabile. La maggior parte dei soggetti manifestava iperemia congiuntivale e scolo oculare. Quest'ultimo (epifora) era sieroso nelle forme lievi, mucoso (con secrezione soprattutto nel canto mediale) nelle forme subacute-croniche e purulento nelle congiuntiviti di origine batterica. L'animale presentava spesso prurito (individuabile tramite il riscontro di lesioni crostose da grattamento) e blefarospasmo. Nella maggior parte dei casi, però, le manifestazioni cliniche delle congiuntiviti risultavano di scarso ausilio diagnostico, in quanto aspecifiche e in parte sovrapponibili le une alle altre. La citologia congiuntivale eseguita tramite imprinting ha pertanto consentito di distinguere le differenti eziologie e di evitare, quindi, errori diagnostici legati a valutazioni affrettate.

Congiuntivite batterica

Anche se spesso rappresentava l'esito di un'infezione secondaria, è stata la patologia più riscontrata sia nei cani che nei gatti. L'esame citologico permette in questi casi di mettere in evidenza numerosi granulociti neutrofili e cellule epiteliali congiuntivali degenerate. All'interno del citoplasma si possono osservare batteri, in modo particolare cocchi. L'imprinting congiuntivale consente altresì di escludere un'infezione da micoplasmi, evidenziabile grazie alla visualizzazione, all'interno del citoplasma delle cellule epiteliali o di fianco a esso, di formazioni coccoidi o coccobacillari basofile.

Congiuntivite virale

È stato osservato un caso di congiuntivite virale in un cucciolo affetto da cimurro. La diagnosi definitiva è stata emessa in seguito all'esame condotto con la metodica PCR sul materiale ottenuto con l'imprinting congiuntivale. In simili casi l'esame citologico permette di individuare dei corpi inclusi citoplasmatici, acidofili, a margini netti, detti corpi di Lentz, specifici del cimurro all'interno del citoplasma delle cellule epiteliali..

Le congiuntiviti virali del gatto sono comunemente sostenute da Herpesvirus. La diagnosi viene emessa anche in tal caso mediante imprinting congiuntivale e successivo esame condotto con la metodica PCR. In un caso di sequestro corneale si sono osservati piccoli gruppi di due/tre cellule epiteliali con nucleo a "vetro smerigliato"(tipico delle lesioni virali erpetiche) associate ad un infiltrato infiammatorio composto da linfociti , granulociti neutrofili e rare plasmacellule. Il successivo esame con PCR ha confermato la diagnosi di sequestro corneale da Herpesvirus.

Congiuntivite da Chlamydia

L'infezione da Chlamydia psittaci è una delle principali cause della sindrome respiratoria del gatto. L'imprinting congiuntivale viene eseguito sulla faccia esterna della membrana nittitante. La popolazione cellulare osservata è costituita nelle fasi iniziali da granulociti neutrofili, mentre in un secondo tempo subentrano anche cellule linfoidi e macrofagi. Nelle fasi precoci dell'infezione si possono osservare degli inclusi intracitoplasmatici acidofili moriformi in prossimità del nucleo delle cellule epiteliali: si tratta dei cosiddetti corpi reticolati, che rappresentano la forma replicativa della Chlamydia. Dopo il quindicesimo giorno, compaiono nel citoplasma cellulare delle inclusioni basofile più o meno voluminose, che costituiscono i corpi elementari della Chlamydia.

Congiuntivite micotica

La congiuntivite da miceti causa una degenerazione delle cellule epiteliali congiuntivali e la presenza di cellule infiammatorie miste, tra cui numerosi granulociti eosinofili. Con la colorazione PAS(di elezione per i miceti) le spore e le ife fungine risultano rosse.

Congiuntivite allergica

Le congiuntiviti su base allergica sono caratterizzate dalla presenza di una popolazione cellulare quasi esclusivamente costituita da granulociti eosinofili. In rari casi si possono osservare anche alcuni mastociti, così come cellule con nucleo plurilobato e citoplasma con diverse granulazioni basofile.

Cheratocongiuntivite secca

L'imprinting congiuntivale rappresenta nell'uomo la metodica diagnostica d'elezione per la KCS: infatti grazie ad esso è possibile osservare e valutare secondo criteri morfologico-funzionali le cellule mucipare congiuntivali .

In corso di cheratocongiuntivite secca le cellule calciformi sono numericamente ridotte e si presentano degenerate. Le cellule di rivestimento epiteliale secernono muco in maniera sregolata (compensazione), creando un'alterazione del film lacrimale. Spesso, poi, si osserva un quadro infiammatorio secondario, caratterizzato da granulociti neutrofili e batteri. Anche la nostra casistica si presenta ricca di KCS: gli animali mostrano clinicamente delle "croste" intorno e sulle palpebre con iperemia ed edema congiuntivale, blefarospasmo e scolo mucoso. L'esame citologico per impressione mette in evidenza un infiltrato prevalentemente neutrofilico, colonie batteriche tipo cocchi (generalmente secondarie) ed assenza totale di cellule mucipare. Normalmente, invece si riscontra una popolazione mucipara pari al 10% delle cellule epiteliali. Nei casi più avanzati le cellule mucipare possono presentare un citoplasma tendente alla cheratinizzazione.

Congiuntivite autoimmune

Le congiuntiviti a carattere immunologico possono essere associate a patologie sistemiche autoimmuni e a forme allergiche. L'imprinting congiuntivale consente di evidenziare infiltrati linfoplasmocitari a livello della faccia interna della terza palpebra, come è tipico della cheratocongiuntivite cronica superficiale del Pastore Tedesco. L'esempio classico del gatto è rappresentato dalla cheratite cronica eosinofila, un'affezione che causa la proliferazione degli strati superficiali corneali, con lesioni granulomatose in rilievo e infiltrati istio plasmocitari stromali.

Tab.1

	Cellule epiteliali	Cellule mucipare	Granulociti neutrofili	Granulociti eosinofili	Linfociti	Macrofagi	Inclusi citoplasmatici
Congiuntivite batterica	Degenerate Disaggregate	++	+++		+, se cronica	+++	
Congiuntivite virale	Degenerate Disaggregate	++	++		+++		Corpi di Lentz(cimurro)
Congiuntivite Da Chlamydia	+++	++	+++			++	Corpi reticolati; corpi elementari
Congiuntivite micotica	Degenerate; presenza di ife e spore PAS positive	+	+++	++		++	
Congiuntivite allergica	Degenerate Disaggregate	+	+	+++			
Cheratocongiuntivite secca	Degenerate Disaggregate Cheratinizzate	ASSENTI	+++		++		
Congiuntivite autoimmune	Degenerate Disaggregate	++	++	+	++	++ istiocitari	
Congiuntivite eosinofila felina	+++	++		+++ masto citi			

Conclusioni

La citologia per impressione è una tecnica non invasiva, di facile utilizzo, pratica e sicura. Il materiale ottenuto tramite l'apposizione di una membrana Millipore non altera la struttura cellulare e permette quindi un'ottima interpretazione citologica. Infatti in medicina umana viene considerata al pari di una biopsia congiuntivale, in quanto permette di osservare il tessuto nel suo "status" patologico attuale. Nella valutazione oftalmologica, pertanto, è un ausilio indispensabile per la diagnosi differenziale e per una conseguente accurata scelta terapeutica.