



UNIVERSITA' DI PISA
FACOLTA' DI MEDICINA VETERINARIA

Corso di Laurea Magistrale in Medicina Veterinaria

**Prevalenza stagionale di specie micotiche nella congiuntiva
di bovini sani: risultati conseguiti nel biennio 2006-2008**

Candidato: Brombin Martina

Relatore: prof.ssa Francesca Mancianti

Correlatore: dott.ssa Micaela Sgorbini

AA 2007-2008

RIASSUNTO

Parole chiave: bovino, flora micotica congiuntivale, cheratOMICOSI.

Le patologie corneali ed in particolar modo le cheratOMICOSI sono molto rare nel bovino. Scopo della tesi è valutare la presenza di miceti nel fornice congiuntivale di tale specie animale.

Durante il periodo novembre 2006- agosto 2008 sono stati eseguiti campionamenti a cadenza stagionale di tipo semi-quantitativo dal fornice congiuntivale di 60 bovini appartenenti a tre diverse tipologie di allevamento (stabilizzazione fissa -allevamento 1-; semibrado -allevamento 2- ; brado -allevamento 3). In ogni allevamento sono stati campionati anche l'alimento e l'aria da un punto di vista qualitativo e quantitativo.

Nell'allevamento 1 sono state rilevate 28 specie di miceti, nell'allevamento 2 le specie coltivate sono state 24 e 19 nell'allevamento 3.

Penicillium sp è stato rilevato in tutti e tre gli allevamenti in tutti i prelievi; *Cladosporium* sp in 7 prelievi negli allevamenti 1 e 2 ed in tutti i prelievi nell'allevamento 3. Gli aspergilli più frequentemente isolati sono: *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus* nell'allevamento 1 e 2, *A. niger* e *A. flavus* nell'allevamento 3. Nei prelievi eseguiti nel periodo autunnale ed invernale non si è riscontrata grande variabilità di specie fungine, a differenza di quanto rilevato nei prelievi eseguiti nella stagione primaverile ed estiva. Per quanto riguarda l'alimento meno contaminato nell'arco dei due anni di studio risulta l'unifeed. I miceti isolati dall'aria sono gli stessi isolati sia dall'alimento che da fornice congiuntivale, anche se vi è maggior correlazione tra i miceti isolati dall'occhio e dall'aria rispetto a quelli isolati dall'occhio e dall'alimento.

Come già visto per il cavallo, anche nel bovino l'allevamento a maggior rischio di contaminazione risulta quello al "chiuso" nel quale le UFC risultano essere in numero maggiore rispetto alle altre due tipologie di allevamento. Nel corso degli anni gli occhi dei bovini esaminati sono risultati pesantemente contaminati da miceti pur non presentando segni di cheratOMICOSI, indicando la probabile maggior resistenza di questa specie animale.

ABSTRACT

Key words: bovine, conjunctival fungal flora, keratomycosis

Keratomycosis is rare in bovine species. The aim of the present study was to evaluate conjunctival fungal flora in cows.

During a two year period (november 2006- august 2008) specimens from the conjunctival fornix of 60 cows, as well as air and food samples, were seasonally collected in three different breeding farms (stabilized 1, semi wild 2, and wild 3).

Twenty-eight, 24 and 19 mycotic species were cultured from farms 1, 2 and 3, respectively.

Penicillium was the most frequently recovered species from all the farms, throughout the whole period of the study, *Cladosporium* sp was present in 7/8 samplings in farms 1 and 2, and in 8/8 in the other stable. *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus* were the more frequently isolated aspergillus species both in farms 1 and 2, *A. niger* e *A. flavus* from farm 3. Fall and winter specimens yielded more homogeneous results rather than spring and summer ones. Unifeed appeared less colonized than hay and cattle feed. The same fungal species were cultured from environment and conjunctival fornix. Air samples yielded similar results with respect to ocular specimens.

As reported in the horse, cows kept in a confined environment showed the highest fungal prevalences. Even if asymptomatic, bovine eyes revealed a high fungal burden. This evidence would indicate an innate resistance to fungal infections.

INDICE

PARTE GENERALE

ANATOMIA E FISIOLOGIA DELL'OCCHIO	pag. 5
<i>Globo oculare</i>	pag. 5
Tunica fibrosa	pag. 5
Tunica vascolare	pag. 7
Tunica nervosa	pag. 8
Camere dell'occhio	pag. 8
Cristallino	pag. 9
Annessi oculari	pag. 9
L'ESAME OFTALMOLOGICO	pag. 12
PATOLOGIE OCULARI	pag. 17
<u>MALATTIE OCCHIO DI ORIGINE INFIAMMATORIA</u>	pag. 17
CONGIUNTIVA	pag. 17
<u>Flogosi</u>	pag. 17
CORNEA	pag. 18
<u>Ferite</u>	pag. 18
<u>Flogosi</u>	pag. 18
<u>Cheratite superficiale</u>	pag. 18
<u>Cheratite pannosa</u>	pag. 19
<u>Cheratite interstiziale</u>	pag. 19
<u>Cheratite posteriore</u>	pag. 19
<u>Ulcera corneale</u>	pag. 19
<u>Cheratomalacia</u>	pag. 19
<u>Opacizzazione e cicatrizzazione della cornea</u>	pag. 20
<u>MALATTIE OCCHIO AD EZIOLOGIA INFETTIVA</u>	pag. 21
<u><i>Moraxella bovis</i></u>	pag. 21
<u><i>Mycoplasma bovoculi</i></u>	pag. 21
<u><i>Chlamydie bovoculi</i></u>	pag. 21
<u><i>Herpes virus</i></u>	pag. 22
<u>MALATTIE OCCHIO AD EZIOLOGIA PARASSITARIA</u>	pag. 23
<u>MALATTIE NEOPLASTICHE</u>	pag. 24
CHERATOMICOSI	pag. 25
Introduzione	pag. 25
Mezzi di difesa della cornea	pag. 25
Fattori predisponenti	pag. 25
Agenti eziologici	pag. 26
Insorgenza	pag. 28
Patogenesi	pag. 28
Sintomatologia	pag. 29
Diagnosi	pag. 29

Diagnosi differenziale	pag. 29
Terapia	pag. 29
Prognosi	pag. 30
SPECIE FUNGINE COINVOLTE NELL'EZIOLOGIA DELLA CHERATOMICOSI	pag. 32
MUFFE	pag. 32
<i>Aspergillus spp</i>	pag. 32
<i>Penicillium spp</i>	pag. 34
<i>Acremonium spp</i>	pag. 34
<i>Fusarium spp</i>	pag. 34
<i>Cladosporium spp</i>	pag. 35
<i>Alternaria spp</i>	pag. 35
<i>Mucoraceae spp</i>	pag. 35
LIEVITI	pag. 37
PARTE SPECIALE	
MATERIALE E METODI	pag. 38
<u>Allevamento 1</u>	pag. 39
<u>Allevamento 2</u>	pag. 39
<u>Allevamento 3</u>	pag. 40
<u>ANIMALI</u>	pag. 41
<u>ARIA</u>	pag. 41
<u>ALIMENTO</u>	pag. 42
<u>PREPARAZIONE TAMPONI</u>	pag. 43
<u>PREPARAZIONE PIASTRE</u>	pag. 43
<u>RACCOLTA TAMPONI OCULARI</u>	pag. 44
<u>RACCOLTA CAMPIONE ARIA</u>	pag. 44
<u>RACCOLTA ALIMENTO</u>	pag. 44
<u>MONITORAGGIO TEMPERATURA E UMIDITA' AMBIENTALI</u>	pag. 44
<u>SEMINA TAMPONI OCULARI</u>	pag. 45
<u>SEMINA ALIMENTO</u>	pag. 45
<u>PIASTRE ARIA</u>	pag. 46
<u>IDENTIFICAZIONE DEI MICETI</u>	pag. 47
<u>ANALISI STATISTICA</u>	pag. 48
RISULTATI	pag. 49
ANNO 2006-2007	pag. 49
ANNO 2007-2008	pag. 53
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	pag. 59
BIBLIOGRAFIA	pag. 63
RINGRAZIAMENTI	pag. 66

ANATOMIA E FISIOLOGIA DELL'OCCHIO

L'organo della vista od occhio è deputato alla ricezione di stimoli luminosi. È costituito dal *globo oculare*, ove sono contenuti i fotorecettori, e da un insieme di strutture accessorie. Queste comprendono la fascia del bulbo, i muscoli estrinseci, il corpo adiposo, le palpebre, la congiuntiva, e l'apparato lacrimale (Pelagalli e Botte, 1999).

Le componenti appena ricordate sono contenute in una cavità ossea, *l'orbita*. La parte posteriore del globo è avvolta da una membrana connettivale resistente, *la periorbita* che si inserisce sul margine della cavità orbitaria; la parte anteriore dell'occhio presenta invece una superficie che si affaccia libera verso l'esterno in corrispondenza della rima palpebrale. La parte anteriore del globo oculare è protetta da due pliche cutanee, *le palpebre*, e da una mucosa, *la congiuntiva*, che tappezza la faccia interna della palpebra superiore ed inferiore, la terza palpebra e aderisce per un piccolo tratto alla porzione libera del bulbo stesso (Nickel, 1988).

Globo oculare (Pelagalli e Botte, 1999)

È un organo cavo di forma sub sferica accolto nell'orbita. Nel bovino il globo oculare è di forma sferoidale (diametro medio di circa 60 mm) e presenta una parete costituita da tre membrane poste concentricamente e indicate a partire dalla più esterna all'interna, come tuniche fibrosa, vascolare, e nervosa. La sua cavità accoglie il cristallino, speciale lente biconvessa dotata di notevole elasticità. Per la presenza di questo organo e dell'iride la cavità del bulbo è distinta in tre distretti chiamati, nel senso antero-posteriore, *camera anteriore* (tra cornea e iride), *posteriore* (tra iride e cristallino) e del *vitreo*. Le prime due sono ripiene di liquido, *l'umor acqueo*, la terza ospita il *corpo vitreo*.

Tunica fibrosa (Perruccio, 1985; Lavach, 1990; Slatter, 1990; Severin, 1995; Gelatt, 1991; Pelagalli e Botte, 1999)

Delimita tutta la superficie esterna del globo oculare ed appare distinto in due componenti: *sclera* e *cornea*. Il limite tra le due parti è disposto a livello del quinto anteriore del globo oculare ed è segnato dalla giunzione *sclerocorneale* o *limbo*.

La sclera, che costituisce lo strato medio è formata da tessuto connettivo fibroso, denso e bianco, nel quale sono accolte poche cellule pigmentate e fibre elastiche.

Al suo esterno è connessa attraverso uno strato di connettivo lasso (*episclera*) alla fascia del bulbo. Sul polo posteriore presenta vari orifizi destinati al passaggio del nervo ottico e dei vasi sanguigni. La parte esterna anteriore invece, è ricoperta dalla congiuntiva che passa poi sulla cornea.

La cornea è la parte anteriore della tonaca esterna dell'occhio ed è responsabile, assieme alla sclera, della forma e delle dimensioni dell'occhio stesso. La cornea è una calotta trasparente priva di vasi sanguigni che nel bovino è ben rilevata e di forma ovoidale; spessa 2 mm, ha diametro massimo verticale di 22 mm e orizzontale di 30 mm. Contrae rapporti con la sclera e la congiuntiva al livello del limbo, con il film lacrimale, che bagna la sua superficie più esterna con l'umor acqueo, a contatto invece con la tonaca più interna. Dal punto di vista chimico la cornea risulta costituita dall'81% di acqua, dal 18% di collagene e dall' 0,08 % di lipidi.

L'epitelio e l'endotelio contengono una maggiore percentuale di lipidi (4,3 % della S.S.) e risultano avere un'attività metabolica per lo più di tipo aerobio; il metabolismo dello stroma è, al contrario, anaerobio. La cornea può utilizzare l'ossigeno proveniente dal film lacrimale, dai capillari libici e dall'umor acqueo.

La sezione istologica della cornea mette in evidenza più strati sovrapposti, quindi dall'esterno verso l'interno possiamo distinguere: epitelio, membrana basale, sostanza propria (o stroma), la membrana di Descemet e l'endotelio.

L'epitelio è di tipo pavimentoso stratificato e composto da circa 5-20 strati di cellule; tale strato è caratterizzato da rapido turnover.

La membrana basale è essenziale per mantenere adeso l'epitelio agli strati più profondi.

Lo stroma, o sostanza propria, rappresenta circa il 90% dello spessore della cornea ed è costituito da fibre collagene, fibroblasti e sostanza cementante. Le fibre collagene, disposte regolarmente in fasci paralleli, formano delle lamelle che si estendono per tutto il diametro. Queste fibre sono mantenute in posizione dalla sostanza cementante, costituita da mucopolisaccaridi; negli spazi interlamellari si

possono ritrovare fibroblasti appiattiti, detti cheratociti, il cui turnover risulta essere molto lento, durando anche più di un anno.

Le cellule dello stroma formano una struttura molto densa, in cui non decorrono vasi ematici. Lo strato più superficiale dello stroma è innervato abbondantemente da fibre nervose demielinizzate, che penetrano dal limbo, derivanti dalla branca oftalmica del nervo trigemino.

La struttura lamellare dello stroma, con le fibre collagene che attraversano la cornea in modo ordinato da un limbo ad un altro, permette a questa struttura di essere trasparente, a differenza della sclera in cui le fibre collagene sono disposte in ordine sparso, assumendo, infatti, una colorazione biancastra.

La membrana di Descemet è lo strato su cui poggia l'endotelio corneale; è costituita da filamenti di collagene, disposti in strati paralleli alla superficie e, dal punto di vista ultrastrutturale, da materiale amorfo (collagene atipico).

A livello del limbo lo strato anteriore si unisce alla sclera, quello medio al muscolo ciliare mentre quello posteriore passa all'iride, formando il legamento pettinato dell'angolo irido-corneale.

L'endotelio costituisce, infine, la superficie posteriore della cornea e si continua nell'endotelio anteriore dell'iride. Questo strato è formato da un sottile monostrato di cellule poliedriche, con capacità rigenerativa molto scarsa. Tra le cellule dell'endotelio esistono stretti rapporti con interdigitazioni giunzionali, *zonula occludens e macula adherens*.

Tunica vascolare (Pelagalli e Botte, 1999)

Molto ricca di vasi sanguigni occupa posizione intermedia tra tunica nervosa, interna e sclera esterna. È distinta in tre porzioni: 1) coroide; 2) corpo ciliare; 3) iride.

1. Coroide: si estende per gran parte della superficie del globo oculare. È relativamente spessa, consta essenzialmente di tessuto connettivo ricco di fibre elastiche nel quale si distinguono vari piani: sovra coroide (strato di connettivo lasso), strato vascolare (ricco di vasi ematici), *tapetum* (componente riflettente che occupa parte del fondo del globo oculare e nel bovino ha forma grosso modo triangolare, da riflessi verde bluastrici con una componente rossastra negli animali giovani), lamina corio-capillare

(membrana molto vascolarizzata) e lamina basale (addossata alla tunica nervosa).

2. Corpo ciliare: è una formazione anulare che fa rilievo nella cavità del globo oculare, la sua superficie esterna è applicata alla sclera; quella interna rivestita dalla tunica nervosa modificata, appare piuttosto irregolare e distinta in due settori: orbicolo ciliare (esterno), e corona ciliare (interna).
3. Iride: è un diaframma verticale posto all'interno del globo oculare, appena davanti al cristallino; nel bovino è più spesso, ha colore scuro ed è percorso all'esterno da numerose piccole pliche. L'iride al centro presenta il foro pupillare o pupilla che nel bovino è ovale a grande asse trasversale; quando è dilatata tende alla forma circolare; sul suo bordo si distinguono numerosi granuli iridici che in profondità corrispondono a piccoli gruppi di fibrocellule muscolari lisce ad andamento circolare.

Tunica nervosa o retina (Pelagalli e Botte, 1999)

È la membrana più interna del globo oculare. Aderisce alla coroide, consta di due lamine strettamente adese: quella esterna è formata da cellule pigmentate e l'interna da cellule più propriamente nervose: cellule dei coni e le cellule dei bastoncelli che sono i fotorecettori; le cellule bipolari che si adattano a ricevere le terminazioni sinaptiche dei fotorecettori, e le cellule multipolari sono i neuroni di discrete dimensioni dove il loro neurite entra nella costituzione del nervo ottico.

La retina del bovino, alla periferia, ha un consistente numero di microscopici vasi sanguigni che si spingono verso il vitreo.

Camere dell'occhio (Pelagalli e Botte, 1999)

Nel globo oculare, si distinguono le 1) camera anteriore, 2) camera posteriore 3) camera del vitreo.

1. Camera anteriore: delimitata dalla cornea e dall'iride, è tappezzata da endotelio. Comunica attraverso la pupilla con la camera posteriore.
2. Camera posteriore: piccolo spazio posto tra iride e cristallino. Le due camere sono ripiene di *umor acqueo*, liquido acquoso contenente sali, glucosio e piccole quantità di proteine.

3. Camera del vitreo: si estende dietro al cristallino ed è occupata dal *corpo vitreo*, una formazione di consistenza gelatinosa nella quale sono incluse numerose fibre che, concentrandosi negli strati periferici, costituiscono la *membrana vitrea*.

Cristallino (Pelagalli e Botte, 1999)

Il cristallino è una lente biconvessa trasparente; collocata trasversalmente subito dietro l'iride, è accolto in una depressione del corpo vitreo, la *fossa ialoidea*, ed è ancorato ai processi ciliari mediante le fibre zonali che lo raggiungono a livello dell'equatore. Nella struttura del cristallino si distinguono la capsula, l'epitelio e la sostanza del cristallino. La *capsula* è una struttura di connettivo lamellare, che ingloba l'organo e riceve le fibre zonali. L'*epitelio* è ben distinto sulla faccia anteriore del cristallino. Di tipo cubico, tende a formare posteriormente delle strutture allungate, le *fibre del cristallino*, poste in strati concentrici.

La *sostanza del cristallino*, di natura amorfa, provvede a tenere unite le fibre del cristallino e a renderle otticamente omogenee.

Annessi oculari (Perruccio,1985; Lavach, 1990; Slatter, 1990; Gelatt, 1991; Severin, 1995; Pelagalli e Botte, 1999)

Le *palpebre* sono il mezzo di protezione più importante dell'occhio, costituendo una barriera fisica ad insulti di diversa natura e contribuendo, con l'ammiccamento, alla distribuzione del film lacrimale. Le palpebre sono due pliche laminari mobili che limitano l'apertura dell'orbita e, nel bovino, sono rotondeggianti.

Il muscolo orbicolare si estende per tutta la circonferenza delle palpebre e consente con la sua contrazione di modificare le dimensioni della fessura palpebrale.

A tale scopo concorrono anche il muscolo elevatore dell'angolo mediale dell'occhio, il muscolo elevatore della palpebra superiore, il muscolo malare, che abbassa la palpebra inferiore e il muscolo di Muller che contribuisce anch'esso ad ampliare l'apertura della fessura palpebrale.

A livello palpebrale si possono rinvenire diverse ghiandole, fra le quali quelle di Meibonio, a secrezione lipidica, disposte lungo il bordo palpebrale, nella lamina

tarsale; annesse ai bulbi piliferi delle ciglia troviamo le ghiandole di Zeis, sebacee, e quelle di Moll, sudoripare modificate.

La terza palpebra denominata anche membrana nittitante, è una struttura essenziale per gli animali domestici; nel bovino è particolarmente sviluppata e può scorrere sulla cornea in direzione supero-temporale. Tale membrana svolge diverse funzioni, tra le quali quella di contribuire alla protezione della cornea, alla secrezione e alla distribuzione del film lacrimale; sulla sua superficie posteriore si possono rilevare noduli linfatici, che le conferiscono, quindi, anche attività immunitaria. La terza palpebra presenta uno scheletro cartilagineo a forma di T ed è rivestita da congiuntiva; alla sua base è localizzata una ghiandola lacrimale sierosa accessoria.

L'apparato lacrimale è costituito da un insieme di diverse ghiandole, il cui secreto va a costituire il film lacrimale.

La ghiandola lacrimale orbitale, situata nella porzione temporale superiore dell'orbita, è dotata di numerosi dotti che sboccano in posizione antero-laterale nel fornice congiuntivale; insieme alla ghiandola della terza palpebra, essa è la fonte primaria della componente sierosa delle lacrime.

Le ghiandole di Meibonio e di Zeis contribuiscono, invece, alla formazione del film lacrimale, apportando sostanze lipidiche, mentre la componente muco-proteica è prodotta soprattutto dalle cellule mucipare caliciformi. Da questo si denota la complessità della composizione del film lacrimale, che risulta dalla sovrapposizione di tre diversi strati:

- lo strato esterno lipidico che impedisce l'evaporazione e la rottura del film lacrimale;
- quello intermedio sieroso;
- infine quello interno, *pre-corneale*, ad alto contenuto di leucociti, lisozima e mucina, che favorisce l'adesione del film lacrimale alla superficie dell'epitelio corneale, di per sé idrofobica.

Il film lacrimale lubrifica la superficie della cornea e facilita la chiusura delle palpebre, senza che queste provochino irritazione, per sfregamento, della congiuntiva e della cornea stessa.

Le lacrime apportano sostanze necessarie per il trofismo dell'epitelio corneale, il quale da qui assorbe ossigeno ed altre sostanze utili al proprio metabolismo; allontanano inoltre le impurità, corpi estranei, cataboliti e svolge, grazie alla presenza di lisozima e leucociti, attività antibatterica.

Il film lacrimale mantiene, inoltre, l'attività ottica della cornea; esso, infatti, è la prima superficie rifrattiva dell'occhio ed ha indice di rifrazione paragonabile a quello della cornea stessa.

La congiuntiva è una membrana mucosa che riveste la superficie interna delle palpebre e la nittitante (congiuntiva palpebrale), nonché una porzione del globo oculare anteriore (congiuntiva bulbare. Nella zona di passaggio tra cornea e sclera, a livello del limbo, la congiuntiva bulbare si fonde con la capsula di Tenone, lo strato di connettivo che circonda la parte posteriore del globo. La congiuntiva è provvista di una rete capillare e linfatica molto sviluppata ed è, inoltre, scarsamente pigmentata, fatta eccezione per il bordo della nittitante e l'area perilimbare.

Dal punto di vista istologico, la congiuntiva è costituita da un epitelio pluristratificato, caratterizzato dalla mescolanza di elementi cuboidali e di cellule caliciformi, e dallo stroma, ricco di tessuto linfatico, in cui decorrono vasi e nervi; la rete linfatica afferisce ai linfonodi parotidei e sottomandibolari.

Nel bovino la congiuntiva è talora pigmentata in prossimità della rima palpebrale e del limbo, può contenere ghiandole lacrimali accessorie e piccoli noduli linfatici.

L'ESAME OFTALMOLOGICO

(Rosenberger, 1993)

L'esame oftalmologico deve essere possibilmente effettuato in ambiente tranquillo, leggermente oscurato, sull'animale in stazione quadrupedale, all'occorrenza blandamente sedato, la cui testa è mantenuta ferma da un aiuto con la presa sottomandibolare.

Ispezione ed esame oftalmoscopico

Si osservano una per una le varie componenti dell'apparato visivo, in parte ad occhio nudo:

- regione periorbitale, palpebre, cornea e sclera alla luce diffusa derivante da una lampada tascabile o frontale;
- cornea, camera anteriore dell'occhio, iride e cristallino con luce incidente focalizzata di una lampada tascabile o di una penna luminosa), in parte ricorrendo a particolari strumenti quali oftalmoscopio diretto o lampada a fessura portatile.

Si devono esaminare contestualmente le regioni periorbitali destra e sinistra, al fine di rilevare asimmetrie secondarie ad edemi, ematomi, flemmoni, ascessi, tumori o altre alterazione mono o bilaterali quali aree alopeciche, ferite, cicatrici.

E' necessario valutare l'eventuale presenza di secrezione oculare, mono o bilaterale. Successivamente si controllano integrità, posizione e mobilità delle palpebre superiore e inferiore di entrambi gli occhi. Gli aumenti di volume su base infiammatoria o meno sono relativamente frequenti e, data la struttura alquanto lassa e finemente pieghettata della cute palpebrale normale, non di rado piuttosto considerevoli. In genere sono di origine traumatica (contusioni o ferite da taglio), talora però possono essere manifestazioni secondarie ad una malattia sistemica. Introflessioni (*entropion*) o estroflessioni (*ectropion*) del margine libero delle palpebre sono spesso la conseguenza di una ferita recente o pregressa, guarita con una cicatrice retratta, più di rado sono congenite e quasi sempre si accompagnano ad una persistente irritazione della superficie del bulbo oculare.

La mobilità attiva di una o di entrambe le palpebre può essere limitata o completamente assente per uno spasmo, per un impedimento meccanico, per paralisi o per aderenze, tra i margini palpebrali.

La membrana nittitante di norma è scarsamente visibile. Per il suo esame ispettivo è necessario sospingere il globo oculare nella cavità orbitale attraverso la palpebra superiore interposta. In genere, la mucosa della terza palpebra è coinvolta dai processi patologici che interessano i restanti settori della congiuntiva.

Alla ispezione della *rima palpebrale* si devono considerare la forma e l'ampiezza che sono determinate non solo dalle anomalie palpebrali, ma anche dal volume e dalla posizione del bulbo oculare. Così la fessura palpebrale si presenta più stretta che di norma o addirittura persistentemente chiusa nei seguenti stati patologici:

- anchyloblefaron parziale o totale,
- microftalmo,
- enoftalmo,
- processi meccanico-irritativi dell'occhio,
- edema infiammatorio,
- ipertrofia neoplastica,
- paralisi palpebrale.

Si fa poi seguire l'ispezione del *bulbo oculare* nel suo insieme, considerandone il volume, la posizione, i movimenti e la direzione dell'asse visivo. Il bulbo oculare può risultare più grande o più piccolo della norma sin dalla nascita o per una malattia pregressa.

Con il termine di enoftalmo viene definito l'infossamento del bulbo oculare nell'orbita e lo si osserva, tra l'altro, negli animali disidratati e cachettici, nello spasmo del muscolo retrattore e quando l'occhio è abnormemente piccolo.

Nell'esoftalmo invece il bulbo oculare sporge dalla rima palpebrale più del normale. In condizioni di riposo l'asse visivo del bovino risulta normalmente deviato di 50 gradi dall'asse mediano verso il lato temporale; il campo visivo spazia, da entrambi i lati, di circa 135 gradi dall'asse mediano in direzione laterale. Le deviazioni persistenti dell'asse visivo dalla sua posizione normale, modicamente divergente, si definiscono strabismo.

Dopo aver osservato la sclera insieme al suo rivestimento congiuntivale per rilevarne eventuali cambiamenti di colore, conformazione dei vasi episclerali, reazioni infiammatorie o perdite di sostanza, si ispeziona il bulbo oculare progressivamente dal polo anteriore al polo posteriore (vale a dire dalla cornea alla retina) e si osserva con l'oftalmoscopio.

Per esaminare la *cornea* del bovino è sufficiente l'osservazione ad occhio nudo a luce diffusa o ad incidenza tangenziale con una lampada tascabile; i particolari però sono rilevabili solo appositi strumenti. Nell'esame della cornea si devono considerare le sue caratteristiche superficiali:

- lucentezza,
- aspetto liscio,
- regolarità,
- stratificazioni o depositi,
- trasparenza,
- curvatura.

I caratteri della superficie sono particolarmente ben valutabili mediante l'oftalmoscopio o la lampada a fessura. Ad occhio nudo si possono rilevare le seguenti lesioni della superficie corneale:

1. corpi estranei,
2. ferite perforanti,
3. isole di cute con peli,
4. aderenze connettivali tra le palpebre,
5. panno corneale.

le perdite di tessuto corneale piccole e superficiali spesso si rendono visibili solo dopo aver immesso nel sacco congiuntivale alcune gocce di soluzione colorante (ad es. fluoresceina).

Attraverso la cornea si può vedere chiaramente e distintamente la camera anteriore dell'occhio, l'iride e la pupilla se la trasparenza della cornea risulta normale.

In presenza di eventuali opacità della cornea se ne devono considerare:

1. la localizzazione,
2. l'estensione,
3. la vitalità,
4. il colore,
5. i caratteri della superficie,
6. interessamento mono o bioculare.

Opacità corneali monolaterali si osservano per cicatrici conseguenti a ferite, mentre alterazioni bilaterali dello stesso tipo sono in genere dovute ad opacamenti congeniti della cornea, a febbre catarrale maligna, mentre la cheratocongiuntivite infettiva del bovino è caratterizzata da opacità mono o bilaterali; in quest'ultimo caso risultano

sempre asimmetrici. I contorni dell'area opaca possono risultare sfumati e discontinui, in questo caso il processo di opacamento è ancora in atto e può progredire, al contrario le opacità corneali a contorni netti sono da considerare esiti di lesioni pregresse. Le opacità corneali brune e nere sono, in genere, dovute a sinechie tra la superficie posteriore della cornea e l'iride. La trasparenza della cornea viene compromessa anche dai piccoli vasi che, nelle gravi forme di cheratite, penetrano in essa proliferando dalla congiuntiva.

Nell'ispezione della *camera anteriore dell'occhio*, che possibilmente deve essere effettuata con illuminazione focale laterale o con lampada a fessura, si deve considerare il contenuto e la profondità. In condizioni normali la camera anteriore contiene un liquido limpido-acquoso, che può perdere la trasparenza parzialmente o completamente se è presente materiale patologico.

Dell'*iride* si devono considerare:

1. il colore,
2. il disegno,
3. la posizione,
4. la forma,
5. l'ampiezza,
6. il comportamento della pupilla.

Variazioni cromatiche dell'iride compaiono occasionalmente come anomalie congenite della pigmentazione.

Le perdite di sostanza dell'iride dovute a malformazioni, traumi o processi infiammatori si manifestano come soluzioni di continuo simili a pupille supplementari. Nei ruminanti domestici di grande taglia il margine superiore della pupilla presenta delle formazioni simili a granuli, tondeggianti, di varia grandezza.

Alterazioni della normale forma della pupilla si osservano soprattutto per aderenze tra iride e superficie posteriore della cornea o faccia anteriore del cristallino, come pure nelle dislocazioni del cristallino. Anche un margine pupillare lacerato o sfrangiato è indicativo di aderenze tra iride e cristallino come avviene ad esempio in corso di uveiti.

I riflessi pupillari vengono esaminati con l'ausilio di una lampada luminosa. Una persistente miosi può essere espressione di una ipertonìa del parasimpatico, di una paralisi del muscolo dilatatore o di uno spasmo del muscolo sfintere della pupilla. Nel bovino questo sintomo è rilevabile non solo come manifestazione collaterale o

conseguente a cheratiti, ma anche nelle meningiti e nella intossicazione da esteri fosforici.

Il *cristallino* può essere ispezionato in ambiente oscurato servendosi di un oftalmoscopio diretto o, meglio, di una lampada a fessura. Le alterazioni patologiche del cristallino riguardano soprattutto la trasparenza e la posizione. L'opacità del cristallino, definita come cataratta, è in genere di colore grigio o biancastro, di forma ed estensione variabile, può interessare tutto o in parte il cristallino con alterazione più o meno grave della funzione visiva.

I *corpi ciliari* e la *camera posteriore dell'occhio* non sono accessibili ad una osservazione diretta in quanto coperti dall'iride.

Il *corpo vitreo* viene esaminato mediante l'oftalmoscopio diretto o con l'oftalmoscopia indiretta.

L'esame del fondo dell'occhio si esegue tramite oftalmoscopia indiretta previa applicazione di un midriatico ad azione breve.

PATOLOGIE OCULARI

(Rosenberger, 1996; Gerrit Dirksen *et al.*, 2004)

In confronto alla patologia oculare del cavallo e dei piccoli animali quella del bovino ha un'importanza pratica inferiore, tuttavia richiede un'analogia attenzione per quanto riguarda il benessere animale e i risvolti negativi sulle produzioni.

MALATTIE DELL'OCCHIO DI ORIGINE INFIAMMATORIA

CONGIUNTIVA

Flogosi

Nel bovino le congiuntiviti su base meccanica, tossica, allergica o provocate da stimoli luminosi sono assai più rare delle congiuntiviti ad eziologia infettiva a seconda dei casi si tratta per lo più di conseguenze di traumi contusivi o di corpi estranei finiti nel sacco congiuntivale. In seguito allo stretto e reciproco contatto le congiuntive del bulbo e della palpebra si ammalano di norma contemporaneamente per la stessa causa, dando luogo a una flogosi che, in funzione delle caratteristiche dell'essudato, può essere distinta in catarrale, fibrinosa e purulenta.

Nelle forme di *congiuntivite catarrale* oltre a fotofobia si riscontra un leggero arrossamento della congiuntiva e aumentata secrezione lacrimale, mentre nelle forme gravi o persistenti si ha un rigonfiamento evidente della congiuntiva (*chemosi*) e un accumulo al di sotto dell'occhio di essudato mucoso grigiastro, con formazione di croste non maleodoranti. Nelle forme di *congiuntivite fibrinosa* sull'area prossima alla commessura palpebrale viene ad aderire un essudato flogistico di colore grigio-giallastro, consistente e al contempo stesso elastico, di odore di putrefazione. Le forme di *congiuntivite purulenta* si caratterizzano per l'escrezione di un essudato denso e maleodorante; sulla congiuntiva si possono evidenziare erosioni o necrosi e lo stato generale può essere compromesso.

Le forme leggere di congiuntivite catarrale possono guarire rapidamente e spontaneamente, una volta rimossa la causa; altrimenti tendono a peggiorare

evolvendo in cheratocongiuntivite; questo vale in modo particolare per le congiuntiviti da corpo estraneo.

CORNEA

Ferite

I traumi della cornea possono essere dovuti a cornate, urto con oggetti appuntiti oppure penetrazioni di corpi estranei; tali ferite vanno distinte in superficiali, profonde (in questo caso è interessata la membrana di Descemet) e perforanti (in questo caso la cornea è perforata ed è esposta la camera anteriore dell'occhio). L'animale mostra fotofobia epifora e blefarospasmo.

Flogosi

Le *cheratiti* vengono classificate in 1) superficiali, 2) interstiziali - parenchimatose, 3) posteriori, in base allo strato della cornea colpito.

La classificazione eziologica vede cheratiti:

1. irritativo-traumatiche,
2. infettive,
3. tossiche,
4. allergiche.

La cheratite di solito è associata a congiuntivite e/o ad iridociclite; talvolta è sintomo di altre malattie, come ad esempio la Febbre Catarrale Maligna

Cheratite superficiale

Causata da irritazioni meccaniche, ferite, corpi estranei, parassitosi come ad esempio la *Thelazia* spp. L'animale malato, oltre a fotofobia, presenta blefarospasmo e scolo lacrimale. La cheratite è caratterizzata da un opacamento dovuto all'edema corneale e all'infiltrazione leucocitaria. L'opacamento può rimanere circoscritto o può estendersi e la superficie corneale si può presentare ondulata o scabrosa. La lesione può evolvere con la penetrazione, di piccoli vasi sanguigni a decorso tortuoso a partire dalla congiuntiva sclerale, mentre lo scolo oculare diventa mucoso, talvolta anche purulento.

Cheratite pannosa

Consiste nella produzione di un tessuto di granulazione iperplastico a carico della superficie corneale, che può manifestarsi per una grave irritazione della cornea.

Cheratite interstiziale

Le cause e le manifestazioni cliniche della cheratite profonda note anche come cheratite parenchimatosa, si sovrappongono a quelle della cheratite superficiale. Se la lesione è grave, la cornea diviene opaca e mostra una colorazione anomala grigio-biancastra/grigio-rossastra diffusa nel suo interno fino alla lamina propria. Oltre alla rete di vasi sanguigni superficiali che si dipartono in forma di rami isolati dalla congiuntiva, la profondità del tessuto leso viene infiltrata da vasi sanguigni provenienti dal corpo ciliare, disposti più o meno similmente ad un pettine ad andamento circolare.

Cheratite posteriore

Nota anche come descemetite, consiste in una infiammazione limitata allo strato interno della cornea e compare per lo più in relazione a patologie a carico delle aree anatomiche dell'occhio in prossimità della cornea, in particolar modo le malattie dell'iride o la lussazione del cristallino.

Ulcera corneale

Può conseguire a ferite non trattate o non ben guarite nonché a cheratiti. A seconda delle circostanze concomitanti, l'ulcera inizialmente circoscritta può diffondere rapidamente o farsi più profonda, aumentando così il rischio di complicazioni. Oltre a fotofobia e scolo oculare mucoso, si osserva una zona corneale con perdita di sostanza sotto forma di cratere erosivo piatto, trasparente o leggermente opaco, oppure di ulcera profonda con margine rilevato grigio-rossastro, focolaio centrale di necrosi giallastra e infiltrazione periferica dei vasi sanguigni.

Cheratomalacia

Il disfacimento progressivo della cornea nel bovino è il più delle volte concomitante ad un esoftalmo che ostacola la chiusura delle palpebre e l'umidificazione della superficie oculare; in casi eccezionali consegue ad una gravissima forma di ipovitaminosi A. Tale patologia porta in modo progressivo ad un essiccamento e

indurimento della cornea che viene ad essere coperta sempre più da impurità che veicolano agenti infettivi.

Opacizzazione e cicatrizzazione della cornea

Da lesioni e ulcere corneali giunte a guarigione non raramente residuano macchie cicatriziali, talvolta anche protrusioni corneali. Tali lesioni a seconda dei casi possono ridursi di dimensioni o scomparire completamente previo trattamento.

MALATTIE DELL'OCCHIO AD EZIOLOGIA INFETTIVA

(Rosenberger, 1996; Gerrit Dirksen *et al.*, 2004)

Cheratocongiuntiviti infettive

Moraxella bovis

La cornea ed il sacco congiuntivale vengono colonizzate dal batterio *Moraxella bovis*, germe aerobio, gram-negativo. Si presenta prevalentemente in bovini al pascolo, presenta un'alta morbilità e si può presentare sia in forma sub-clinica che clinica. Se la cheratocongiuntivite non viene trattata, evolve in iridociclite, perforazione della cornea e panoftalmia purulenta.

I sintomi sono: fotofobia monolaterale, nel 10% dei soggetti bilaterale. Tale fotofobia si accompagna a scolo lacrimale, chiusura della rima palpebrale, talvolta febbre e abbattimento più o meno manifesto. A un esame clinico più attento si evidenzia miosi e a livello congiuntivale arrossamento, iperemia ed edema. Tale malattia si rende evidente soprattutto in estate ed autunno.

Mycoplasma bovoculi

Viene spesso isolato dall'occhio di bovini sani. Talvolta può dare luogo a congiuntivite di norma senza il coinvolgimento della cornea. La colonizzazione a livello dell'occhio viene pertanto considerato come un importante fattore predisponente nei confronti della cheratocongiuntivite infettiva. Si osserva principalmente in animali giovani e si manifesta con scolo oculare sieroso, presenza di croste gialle alla commessura delle palpebre mediali e arrossamento della congiuntiva.

Chlamydia bovoculi

E' considerata agente eziologico di congiuntivite infettiva nei ruminanti: peraltro il quadro patologico, per evolvere in forma purulenta o per estendersi anche alla cornea, necessita il sovrapporsi di un'infezione secondaria da germi piogeni o rispettivamente da *Moraxella* spp.

Herpesvirus

La congiuntivite è una delle manifestazioni patologiche in corso di Rinotracheite Infettiva Bovina causata da *Herpesvirus* bovino di tipo 1. La malattia talvolta può avere un interessamento generale dell'ospite, con febbre ed abbattimento. A livello congiuntivale, la sintomatologia evidenzia fotofobia e scolo oculare abbondante. Inoltre i vasi sanguigni episclerali sono iperemici, la congiuntiva fortemente arrossata, edematosa e ricoperta da essudato muco-fibrinoso. La cornea raramente viene coinvolta.

MALATTIE DELL'OCCHIO AD EZIOLOGIA PARASSITARIA

(Rosenberger, 1996; Gerrit Dirksen *et al.*, 2004)

Oltre alla *Thelazia* spp., le parassitosi a carico dell'apparato visivo sono:

1. demodicosi (*Demodex bovis*)
2. stefanofilariosi (*Stephanofilaria* sp)
3. besnoitiosi (*Besnoitia besnoiti*)
4. sarcocistosi (*S. canis*, *S. bovihominis*, *S. bovifelis*)
5. infestazioni da mosche facilitano l'instaurarsi di patologie della congiuntiva e cornea ad eziologia infettiva/infestiva.

La patologia è causata dalla reazione infiammatoria delle strutture coinvolte all'insediamento di vermi tondi appartenenti al genere *Thelazia* spp. I sintomi rappresentati sono: 1) scolo oculare e nasale, 2) fotofobia, 3) congiuntivite da catarrale a purulenta, 4) prurito locale, 5) iridociclite, 6) opacamento o ulcera corneale, 7) flemmone, 8) ascessi palpebrali.

MALATTIE NEOPLASTICHE

(Rosenberger, 1994; Gerrit Dirksen *et al.*, 2004)

Le palpebre del bovino sono colpite assai raramente da malattie neoplastiche a carattere non carcinomatoso.

1. La leucosi bovina in fase tumorale può colpire i follicoli linfatici retro-bulbari, causando la protrusione della congiuntiva, esoftalmo e panoftalmia purulenta.
2. Il carcinoma oculare bovino è una neoplasia maligna che colpisce l'epitelio palpebrale, congiuntivale e/o cornea corneale. Dal punto di vista istologico, il carcinoma è spino-cellulare ad alta invasività verso i tessuti vicini.

CHERATOMICOSI

Introduzione

La cheratomicosi è una patologia che colpisce le diverse specie animali, uomo compreso, ed è caratterizzata dall'invasione dello stroma corneale di miceti commensali oculari o di funghi patogeni, secondariamente a traumi o infezioni batteriche. Questa affezione è spesso caratterizzata da una rapida progressione, quest'ultima legata alla diagnosi tardiva e a una terapia frequentemente inappropriata. Gli esiti di questa lesione possono essere causa di perdita della funzione visiva dell'occhio colpito (Brooks *et al.*, 1999).

Mezzi di difesa della cornea

In condizioni normali la cornea, struttura avascolare, risulta protetta dagli agenti patogeni grazie all'azione delle palpebre (Severin, 1995), del film lacrimale più interno, contenente sostanze quali lisozima, immunoglobuline e neutrofili (Perruccio, 1985; Lavach, 1990; Slatter, 1990; Gelatt, 1991; Severin, 1995), e dell'epitelio corneale che, se integro, svolge un ruolo di barriera fisica nei confronti della normale microflora congiuntivale.

Anche la normale flora microbica rappresentata dai batteri Gram-positivi, Gram-negativi e miceti sembra svolgere un ruolo di difesa andando ad inibire la colonizzazione dell'occhio da parte di microrganismi patogeni (Brooks, 1999).

Fattori predisponenti

Affinché i miceti possano invadere lo stroma corneale è necessaria una diminuzione dei meccanismi di difesa dell'occhio stesso. Traumi oculari, erosioni od ulcere corneali ed infezioni batteriche predispongono quindi all'insorgenza delle cheratomicosi. In uno studio condotto da Brooks *et al.* (1999) e da Andrew *et al.* (2003), entrambi eseguiti sul cavallo, è stato rilevato che il precedente utilizzo di farmaci ad azione topica contenenti associazioni antibiotico-cortisoniche o di farmaci ad uso sistemico come i FANS, antibiotici e/o corticosteroidi sono, infatti, in grado di alterare il normale equilibrio della flora congiuntivale.

Agenti eziologici

I funghi isolati più frequentemente in corso di cheratomicosi appartengono al genere *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp, *Fusarium* spp, *Alternaria* spp, *Cladosporium* spp e lieviti (Bistner e Riss, 1979; Peiffer, 1979; Moore *et al.*, 1988; Grahan *et al.*, 1993; Andrew *et al.*, 1998; Brooks *et al.*, 1998); è da ricordare però, come alcuni fattori ambientali in cui vivono gli animali, tra i quali la stagione, la regione, il tipo di lettiera e la modalità di stabulazione, possano influenzare la presenza di generi e specie diverse a livello del fornice congiuntivale (Lennington *et al.*, 2002).

Elligott *et al.* (2006) hanno descritto un caso di cheratomicosi in un bovino Holstein. In questo caso gli agenti eziologici isolati sono risultati *Aspergillus* spp e *Fusarium* spp.

Samuelson *et al.*, (1984) hanno studiato la flora micotica congiuntivale di bovini, cavalli, cani e gatti. In particolare gli Autori hanno valutato 25 bovini, 43 cavalli, 50 cani e 25 gatti considerati sani dal punto di vista oftalmologico. Il 100% dei tamponi raccolti dal fornice congiuntivale dei bovini e il 95% di quelli raccolti dai cavalli sono risultati positivi per miceti.

Sempre nei bovini studiati, su un totale di 95 funghi isolati, 75 sono stati identificati e di questi 11/75 (12%) erano *Cladosporium* spp e 16/75 (16%) *Penicillium* spp, mentre solo 3/75 (3%) è stato classificato come *Aspergillus* spp.

Nei cavalli, su 88 funghi isolati, 81 sono stati identificati e di questi 23/81 (56%) erano classificati come *Aspergillus* spp, mentre solo 19/81 (22%) erano *Penicillium* spp (tabella 1).

Per quanto riguarda il cane, su 104 isolamenti, 84 sono stati isolati, e di questi 24/84 (28,6%) erano della specie *Cladosporium* spp e 24/84 (28,6%) *Candida* (tabella 1).

Per quanto riguarda il gatto, su 100 isolamenti, 91 sono stati isolati, e di questi 32/91 (35,2%) erano del genere *Cladosporium* spp, 16/91 (17,6%) erano *Penicillium* spp e 16/91 (17,6%) erano *Aspergillus* spp (tabella 1).

Quindi, secondo Samuelson *et al.* (1984), nel bovino la flora micotica fisiologica sembra essere rappresentata essenzialmente da *Cladosporium* spp e *Penicillium* spp, nel cavallo da *Aspergillus* spp, nel cane da *Cladosporium* spp e *Candida*, nel gatto da *Cladosporium* spp e in misura inferiore da *Penicillium* spp e *Aspergillus* spp.

CAVALLO		BOVINO		CANE		GATTO	
Miceti	%	Miceti	%	Miceti	%	Miceti	%
<i>A. niger</i>	3	<i>Cl. oxysporum</i>	10	<i>Cl. oxysporum</i>	24	<i>Cl. oxysporum</i>	32
<i>A. fumigatus</i>	9	<i>C. herbarum</i>	6	<i>C. lunata</i>	24	<i>Penicillium</i> spp	16
<i>A. flavipes</i>	3	<i>Penicillium</i> spp.	12	<i>G. murorum</i>	8	<i>Aspergillus</i> spp	16
<i>A. flavus</i>	4	<i>Scopulariopsis</i> spp.	7	<i>Exosporiella</i> spp	8	<i>S. brevicaulis</i>	9
<i>A. glaucus</i>	2	<i>Helminthosporium</i> spp	6	<i>S. brevicaulis</i>	8	<i>F. solani</i>	9
<i>A. nidulans</i>	2	<i>C. lunata</i>	6	Lieviti	8	<i>Helminthosporium</i> spp	9
<i>A. amstelodami</i>	1	<i>F. solani</i>	4	NI	20	NI	9
<i>Penicillium</i> spp	22	<i>C. albicans</i>	4				
Lieviti	13	<i>A. alternata</i>	3				
<i>A. alternata</i>	3	<i>A. niger</i>	2				
<i>A. tenuisissima</i>	3	<i>A. fumigatus</i>	1				
<i>Cl. resinae</i>	4	Lieviti	9				
<i>Cl. oxysporum</i>	2	<i>Exosporiella</i> spp	2				
<i>G. deliquescens</i>	6	<i>Drechslera</i> spp	3				
<i>T. viride</i>	2	<i>Histoplasma</i> spp.	1				
<i>G. candidum</i>	2	<i>T. herbarum</i>	1				
<i>V. tenuisissimum</i>	2	Lieviti filamentosi	3				
<i>Helminthosporium</i> spp	1	NI	20				
<i>C. albicans</i>	1						
<i>Botrytis</i> spp	1						
<i>T. herbarum</i>	1						
<i>M. chinata</i>	1						
NI	12						

Tabella 1 - Miceti isolati dal fornice congiuntivale di cavalli, bovini, cani e gatti sani (Samuelson *et al.*, 1984). Legenda - %: prevalenza; NI: non identificato.

In questo studio sono stati isolati diversi generi di funghi, la maggior parte dei quali vengono tipicamente considerati saprofiti e, occasionalmente, possono divenire patogeni, secondariamente a traumi, chirurgia o patologie che determinano un calo delle resistenze delle difese dell'occhio. Alcuni tra i miceti isolati da Samuelson *et al.* (1984) sono ritenuti responsabili della cheratomicosi nell'uomo, come nel caso di *Fusarium solani*, *Candida albicans*, *Aspergillus* spp. e *Curvularia* spp. Una così elevata prevalenza nell'isolamento di funghi dal sacco congiuntivale di cavalli e bovini, comparata a quella del cane e del gatto, può essere spiegata sia dal diverso ambiente in cui le specie animali vivono, sia per le caratteristiche anatomiche dell'occhio, poiché cavallo e bovino presentano una maggiore superficie di esposizione dell'occhio all'ambiente esterno rispetto ai piccoli animali.

I miceti, lieviti e muffe, isolati nei soggetti con cheratomicosi sono le stesse che si riscontrano nel fornice congiuntivale dei soggetti sani.

Insorgenza

In Italia l'insorgenza della patologia risulta nell'85% dei casi più frequente tra maggio e settembre (Stoppini *et al.*, 2003).

Sembra che fattori ambientali, come la temperatura e l'umidità giochino un ruolo determinante nella comparsa di questo disordine: è stato dimostrato, infatti, che la normale flora microbica congiuntivale tende a diminuire nel periodo invernale (Samuelson *et al.*, 1984; Whiteley e Moore, 1984; Rosa *et al.*, 2003; Stoppini *et al.*, 2003).

Questi dati sono in contrapposizione con quanto riportato da Andrew *et al.* (2003), in quanto gli Autori dimostrano che in Florida la stagione non sembra avere un ruolo determinante nella presenza di miceti e batteri a livello del fornice congiuntivale.

Patogenesi

La maggior parte dei miceti isolati da lesioni oculari di pazienti affetti da cheratomicosi sono saprofiti (Whitley *et al.*, 1983; Samuelson *et al.*, 1984; Pisani, 1993; Barbasso *et al.*, 2002; Andrew *et al.*, 2003; Rosa *et al.*, 2003; Stoppini *et al.*, 2003). Alterazioni dell'epitelio corneale consentono a batteri e funghi, normalmente presenti sulla superficie oculare, di aderire alla cornea e di dare inizio quindi all'infezione. I neutrofili presenti nel film lacrimale, i cheratinociti e molti batteri e funghi rilasciano numerosi enzimi proteolitici responsabili di una rapida distruzione del tessuto corneale. Molti miceti sono capaci di produrre composti anti-angiogenetici che inibiscono la vascolarizzazione della cornea, rallentando quindi la risposta dell'organismo all'infezione. I funghi sembrano, inoltre, avere una particolare affinità per la membrana di Descemet, approfondendosi con le ife fino agli strati più profondi della cornea, causando frequentemente descemetocele o perforazioni della cornea. Si ritiene altresì che alcuni miceti, come *Aspergillus* spp e *Fusarium* spp possano creare primariamente microlesioni erosive dell'epitelio corneale, a seguito di un'alterazione dello strato più interno del film lacrimale consentendo quindi a microrganismi potenzialmente patogeni di aderire alla cornea e dare inizio al processo infettivo (Brooks *et al.*, 2000).

In uno studio condotto Elligott *et al.* (2006) che descrive un caso di cheratomicosi in un bovino di razza Holstein, vengono proposti due meccanismi per l'insorgenza: il fungo può colpire, colonizzare e distruggere l'integrità anatomica degli occhi, in

alternativa, ci può essere una colonizzazione per via ematogena del fungo dall'organismo verso gli occhi.

Nel cavallo una soluzione di continuo dell'epitelio corneale o il trattamento con corticosteroidi ad uso topico e una conseguente inibizione dell'immunità cellulo-mediata sono requisiti necessari per l'insorgenza della cheratomicosi perchè la patogenesi prevede l'inoculazione diretta dei miceti nella cornea (Elligott *et al.*, 2006).

Sintomatologia (Elligott *et al.*, 2006).

La cheratomicosi nel bovino, è una patologia rara. La sintomatologia è caratterizzata da: blefarospasmo, blefaroedema, fotofobia, enoftalmia, essudato muco-purulento.

Alla visita oftalmologica è possibile rilevare edema corneale da moderato a diffuso e infiltrati corneali anche associati a deposito di fibrina nella camera anteriore dell'occhio. E' possibile evidenziare anche neoangiogenesi dello stroma corneale.

La citologia può evidenziare ife fungine, cellule epiteliali e cellule infiammatorie, soprattutto neutrofili.

L'esame isto-patologico può evidenziare necrosi dello stroma corneale e ife fungine.

Diagnosi

La diagnosi clinica si ottiene con una visita oftalmologica completa, dall'esame citologico e/o istopatologico, mentre la diagnosi eziologica risulterà dalla coltura di tamponi raccolti dal fornice congiuntivale ed eventualmente dalla PCR (Elligott *et al.*, 2006).

Diagnosi differenziale

La cheratomicosi non è una patologia molto comune nel bovino, comunque ai fini diagnostici, si rende necessaria la differenziazione di questa da altre forme cliniche quali le cheratiti e le cheratocongiuntiviti ad altra eziologia (virali, batteriche, traumatiche, etc.).

Terapia

Deve essere iniziata al più presto, in quanto dalla tempestività del controllo dell'infezione dipende il decorso della malattia che può esitare in perdita funzionale e strutturale dell'occhio.

L'approccio clinico può essere solo medico o medico-chirurgico. La scelta del tipo d'intervento può avvenire, come suggerito anche da Stoppini *et al.* (2003), sulla base di diversi fattori, quali il tipo di lesione, il grado di uveite secondaria se presente, la risposta ad una fase iniziale di sola terapia medica (nei casi in cui non è richiesta una terapia chirurgica d'urgenza), l'indole del soggetto, la possibilità di effettuare frequenti terapie topiche ed infine la disponibilità economica del proprietario.

Nello studio di Elligott *et al.* (2006) la cheratomicosi è stata trattata mediante un principio fungicida (dapprima natamicina, quindi miconazolo) ed atropina ad uso topico, ed una terapia generale con FANS. La terapia è stata interrotta dopo circa 1 mese ed il follow-up ad un anno mostra esclusivamente una piccola area di fibrosi corneale.

Prognosi

La casistica relativa alle cheratomicosi del bovino è scarsa. Elligott *et al.*, (2006) emettono una prognosi favorevole per quanto riguarda soprattutto la capacità visiva.

Diversamente dal bovino, nel cavallo la cheratomicosi è considerata una patologia ad alto rischio per il mantenimento della funzione visiva, come riportato in bibliografia (Beech *et al.*, 1983; Kern *et al.*, 1983; Barton, 1992; Andrew *et al.*, 1998; Gaarde *et al.*, 1998; Brooks, 1999; Ball, 2000).

La prognosi, solitamente, è condizionata dalla tempestività d'intervento e dalla scelta del trattamento da effettuare. L'uso improprio di terapie topiche, soprattutto cortisoniche, e una diagnosi ritardata risultano essere quindi i fattori di maggiore importanza per l'emissione della prognosi. Secondo quanto riportato da Gaarder *et al.*, (1998), in cavalli affetti da cheratomicosi, la prognosi risulta favorevole nel 64% dei casi, nell'11% dei casi il paziente ha perso la funzione visiva, mentre nel restante 25% dei casi si è resa necessaria l'enucleazione del globo oculare. In questo studio si afferma che la prognosi favorevole è legata essenzialmente ad un adeguato e tempestivo trattamento

Sempre nel cavallo, in uno studio condotto da Stoppini *et al.*, (2003), la prognosi è risultata favorevole nel 76,9% dei casi (85,7% dei casi gestiti solo con una terapia medica e 66,7% dei casi sottoposti ad intervento chirurgico). Nei casi con perdita della funzione visiva la prognosi risultava comunque già riservata e/o infausta in sede del primo esame clinico. In questo studio, comunque, in nessun caso si è resa

necessaria l'enucleazione del globo oculare. Nel 66,6% dei casi con esito negativo per il mantenimento della visione, l'anamnesi riportava sia una precedente somministrazione di corticosteroidi ad uso topico, sia un lungo intervallo di tempo trascorso dall'inizio della sintomatologia all'esame clinico oftalmologico e quindi anche alla terapia. Quindi, anche in questo studio si afferma che la prognosi è legata ad una diagnosi e terapia precoci.

Secondo Andrew *et al.*, (1998), il ripristino della funzione visiva è risultato favorevole nel 92,3% dei casi trattati. Nel 100% dei casi in cui è stata eseguita tempestivamente una terapia medica, la ripresa funzionale è stata completa, mentre ciò è avvenuto solo nel 89% dei casi in cui è stata necessaria eseguire una terapia medico-chirurgico. La prognosi per il mantenimento del globo oculare è risultata favorevole nel 94,9% dei casi, mentre nei restanti si è resa necessaria eseguire l'enucleazione. Anche in questo studio si è reso evidente, quindi, come una terapia aggressiva e tempestiva sia determinante per il mantenimento della funzione visiva.

Presumibilmente anche per le cheratomicosi del bovino, così come per quelle del cavallo, si può affermare che la prognosi favorevole è legata ad una diagnosi precoce ed una terapia aggressiva e tempestiva.

SPECIE FUNGINE COINVOLTE NELL'EZIOLOGIA DELLA CHERATOMICOSI

MUFFE

(Known-Chung, 1992; Andreoni et al., 2003; Bendinelli *et al.*, 2005).

Le muffe presentano come elemento fondamentale della crescita l'*ifa*, una struttura ramificata tubulare di 2-10 micron. Con lo sviluppo della colonia, le ife formano una massa di filamenti intrecciati, detta *micelio*. Le ife che penetrano nel substrato per assorbire le sostanze nutritive vanno a costituire il *micelio vegetativo*, mentre quelle proiettate sopra la superficie del terreno, a contatto quindi con l'aria, costituiscono il *micelio aereo*. Quest'ultimo, nel momento in cui comincia a formare le spore, prende il nome di *micelio riproduttivo*.

Le muffe più comunemente isolate dal fornice congiuntivale sono:

Aspergillus spp: fungo saprofito, filamentoso, cosmopolita ed ubiquitario; viene frequentemente isolato in natura, sia nel terreno che in ambienti domestici. Il genere *Aspergillus* include, secondo quanto pubblicato da Raper and Fennel nel 1965, 132 specie e 18 varietà diverse. I miceti del genere *Aspergillus* sono responsabili di un gruppo di malattie note come aspergillosi che possono colpire gli animali e l'uomo. L'invasione tissutale deve però sempre essere considerata come accidentale al ciclo vitale di *Aspergillus*, normalmente saprofitico di natura. Le specie del genere *Aspergillus* vengono classificate in base alle caratteristiche macroscopiche delle colonie ed a quelle della struttura microscopica. Le colonie sono solitamente a rapida crescita, si presentano a tessitura polverosa, granulare, fioccosa, con pigmentazione variabile dal bianco, al giallo, al giallo-bruno, a varie tonalità del verde, al rosso-bruno.

1. *Aspergillus candidus*: micete largamente distribuito in natura, viene isolato dal terreno e dai depositi di cereali, sementi e farina. A 25 °C si osserva lo sviluppo di colonie di 1-1,5 cm di diametro in 6-7 gg. Le colonie sono bianche, tendenti al crema, spesso molto umide;
2. *Aspergillus flavus*: su Czapek Dox agar, incubate a 25 °C, le colonie raggiungono 3-5 cm di diametro in 6-7 giorni. Esse si presentano piatte, a margini netti, con una tessitura granulare, spesso con solchi radiali, inizialmente gialle, tendono col tempo al giallo-verde;

3. *Aspergillus fumigatus*: micete a distribuzione ubiquitaria. Su Czapek Dox agar, incubato a 25 °C, le colonie raggiungono 3-5 cm di diametro in 6-7 giorni. Le colonie mature si presentano a margini netti, di colore verde, verde-blu, o blu-verde-grigio, anche se possono essere riscontrate delle varianti cromatiche. Il verso della colonia è incolore o di color crema e ai margini della colonia è generalmente presente una bordatura bianca. Specie termofila in grado anche di crescere anche a bassa tensione di ossigeno;
4. *Aspergillus glaucus*: su Czapek Dox agar, incubato a 25 °C, si osserva lo sviluppo di colonie di 5-6 cm in 6-7 giorni. Esse sono piatte, o più o meno increspate, di colore verde scuro, con aree gialle o rossastre. Il verso della colonia è incolore o giallo pallido e la crescita, stentata a 37 °C, viene stimolata da alte concentrazioni di zucchero;
5. *Aspergillus nidulans*: su Czapek Dox agar ,incubato a 25 °C, le colonie risultano verde chiaro con cleistoteci rosso-bruni. Le colonie sono verdi o verde scuro se la componente conidiale è prevalente, al contrario sono verde-bruno, se prevale la componente cleistotecica. Il verso della colonia tende al verde oliva, al grigio od al bruno-viola.
6. *Aspergillus niger*: micete a distribuzione ubiquitaria, più frequentemente isolato in regioni calde.. Su Czapek Dox agar, incubate a 25 °C, le colonie raggiungono 4-5 cm di diametro in 7 giorni. Inizialmente sono costituite da uno strato compatto bianco-giallo, si ricoprono in pochi giorni di uno strato di teste conidiali bruno-nere che conferiscono il tipico aspetto “nero” della colonia. La temperatura ottimale di crescita è compresa tra 18 e 42 °C;
7. *Aspergillus terreus*: su Czapek Dox agar, incubate a 25 °C, si sviluppano colonie di 3,5-5 cm in 6-7 giorni. Esse sono piane o segnate da solchi radiali a tessitura vellutata o, in alcuni casi, fioccosa; il colore varia da marrone chiaro al color sabbia o cannella. Il verso della colonia tende dal giallo pallido al bruno sporco: la presenza di una fitta presenza di teste conidali conferisce la tessitura caratteristica ed il tipico colore delle colonie;
8. *Aspergillus versicolor*: in natura è spesso presente in substrati esposti ad ambienti umidi o sottoposti a lenta decomposizione. Su Czapek Dox agar, incubate a 25 °C, le colonie si sviluppano con un diametro di 1-1,5 cm in 6-7 giorni, risultano generalmente piatte o con centro sollevato, a tessitura granulare, fioccosa o vellutata. La colonia, generalmente costituita da un denso strato di conidio fori,

risulta sul *recto* di colore variabile da bianco a giallo, da arancione a giallo fino a giallo-verde ed a verde scuro. Il *verso* della colonia è incolore, con tendenza a sfumature color crema pallido o rossiccio. Talvolta si apprezza la presenza di gocce di essudato, da biancastro a rosso scuro.

Penicillium spp.: sono saprofiti ed alcune specie sono state indicate come responsabili di forme cliniche. Tra le manifestazioni cliniche vengono segnalate cheratiti, otomicosi, endocarditi. Le colonie, a rapida crescita (3-4 giorni) sono a tessitura cotonosa o polverosa, con presenza frequente di solchi radiali. Inizialmente bianche, esse sviluppano rapidamente sfumature verdi o verdi-blu. Il verso della colonia, generalmente bianco, può essere, in alcune specie, rosso.

Acremonium spp.: il genere *Acremonium* comprende circa 100 specie. Saprofiti ambientali, sono normalmente presenti nel suolo. Hanno distribuzione ubiquitaria, sebbene alcune specie prediligano le regioni a clima caldo. Considerati comuni saprofiti, possono comportarsi come patogeni opportunisti nei confronti di numerose specie animali. Tra le manifestazioni cliniche si annoverano artriti, cheratiti ed infezioni sottocutanee.

La crescita delle colonie è piuttosto lenta (meno di 3 cm in 10 giorni): in un primo momento umido, compatto, di aspetto lieviti forme, diventano successivamente cotonose, fiocose, vellutate, in alcune case feltrose o fasciculate, con il centro piatto o leggermente rialzato. Generalmente bianche, le colonie possono essere in alcuni casi bianche-grigie, rosate, giallastre o aranciate. Il verso, generalmente incolore, può assumere sfumature gialle-pallido, rosate o violacee.

Fusarium spp.: presentano una distribuzione ubiquitaria. Considerati generalmente contaminanti, sono tuttavia implicati occasionalmente anche in casi di infezione o di tossicosi nell'uomo e negli animali. Le infezioni più frequenti sono quelle che interessano l'occhio (cheratiti, ulcere corneali), la cute e le unghie. Le colonie si contraddistinguono per la crescita rapida (4-5 giorni): presentano micelio aereo cotonoso, bianco-crema, talora con sfumature rosate, rosso porpora o color lavanda. Alcune specie rimangono bianche o brune, ed altre lisce ed umide; il verso della colonia appare più chiaro nel colore, o con lo stesso colore del recto.

***Cladosporium* spp.:** i miceti appartenenti a questo genere presentano una distribuzione ubiquitaria e sono tra i funghi più comuni trasportati dall'aria. Sono state descritte circa 500 specie. Le colonie presentano crescita moderatamente rapida (6-8 giorni a 25 °C). La tessitura può variare dal vellutato al fioccoso, divenendo francamente polverosa per l'abbondante produzione di conidi. Le colonie tendono a presentare piede, solchi e gibbosità col tempo; il colore varia dal bruno-oliva al bruno nero; il verso della colonia si presenta, scuro, bruno-nerastro.

***Alternaria* spp.:** i miceti del genere *Alternaria* presentano distribuzione ubiquitaria. Considerati generalmente contaminanti ambientali, possono causare, in alcuni casi, cheratiti micotiche e feoifomicosi. Le colonie a crescita rapida (4-5 giorni), sono lanuginose, cotonose, vellutate, a tessitura grezza. Inizialmente di colore bianco-grigio, diventano successivamente grigio-verdastre, verde oliva o brunastre, con corona periferica più chiara. In alcuni casi la colonia si ricopre di un micelio aereo corto di colore grigiastro; il verso della colonia tende dal bruno al nerastro. La temperatura ottimale di crescita è di 25-28 °C.

***Mucoraceae* spp.:** fanno parte di questa famiglia diverse specie di funghi filamentosi, responsabili di un gruppo d'infezioni note come "zigomicosi". Questa include infezioni muco-cutanee e rino-cerebrali.

La mucormicosi causata da *Rhizopus* spp., *Mucor* spp., *Rhizomucor* spp. e *Absidia* spp. spesso è secondaria ad altre patologie o si sviluppa in soggetti immunodepressi. I membri appartenenti all'ordine *Mucorales* crescono rapidamente sui comuni terreni usati in micologia. La temperatura ottimale di crescita varia da 25 a 30 °C.

1. *Mucor* spp.: distribuzione ubiquitaria; considerati patogeni opportunisti, vengono associati ad una grande varietà di condizioni immunodepressive. Le colonie, a rapida crescita, sono di colore bianco, bianco-giallo o bianco-grigio, tendenti al grigio scuro con lo sviluppo degli sporangi;
2. *Rhizopus* spp.: miceti a distribuzione ubiquitaria; alcune specie vengono utilizzate per la fermentazione di cibi o di bevande alcoliche. Sono caratterizzati da colonie a rapida crescita, di colore bianco puntinato di nero, tendenti a diventare grigie o giallo marroni e a ricoprire l'intera superficie dell'agar. La tessitura risulta grezza, cotonosa o fioccosa. Alcune specie sono termofili;

3. *Absidia* spp.: i miceti di questa famiglia sono caratterizzati da colonie a rapida crescita (4-5 giorni), lanuginose, fiocose, di colore bianco tendenti al grigio oliva o al grigio-bruno. Il verso delle colonie è di colore bianco.

LIEVITI

(Andreoni *et al.*, 2003)

I lieviti hanno una distribuzione ubiquitaria, essendo presenti nelle acque, nel terreno, dove concorrono a vari cicli biologici, sui vegetali e sulla frutta. I lieviti sono tra i funghi più comunemente isolati da campioni clinici, rappresentando, nella maggior parte dei casi la fase di commensalismo o comunque di colonizzazione del micete. Le infezioni da lieviti rappresentano di norma una patologia di tipo opportunistico, quale conseguenza di un alterato rapporto ospite-micete, sia quest'ultimo di origine esogena che endogena. I lieviti sono organismi eucarioti, monocellulare con tallo globoso, ovoidale, o sferico, talvolta allungato o irregolare, i cui blastoconidi si riproducono generalmente mediante un processo di gemmazione; in alcuni casi per frammentazione del tallo, possono essere prodotti artroconidi. I lieviti, una volta isolati in coltura possono essere identificati in base alle loro proprietà morfologiche, macroscopiche e microscopiche oppure in base alle loro proprietà biochimico-colturali. Sul piano macroscopico, ad eccezione di alcune specie, la maggior parte dei lieviti cresce bene sui normali terreni di coltura, nell'arco di 48-72 ore. Le colonie sono generalmente di colore variabile dal bianco-crema al bianco-avorio, fino al bianco giallastro; possono presentarsi strutturalmente regolari o irregolari, a margini netti o frangiati. A seconda della specie la tessitura può essere liscia, lucida od opaca, raggrinzita, rugosa, di consistenza pastosa, cremosa od asciutta. In alcuni casi le colonie possono essere pigmentate o di aspetto mucoide, se capsulate.

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto in 3 allevamenti a diversa conduzione, situati nella provincia di Pisa.

ALLEVAMENTO 1

Allevamento situato nel comune di Cascina (PI) composto da circa 35 capi. Si tratta di un allevamento a stabulazione fissa, incentrato sulla produzione di latte prodotto da bovine di razza Frisona, Jersey e incroci Frisona-Blue Belgue.

La stalla è costituita da un edificio in cemento di 325 metri quadrati chiuso su tutti i lati, al cui interno troviamo la stanza raccolta latte e il locale della stalla. Quest'ultima presenta nella parte centrale la corsia di foraggiamento ai cui lati sono disposte le zone di sosta. Questa è composta su un lato da boxs ospitanti: 1) vitelle, 2) soggetti da rimonta, 3) soggetti in accrescimento, 4) manze vuote e gravide e 5) vacche in asciutta; dall'altro lato abbiamo poste fisse dove sono alloggiate 20 vacche in lattazione.

Le bovine vengono munte 2 volte al giorno tramite mungitrice ad aria compressa con doppio blocco di mungitura. Il latte viene poi portato nella stanza per la raccolta del latte. Questa si trova all'ingresso della stalla, è un locale con pareti lavabili, finestra fornita di zanzariera, lavandino con acqua calda, cisterna frigorifero in acciaio inox per la raccolta del latte e motore per l'impianto di mungitura.

La lettiera delle bovine in lattazione è costituita da paglia, prodotta in azienda, rimossa quotidianamente; i box, invece, hanno lettiera permanente che viene rimossa mensilmente. Le deiezioni sono collocate all'esterno in una concimaia in cemento con serbatoio raccolta liquami sottostante posta a circa 10 metri dalla stalla. Tali deiezioni, previa maturazione, vengono distribuite sui terreni dell'azienda come concime.

L'alimentazione è somministrata due volte al giorno ed è costituita da fieno di medica e graminacee prodotti in azienda, concentrato di mais stoccato in silos e mangime acquistato presso mangimifici.

Il ricambio dell'aria della stalla è garantito da aperture laterali e da fenestrate localizzate sul tetto.

ALLEVAMENTO 2

Allevamento situato a San Piero a Grado (PI), stalla del centro CIRAA (centro interdipartimentale ricerca agro-alimentare) "E. Avanzi" dell'università di Pisa.

Si tratta di un allevamento a stabulazione semi-brada, incentrato sulla produzione di latte prodotto da vacche di razza Frisona e sulla produzione di carne prodotta da bovini di razza Mucco Pisano. In particolar modo l'allevamento conta circa 170 capi di razza Frisona (80 in lattazione e 70 per la rimonta) e 110 capi di Mucco Pisano (tra vacche e vitelli nelle diverse fasi di crescita).

La stalla si compone di un locale in muratura con 10 boxs individuali di circa 3 metri quadri per i vitelli neonati di razza Frisona che vi rimangono per il primo mese di vita, 6 box di circa 10 metri quadri l'uno in cui vengono allevate le manzette fino a 6-8 mesi di età. Oltre ai suddetti box vi è un box di 25 metri quadrati per la messa in asciutta delle bovine e 10 poste fisse per le vacche che sono in procinto di partorire.

Nella stessa area è situata la sala di mungitura con trincea per il mungitore e 4 poste individuali in linea (a tandem). La mungitura avviene in maniera meccanica due volte al giorno e il latte prelevato viene convogliato, tramite tubature, alla stanza di raccolta del latte dove viene raccolto all'interno di due cisterne della capacità di circa 25 q.li.

Adiacente alla stalla descritta precedentemente vi è una seconda stalla in muratura con lettiera permanente ai cui lati sono situati dei paddocks per le bovine in lattazione. All'esterno del secondo paddock c'è la corsia di alimentazione delimitata da sistemi auto-catturanti provvisti di tettoia. Dalla parte opposta alla corsia di alimentazione abbiamo la terza stalla divisa in tre settori dove sono alloggiate manze vuote, manze gravide e vacche in asciutta, e vitelloni di Mucco Pisano all'ingrasso. Questi animali hanno la possibilità di uscire all'esterno nei paddocks adiacenti. In prossimità di queste due ultime stalle è collocata una concimaia a cielo aperto in muratura con serbatoio laterale per la raccolta dei liquami che, dopo maturazione, vengono utilizzati come fertilizzante per i 625 ettari adibiti all'agricoltura aziendale.

Leggermente distanziata dal blocco centrale, è presente una stalla in legno in un vasto territorio recintato dove vengono allevati i bovini di razza Mucco Pisana.

L'alimentazione di questi animali (Frisona e Mucco pisano) avviene tramite *unifeed* preparato e distribuito tramite il carro miscelatore; l'*unifeed* è composto da insilato di

graminacee e mais, fieno di graminacee e di erba medica e concentrati acquistati presso un mangimificio.

Il ricambio dell'aria avviene, all'interno della stalla, tramite finestre e porte mentre nella corsia di alimentazione, in estate, da ventilatori automatici.

ALLEVAMENTO 3

Allevamento della tenuta di San Rossore (PI). L'allevamento è allo stato brado e si incentra sulla produzione di vitelli da carne di razza Limousine, Chianina e Mucco Pisano. Le mandrie si pascolano su un territorio di circa 500 ettari di pianura divisi in recinti di rete con possibilità di rotazione dei diversi gruppi di animali, al cui interno, in alcuni recinti, vi è la possibilità di ripararsi sotto piante arboree.

Oltre ai pascoli l'azienda è costituita da fienile in muratura e da una struttura in cemento che comprende diversi box per la fase di ingrasso dei vitelli, una stalla dove vengono ricoverati gli animali malati e i tori isolati dal gruppo delle femmine. L'alimentazione si basa sul pascolo che, in alcuni momenti dell'anno, è integrata da fieno di vario tipo in base alle disponibilità stagionali.

ANIMALI

In ciascun allevamento sono stati scelti 20 capi, mantenuti tali per tutto il periodo del campionamento.

Allevamento 1: razza Frisona, femmine e di età compresa tra 1 e 10 anni.

Allevamento 2: razza Frisona, femmine e di età compresa tra 3 e 10 anni.

Allevamento 3: Razza Limousine, femmine e di età compresa tra 1 e 3 anni.

Tutti i soggetti sono stati sottoposti a visita oftalmologica prima di ogni campionamento per la verifica di eventuali patologie congiuntivali e/o corneali e sono stati considerati sani.

ARIA

I punti di raccolta dei campioni di aria sono rimaste invariate per ogni allevamento durante il corso del periodo di raccolta. In particolare l'aria è stata raccolta, rispettivamente:

Allevamento 1: a) tutta corsia: campionamento eseguito percorrendo tutta la corsia di foraggiamento); b) deiezioni: campionamento eseguito nei pressi della concimaia; c) mezza corsia deiezioni: campionamento eseguito percorrendo metà corsia di foraggiamento verso il lato della concimaia; d) mezza corsia lato latteria: campionamento eseguito percorrendo metà corsia di foraggiamento verso il lato vicino alla stanza della raccolta latte, opposta quindi al punto c; e) davanti latteria: campionamento eseguito nei pressi della stanza raccolta latte.

Allevamento 2: a) tutta corsia: campionamento eseguito percorrendo tutta la corsia di foraggiamento; b) deiezioni: campionamento eseguito in prossimità della concimaia; c) mezza corsia lato strada: campionamento eseguito percorrendo metà corsia di foraggiamento che si trova in prossimità della strada; d) mezza corsia lato deiezioni: campionamento eseguito percorrendo metà corsia di foraggiamento verso il lato della concimaia; e) lato strada: campionamento eseguito nei pressi della strada.

Allevamento 3: per problemi logistici il campionamento dell'aria in questo allevamento non si è potuto eseguire nelle zone adibite a pascolo per cui tale rilevamento si è limitato alle zone di accesso per i non addetti e precisamente: a) corsia vitelli: campionamento eseguito in prossimità della zona adibita ai vitelli all'ingrasso; b) lato cavalli: campionamento eseguito in prossimità dei recinti dei cavalli e dei vitelli all'ingrasso; c) zona travaglio: campionamento eseguito in

prossimità del travaglio presso il quale, durante i prelievi dei tamponi oculari, sostavano i bovini.

ALIMENTO

I punti di raccolta dei campioni di alimento sono rimasti invariati per ogni allevamento durante il corso del periodo di raccolta. In particolare l'alimento è stato raccolto, rispettivamente:

Allevamento 1: raccolti fieno e mangime. Il fieno è stato prelevato dai rotoloni posti all'interno della stalla; il campione è stato prelevato da più punti del rotolone in modo da ottenere circa 100 grammi di prodotto. Il pellettato è stato prelevato da un unico sacco in modo da ottenere circa 100 gr di prodotto.

Allevamento 2: in punti diversi della corsia di foraggiamento sono stati prelevati, con guanti sterili, 10 campioni di alimento *unifeed*, per un totale di circa 100 grammi.

Allevamento 3: il fieno è stato raccolto da più rotoloni che sono localizzati nel fienile per un totale complessivo di 100 grammi di prodotto. L'erba invece è stata raccolta, dal capo stalla, in punti diversi all'interno dei pascoli.

Il campionamento sugli animali, nonché quello dell'aria e dell'alimento sono stati effettuati ad ogni stagione per gli anni 2006-2008, e precisamente:

- **prelievo 1:** stagione autunnale, novembre 2006;
- **prelievo 2:** stagione invernale, febbraio 2007;
- **prelievo 3:** stagione primaverile, maggio 2007;
- **prelievo 4:** stagione estiva, agosto 2007;
- **prelievo 5:** stagione autunnale, novembre 2007;
- **prelievo 6:** stagione invernale, febbraio 2008;
- **prelievo 7:** stagione primaverile, maggio 2008;
- **prelievo 8:** stagione estiva, agosto 2008.

PREPARAZIONE DEI TAMPONI

I prelievi dal fornice congiuntivale sono stati effettuati utilizzando tamponi di cotone sterili. Come terreno di trasposto è stata utilizzata 0,3 ml di soluzione salina e 50 µl di gentamicina al fine di evitare la sovra crescita batterica. I tamponi sono stati conservati 4 °C fino al loro utilizzo, comunque non oltre le 24 ore.

PREPARAZIONE DELLE PIASTRE

Le piastre a contatto venivano preparate utilizzando 16 ml di terreno di coltura Agar Malto e conservate alla temperatura di 4 °C fino al loro utilizzo, comunque non oltre le 24 ore.

RACCOLTA TAMPONE OCULARE

I tamponi sono stati raccolti da entrambi gli occhi. Il campione è stato prelevato dal fornice congiuntivale inferiore, mediante retropulsione del globo oculare avendo cura di non toccare palpebre e ciglia al fine di non contaminare il tampone stesso. I campioni sono stati trasportati a 4 °C e sono arrivati entro 4 ore dal prelievo al laboratorio di micologia del Dipartimento di Patologia animale.

RACCOLTA CAMPIONE ARIA

La raccolta dell'aria è stata eseguita utilizzando il SAS[®], SUPER 100 (Pbi, Milano, Italia), che serve per campionare l'aria e le superfici per la quantificazione del bioaerosol. All'interno del SAS sono state inserite le piastre a contatto, quindi sono stati aspirati 500 L di aria. Dopo essere state rimosse dal SAS, le piastre sono state chiuse con l'apposito tappo e sono state trasportate a 4 °C entro 4 ore dal prelievo al laboratorio di micologia del Dipartimento di Patologia animale.

RACCOLTA ALIMENTO

L'alimento è stato raccolto in sacchetti di PVC sterili e trasportati entro 4 ore dal prelievo al laboratorio di micologia del Dipartimento di Patologia animale.

MONITORAGGIO TEMPERATURA E UMIDITA' AMBIENTALI

L'umidità dell'aria e temperatura atmosferica sono state monitorate ad ogni prelievo effettuato mediante un rilevatore di umidità e temperatura con termometro ed igrometro ambientali.

Gli esami colturali sono stati eseguiti presso il Laboratorio di Micologia del Dipartimento di Patologia animale dell'Università di Pisa.

SEMINA TAMPONI OCULARI

I campioni prelevati dal fornice congiuntivale sono stati seminati su piastre di Petri contenenti Agar Malto ed incubate a 25 °C per circa 3-4 settimane.

SEMINA ALIMENTO

L'alimento è stato tagliato in piccoli pezzi, quindi 1 gr di alimento per ciascun campione è stato messo in una busta con 10 ml di soluzione fisiologica, quindi il contenuto delle buste è stato omogeneizzato (Stomacher[®], Pbi, Milano, Italia). Da ogni busta è stato prelevato 1 ml di soluzione a cui sono stati aggiunti 9 ml di soluzione fisiologica, quindi da questa seconda soluzione è stato prelevato nuovamente 1 ml di campione a cui sono stati aggiunti 9 ml di soluzione fisiologica e così via per sei passaggi totali, fino ad ottenere le seguenti diluizioni:

- provetta 1: diluizione scalare 10:1;
- provetta 2: diluizione scalare 10:2;
- provetta 3: diluizione scalare 10:3;
- provetta 4: diluizione scalare 10:4;
- provetta 5: diluizione scalare 10:5;
- provetta 6: diluizione scalare 10:6.

1 ml di ogni campione, diluito come sopra descritto, è stato seminato su una piastra di Petri con terreno Rosa Bengala. Ogni piastra è stata etichettata riportando il tipo di alimento e la concentrazione del campione seminato. Le piastre sono state mosse per uniformare la soluzione sul terreno, quindi sono state inclinate in maniera da raccogliere il liquido in eccesso nella parte declive della piastra stessa. Il liquido in eccesso è stato rimosso mediante una pipetta.

Le piastre sono state poste ad incubare a 25 °C in termostato per 20 giorni. La prima lettura è stata effettuata al 10° giorno post-incubazione (p.i.), quindi quotidianamente.

PIASTRE ARIA

Le piastre utilizzate per il campionamento dell'aria sono state incubate a 25 °C per 3-4 settimane e sono state controllate quotidianamente a partire dal 4° giorno p.i.

IDENTIFICAZIONE DEI MICETI

Per quanto riguarda l'identificazione dei funghi filamentosi, le colonie presenti sul terreno di coltura sono state sottoposte a prove di riconoscimento, condotte sulla base dei caratteri morfologici macro e microscopici delle colonie stesse.

L'identificazione dei funghi filamentosi è stata condotta a livello di genere; in caso di riscontro di *Aspergillus* si è proceduto con il riconoscimento anche della specie, secondo quanto descritto da Raper and Fennel (1965).

In caso di isolamento di lieviti si è proceduto al riconoscimento della specie di appartenenza. In questo caso la tipizzazione è stata effettuata attraverso prove morfologiche, fisiologiche e biochimiche valutando, in particolar modo, la formazione dei tubi germinativi, la presenza della capsula attraverso l'India Ink Test, e la presenza di attività ureasica. L'identificazione definitiva è stata effettuata sottoponendo le colture in purezza a prove auxonografiche utilizzando le gallerie ID 32 (bioMèrièux, Francia), secondo quanto raccomandato dalla Casa Produttrice.

ANALISI STATISTICA

E' stato applicato il test ANOVA sulle prevalenze ottenute per ciascun micete al fine di verificare eventuali differenze statisticamente significative sia tra le tre tipologie di allevamento durante la stessa stagione, sia nell'ambito dello stesso allevamento durante le diverse stagioni. Se il test ANOVA risultava significativo, veniva applicato il test di Bonferroni per i confronti multipli.

Il test t di Student per dati appaiati è stato applicato per verificare eventuali differenze statisticamente significative nell'ambito dello stesso allevamento tra le stagioni nei due anni di raccolta dei campioni.

Le differenze sono state considerate statisticamente significative per $p < 0,05$.

RISULTATI

I risultati sono riportati nelle tabelle 2-9.

ANNI 2006-2007

Allevamento 1

Occhi

Le prevalenze relative ai miceti isolati nei prelievi 1, 2, 3 e 4 sono rispettivamente (tab. 2): *Penicillium* spp 53,4%; 11,1%; 21,4% e 12,5%; *Cladosporium* spp: 23,1%; 11,1%; 1,4% e 25%; *A. fumigatus*: 11,5%; 0%, 0% e 9,3%; *A. niger*: 3,8%; 0%; 15,7% e 6,2%; *A. flavus*: 3,8%; 8,3%; 7,1% e 3,1%; *A. versicolor*: 0%; 41,6%; 0% e 3,1%; *A. terreus*: 0%; 8,3%; 2,8% e 6,2%; *A. nidulans*: 0%; 2,8%; 0% e 0%; *A. ustus*: 0%; 2,8%; 0% e 0%; *A. cervinus*: 0%; 0%; 21,4% e 0%; *A. ornatus*: 0%; 0%; 10% e 0%; *A. wentii*: 0%; 0%; 4,2% e 0%; *A. glaucus*: 0%; 0%; 0%; 6,2%; *Alternaria* spp: 3,8%, 0%, 2,8% e 9,3%; *Rhizopus* spp: 0%; 8,3%; 1,4% e 3,1%; *Acremonium* spp: 0%; 5,5%; 0% e 9,4%; *Mucoraceae* spp: 0%; 0%; 2,8% e 0%; *Absidia* spp: 0%; 0%; 1,4% e 0%; *Fusarium* spp: 0%; 0%; 1,4% e 0%; *Mucor* spp: 0%; 0%; 0% e 3,1%.

Alimento

I miceti isolati nei prelievi 1, 2, 3 e 4 sono rispettivamente (tab. 6):

Fieno: *Cladosporium* spp; *Mucor* spp; *A. glaucus*; *A. fumigatus* e *Rhizopus* spp;

Mangime: negativo; *A. flavus*; *Absidia* spp, *Fusarium* spp e *A. ornatus*; negativo.

Aria

I miceti isolati nei prelievi 1, 2, 3 e 4 sono rispettivamente (tab. 7):

- a) Tutta corsia: *Cladosporium* spp, *A. niger* e *Mucor* spp; *A. niger*, *A. versicolor*, *Mucor* spp; *A. niger*, *Rhizopus* spp; *A. glaucus*, *A. niger*, *Penicillium* spp
- b) Deiezioni: *A. niger*, *Cladosporium* spp, *Mucor* spp e *Penicillium* spp; *A. flavus*, *A. niger*, *A. versicolor* e *Rhizopus* spp; *Absidia* spp, *A. glaucus*, *A. niger* e *Penicillium* spp; *A. flavus*, *Mucor* spp e *Penicillium* spp.

- c) Mezza corsia lato deiezioni: *A. fumigatus*, *A. niger* e *Cladosporium* spp; *A. niger* e *Mucor* spp; *A. niger* e *Rhizopus* spp; *A. niger*, *A. versicolor* e *Cladosporium* spp.
- d) Mezza corsia lato latteria: *A. niger*, *Cladosporium* spp e *Penicillium* spp; *A. niger* e *Mucor* spp; *A. niger* e *Rhizopus* spp; *Absidia* spp, *A. niger*, *Cladosporium* spp e *Penicillium* spp.
- e) Davanti latteria: *A. niger*, *Cladosporium* spp e *Penicillium* spp; *A. flavus*, *A. versicolor* e *Rhizopus* spp; *A. niger*, *Cladosporium* spp, *Fusarium* spp e *Mucor* spp; *Penicillium* spp.

Allevamento 2

Occhi

Le prevalenze relative ai miceti isolati nei prelievi 1, 2, 3 e 4 sono rispettivamente (tab. 3):

Penicillium spp: 91%; 37,1%; 16,7% e 16,7%; *Cladosporium* spp: 0,0%; 8,6%; 20,0% e 25,0%; *A. fumigatus*: 4,5%; 8,6%; 0,0% e 8,3%; *A. niger*: 0,0%; 5,7%; 0,0% e 4,2%; *A. flavus*: 0,0%; 2,9%; 13,3% e 4,2%; *A. versicolor*: 0,0%; 11,4%; 0,0% e 4,2%; *A. terreus*: 0,0%; 5,7%; 3,3% e 0,0%; *A. nidulans*: 0,0%; 2,9%; 0,0% e 0,0%; *A. ornatus*: 0,0%; 0,0%; 3,3% e 0,0%; *A. glaucus*: 0,0%; 2,9%; 0,0% e 0,0%; *Alternaria* spp: 0,0%; 5,7%; 0,0% e 8,3%; *Rhizopus* spp: 0,0%; 2,9%; 3,3%; e 12,5%; *Acremonium* spp: 0,0%; 5,7%; 3,3% e 0,0%; *Absidia* spp: 0,0%; 0,0%; 0,0% e 4,2%; *Mucor* spp: 0,0%; 0,0%; 0,0% e 12,5%; *T. capitatum*: 0,0%; 0,0%; 3,3% e 0,0%; *Lieviti*: 0,0%; 0,0%; 23,3% e 0,0%;

Alimento

I miceti isolati nei prelievi 1, 2, 3 e 4 sono rispettivamente (tab. 6):

Unifeed: negativo; *Acremonium* spp, *A. flavus*, *Scopulariopsis* spp e *Verticillum* spp; negativo; *Absidia* spp.

Aria

I miceti isolati nei prelievi 1, 2, 3 e 4 sono rispettivamente (tab. 8):

- a) Tutta corsia: *A. flavus*, *A. niger*, *Cladosporium* spp e *Penicillium* spp; *A. fumigatus* e *Penicillium* spp; *A. flavus*, *Fusarium* spp, *Rhizopus* spp e *Penicillium* spp; *A. fumigatus*, *A. glaucus* e *A. niger*.
- b) Deiezioni: *Penicillium* spp e *Rhizopus* spp; *A. niger* e *Penicillium* spp; *A. versicolor*, *Cladosporium* spp, *Penicillium* spp e *Rhizopus* spp; *Acremonium* spp, *A. niger*, *Penicillium* spp e *Rhizopus* spp.
- c) Mezza corsia lato strada: *A. niger*, *Mucor* e *Penicillium* spp; *A. niger* e *Penicillium* spp; *Alternaria* spp, *A. terreus*, *Cladosporium* spp e *Fusarium* spp; *Absidia* spp e *Penicillium* spp.
- d) Mezza corsia lato deiezioni: *Acremonium* spp, *Cladosporium* spp, *Rhizopus* spp e *Scopulariopsis* spp; *A. fumigatus*, *A. niger* e *Penicillium* spp; *Alternaria* spp, *Cladosporium* spp e *Rhizopus* spp; *A. niger*, *Cladosporium* spp e *Penicillium* spp.
- e) Lato strada: *A. niger*, *Cladosporium* spp, *Penicillium* spp e *Rhizopus* spp; *Cladosporium* spp, *Penicillium* spp e *Rhizopus* spp; *A. niger* e *Rhizopus* spp; *Absidia* spp.

Allevamento 3

Occhi

Le prevalenze relative ai miceti isolati nei prelievi 1, 2, 3 e 4 sono rispettivamente (tab. 4):

Penicillium spp: 32,0%; 41,7%; 10,5% e 23,8%; *Cladosporium* spp: 36,0%; 19,4%; 39,4% e 14,3%; *A. niger*: 4,0%; 0,0%; 5,3% e 0,0%; *A. flavus*: 0,0%, 11,1%; 7,9% e 0,0%; *A. versicolor*: 0,0%; 13,9%; 0,0% e 0,0%; *A. terreus*: 0,0%; 0,0%; 5,3%; 0,0%; *A. cervinus*: 0,0%; 0,0%; 7,9% e 0,0%; *A. ornatus*: 0,0%; 0,0%; 2,6% e 0,0%; *Alternaria* spp: 28,0%; 0,0%; 7,9% e 0,0%; *Rhizopus* spp: 0,0%; 0,0%; 0,0% e 14,3%; *Acremonium* spp: 0,0%; 0,0%; 0,0% e 14,3%; *Absidia* spp: 0,0%; 0,0%; 0,0% e 4,8%; *Fusarium* spp: 0,0%; 5,6%; 0,0% e 14,3%; *Mucor* spp: 0,0%; 0,0%; 5,3% e 9,5%; *Scopulariopsis* spp: 0,0%; 2,8%; 0,0% e 0,0%; *Trichoderma* spp: 0,0%; 5,6%; 0,0% e 4,8%; *Lieviti*: 0,0%; 0,0%; 2,6% e 0,0%;

Alimento

I miceti isolati nei prelievi 1, 2, 3 e 4 sono rispettivamente (tab. 6):

Fieno: *Cladosporium* spp e *Penicillium* spp; *Acremonium* spp, *A. flavus* e *A. niger*; *Alternaria* spp, *A. ornatus*, *Cladosporium* spp e *Fusarium* spp; *Scopulariopsis* spp.

Erba: *Penicillium* spp; *Penicillium* spp; *Absidia* spp, *Cladosporium* spp e *Fusarium* spp; *Acremonium* spp, *Alternaria* spp e *Cladosporium* spp.

Aria

I miceti isolati dai prelievi 1, 2, 3 e 4 sono rispettivamente (tab. 9):

- a) Corsia vitelli: *Alternaria* spp, *Cladosporium* spp e *Penicillium* spp; *A. flavus*, *Mucor* spp e *Penicillium* spp; *Absidia* spp, *A. niger* e *Cladosporium* spp; *Penicillium* spp.
- b) Lato cavalli: *Cladosporium* spp e *Hunnicola*; *A. niger*, *A. versicolor* e *Penicillium* spp; *Cladosporium* spp; *Cladosporium* spp.
- c) Zona travaglio: *Cladosporium* spp; *A. niger*, *Penicillium* spp e *Rhizopus* spp; *Absidia* spp, *Alternaria* spp, *A. ornatus* e *Cladosporium* spp; *Absidia* spp e *Penicillium* spp.

ANNO 2007- 2008

Allevamento 1

Occhi

Le prevalenze relative ai miceti isolati dai prelievi 5, 6, 7 e 8 sono rispettivamente (tab. 2):

Penicillium spp: 38,7%; 21,4%; 9,0% e 5,4%; *Cladosporium* spp: 0,0%; 14,2%; 11,3% e 7,8%; *A. fumigatus*: 0,0%; 7,1%; 0,0% e 21,0%; *A. niger*: 3,2%; 0,0%; 31,8% e 31,6%; *A. flavus*: 32,2%; 3,6%; 4,5% e 0,0%; *A. versicolor*: 0,0%; 7,1%; 16,0% e 0,0%; *A. terreus*: 0,0%; 0,0%; 2,2% e 0,0%; *A. cervinus*: 0,0%; 3,6%; 0,0% e 0,0%; *A. glaucus*: 9,6%; 7,1%; 9,0% e 0,0%; *A. candidus*: 0,0%; 3,6%; 0,0% e 0,0%; *Alternaria* spp: 0,0%; 10,7%; 2,2% e 0,0%; *Rhizopus* spp: 0,0%; 3,6%; 0,0% e 7,8%; *Acremonium* spp: 3,2%; 7,1%; 0,0% e 0,0%; *Absidia* spp: 0,0%; 0,0%; 4,5%; 10,5%; *Mucor* spp: 3,2%; 7,1%; 4,5% e 5,2%; *Scopulariopsis* spp: 3,2%; 0,0%; 0,0% e 0,0%; *Trichoderma* spp: 0,0%; 3,6%; 0,0% e 0,0%; *C. catenulata*: 0,0%; 0,0%; 4,5% e 0,0%; *Mortierella* spp: 0,0%; 0,0%; 0,0% e 2,6%; *Actinomucor* spp: 0,0%; 0,0%; 0,0% e 2,6%; *Curvularia* spp: 0,0%; 0,0%; 0,0% e 2,6%; *Rhizomucor* spp: 0,0%; 0,0%; 0,0% e 2,6%.

Alimento

I miceti isolati dai prelievi 5, 6, 7 e 8 sono rispettivamente (tab. 6):

Fieno: *A. flavus* e *A. niger*; *Penicillium* spp; negativo; *A. fumigatus*; Mangime: negativo; negativo; negativo; negativo.

Aria

I miceti isolati dai prelievi 5, 6, 7 e 8 sono rispettivamente (tab. 7):

- a) Tutta corsia: *Rhizopus* spp; *A. niger* e *Cladosporium* spp; *Mucor* spp, *Alternaria* spp e *Rhizopus* spp; *Mucor* spp, *Absidia* spp e *Cladosporium* spp.
- b) Deiezioni: *A. niger* e *Rhizopus* spp; *A. niger*; *A. niger* e *A. fumigatus*; *A. niger*, *Cladosporium* spp e *Absidia* spp.

- c) Mezza corsia lato deiezioni: *A. niger*, *Penicillium* spp e *Cladosporium* spp; *A. niger*, *Alternaria* spp e *Cladosporium* spp; *Mucor* spp; *Absidia* spp, *Alternaria* spp e *Cladosporium* spp.
- d) Mezza corsia lato latteria: *A. niger* e *Cladosporium* spp; *A. niger* e *Mucor* spp; *A. niger*; *Cladosporium* spp e *Absidia* spp.
- e) Davanti latteria: *Mucor* spp e *Penicillium* spp; *Penicillium* spp; *A. fumigatus*, *A. flavus*, *Mucor* spp e *Alternaria* spp; *Absidia* spp e *A. niger*.

Allevamento 2

Occhi

Le prevalenze dei miceti isolati dai prelievi 5, 6, 7 e 8 sono rispettivamente (tab. 3):

Penicillium spp: 40,0%; 14,8%; 8,3% e 12,9%; *Cladosporium* spp: 20,0%; 7,4%; 23,0% e 12,9%; *A. fumigatus*: 26,7%; 7,4%; 8,3% e 16,1%; *A. niger*: 0,0%; 3,7%; 37,5% e 3,2%; *A. flavus*: 0,0%; 3,7%; 2,0% e 6,5%; *A. versicolor*: 0,0%; 3,7%; 0,0% e 0,0%; *A. terreus*: 6,7%; 3,7%; 0,0% e 0,0%; *A. glaucus*: 0,0%; 0,0%; 2,0% e 0,0%; *A. candidus*: 0,0%; 0,0%; 0,0% e 3,2%; *Alternaria* spp: 0,0%; 7,4%; 0,0% e 3,2%; *Rhizopus* spp: 0,0%; 3,7%; 0,0% e 0,0%; *Acremonium* spp: 0,0%; 11,1%; 0,0% e 0,0%; *Absidia* spp: 0,0%; 0,0%; 0,0% e 9,7%; *Fusarium* spp: 0,0%; 3,7%; 0,0% e 0,0%; *Mucor* spp: 6,7%; 7,4%; 0,0% e 3,3%; *Scopulariopsis* spp: 0,0%; 3,7%; 0,0% e 0,0%; *C. catenulata*: 0,0%; 11,1%; 8,3% e 3,2%; *Mortierella* spp: 0,0%; 0,0%; 0,0% e 3,2%; *T. capitatum*: 0,0%; 0,0%; 4,1% e 12,9%; *Lieviti*: 0,0%; 0,0%; 0,0% e 9,7%.

Alimento

I miceti isolati dai prelievi 5, 6, 7 e 8 sono rispettivamente (tab. 6):

Unifeed: negativo; negativo; negativo; negativo.

Aria

I miceti isolati dai prelievi 5, 6, 7 e 8 sono rispettivamente (tab. 8):

- a) Tutta corsia: *Cladosporium* spp e *Penicillium* spp; *A. niger* e *Penicillium* spp; *Alternaria* spp e *A. niger*; *Alternaria* spp e *Mucor* spp.
- b) Deiezioni: *Penicillium* spp; *A. niger* e *Mucor* spp; *A. niger*; *Cladosporium* spp, *Mucor* spp e *Rhizopus* spp.

- c) Mezza corsia lato strada: *Mucor* spp e *Penicillium* spp ; *A. niger* e *Cladosporium* spp; *Alternaria* spp, *A. niger*, *Cladosporium* spp e *Rhizopus* spp; *Alternaria* spp, *A. niger*, *Cladosporium* spp e *Mucor* spp.
- d) Mezza corsia lato deiezioni: *A. niger*, *Cladosporium* spp e *Penicillium* spp; *Cladosporium* spp e *Rhizopus* spp; *Alternaria* spp e *Penicillium* spp; *A. niger*; *Cladosporium* spp, *Mucor* spp e *Rhizopus* spp.
- e) Lato strada: *A. fumigatus*, *Cladosporium* spp e *Penicillium* spp; *Penicillium* spp e *Rhizopus* spp; *A. fumigatus*, *A. glaucus* e *Cladosporium* spp; *Alternaria* spp e *Mucor* spp.

Allevamento 3

Occhi

Le prevalenze dei miceti isolati dai prelievi 5, 6, 7 e 8 sono rispettivamente (tab. 4):
Penicillium spp: 28,6%; 35,7%; 12,9% e 22,8%; *Cladosporium* spp: 20,0%; 21,4%; 54,8% e 28,6%; *A. fumigatus*: 0,0%; 3,6%; 0,0%; 5,7%; *A. niger*: 22,9%; 3,6%; 6,5% e 5,7%; *A. flavus*: 0,0%; 7,1%; 3,2% e 2,8%; *A. terreus*: 0,0%; 3,6%; 3,2% e 2,8%; *A. cervinus*: 0,0%; 3,6%; 0,0% e 5,7%; *A. glaucus*: 0,0%; 3,6%; 0,0% e 0,0%; *Alternaria* spp: 2,9%; 14,3%; 9,7% e 5,7%; *Rhizopus* spp: 2,9%; 0,0%; 3,2%; 0,0%; *Acremonium* spp: 11,4%; 0,0%; 0,0% e 5,7%; *Absidia* spp: 0,0%; 0,0%; 0,0% e 2,8%; *Fusarium* spp: 0,0%; 3,6%; 0,0% e 5,7%; *Mucor* spp: 2,9%; 0,0%; 6,5% e 8,5%; *Scopulariopsis* spp: 2,9%; 0,0%; 0,0% e 0,0%;

Alimento

I miceti isolati dal prelievo 5, 6, 7 e 8 sono rispettivamente (tab. 6):

Fieno : *Cladosporium* spp; *Cladosporium* spp; negativo; *Cladosporium* spp.

Erba: *Penicillium* spp; *Penicillium* spp; negativo; *Cladosporium* spp.

Aria

I miceti isolati dal prelievo 5, 6, 7 e 8 sono rispettivamente (tab. 9):

- a) Corsia vitelli: *Penicillium* spp; *Cladosporium* spp e *Penicillium* spp; *Alternaria* spp e *Rhizopus* spp; *Cladosporium* spp e *Penicillium* spp.
- b) Lato cavalli: *A. niger* e *Cladosporium* spp; *A. niger* e *Cladosporium* spp; *Cladosporium* spp; *A. niger* e *Cladosporium* spp.

- c) Zona travaglio: *A. niger*; *A. niger*; *Alternaria* spp, *Cladosporium* spp e *Mucor* spp; *Absidia* spp, *Mucor* spp e *Penicillium* spp.

Nell'allevamento 1 sono state rilevate 28 specie di miceti, nell'allevamento 2 le specie coltivate sono state 23, e 19 nell'allevamento 3.

Nell'allevamento 1 (tab. 2), *Penicillium* spp è stato isolato in tutti i prelievi, *Cladosporium* spp e *A. flavus* in 7, *A. niger* in 6, *Alternaria* spp, *Rhizopus* spp, *Acremonium* spp e *Mucor* spp in 5, *A. fumigatus*, *A. terreus* e *A. glaucus* in 4 prelievi. Gli altri miceti isolati risultano occasionali (<3 prelievi nel biennio). *A. wentii*, *A. ustus*, *Actinomucor* spp, *Curvularia* spp, e *Rhizomucor* spp sono stati isolati soltanto in questo allevamento ed in 1 solo prelievo.

Nell'allevamento 2 (tab. 3), *Penicillium* spp. è stato isolato in tutti i prelievi, *Cladosporium* spp. e *A. fumigatus* in 7, *A. flavus* in 6, *A. niger* in 5, *A. versicolor*, *A. terreus*, *Alternaria* spp, *Rhizopus* spp e *Mucor* spp in 4 prelievi. Gli altri miceti isolati risultano occasionali (<3 prelievi nel biennio). *C. catenulata* e *T. capitatum* sono state isolate soltanto in questo allevamento rispettivamente in 3 e 2 prelievi, in entrambi i casi consecutivamente.

Nell'allevamento 3 (tab. 4), *Penicillium* spp e *Cladosporium* spp sono stati isolati in tutti i prelievi, *A. niger* e *Alternaria* spp in 6, *A. flavus* e *Mucor* spp in 5, *A. terreus* e *Fusarium* spp in 4 prelievi. Gli altri miceti isolati risultano occasionali (<3 prelievi nel biennio). Tutti i miceti isolati nell'allevamento 3 sono stati isolati anche negli allevamenti 1 e/o 2.

Le prevalenze riscontrate per *Penicillium* spp e *Cladosporium* spp sono equivalenti nei 3 allevamenti e costanti durante l'arco del biennio.

Per quanto riguarda le prevalenze degli Aspergilli sono relativamente basse in tutti e tre gli allevamenti; in particolare, sono costantemente basse nell'arco del biennio nell'allevamento 1, mentre sono relativamente più alte nei mesi di febbraio e maggio rispetto agli altri prelievi negli allevamenti 2 e 3.

Le CFU (tab. 2, 3, 4) risultano basse per tutti i miceti isolati in tutti e 3 gli allevamenti controllati. Occasionalmente (1 solo prelievo nel biennio) le CFU sono risultate >100 solo per *Cladosporium* spp., *C. catenulata* e *T. capitatum*

Nell'allevamento 1, i funghi rilevati per più di 3 isolamenti consecutivi nello stesso soggetto e nello stesso occhio sono stati *Penicillium* spp. Nell'allevamento 2 e 3, i miceti rilevati per 3 o più isolamenti consecutivi nello stesso bovino e nello stesso occhio sono stati *Penicillium* spp e *Cladosporium* spp.

La positività oculare è riportata in tabella 5.

Nell'allevamento 1, la positività oculare del 100% è presente soltanto nei prelievi n.ro 3 e 7, mentre la positività più bassa, pari all'80% dei casi, corrisponde al prelievo n.ro 5. La positività oculare per i prelievi 1, 2, 4, 6 e 8 risultano essere, rispettivamente: 82,5%; 90%; 82,5%; 82,5%; 97,5%.

Nell'allevamento 2, la positività oculare del 100% è presente soltanto nei prelievi n.ro 1 e 7, mentre la positività più bassa, pari al 38,5% dei casi, corrisponde al prelievo n.ro 5. La positività oculare dei prelievi 2, 3, 4, 6 e 8 risultano essere, rispettivamente: 92,5%; 48,5%; 75%; 80%; 80%.

Nell'allevamento 3, non si è mai riscontrata una positività oculare del 100% dei casi, mentre la positività più bassa, pari al 47,5% dei casi, corrisponde al prelievo n.ro 1. La positività oculare dei prelievi 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 risultano essere, rispettivamente 92,5%; 95%; 62,5%; 80%; 72,5%; 95%; 77,5%.

Negli allevamenti 1 e 2, le specie micotiche isolate per ogni occhio sono risultate sempre un massimo di 2 eccetto che nei prelievi n.ro 3 e 7, dove il numero massimo di specie isolate per occhio sono risultate fino ad un massimo di 4.

Nell'allevamento 3, le specie micotiche isolate sono risultate sempre un massimo di 2 eccetto che nei prelievi n.ro 1 e 3, dove il numero massimo sale a 3.

Gli alimenti meno contaminati risultano essere l'*unifeed* ed il pellettato, mentre fieno ed erba sono risultati costantemente contaminati da miceti per tutto l'arco del biennio (tab. 6).

I miceti isolati nell'aria sono gli stessi isolati sia da alimento che da fornice congiuntivale (tab. 7).

ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica non ha evidenziato differenze significative nelle prevalenze riscontrate in stagioni uguali nei due anni di raccolta (*t* di student). L'analisi della varianza (test ANOVA) non ha evidenziato differenze significative sia nel confronto tra i prelievi eseguiti nel biennio nello stesso allevamento, sia nel confronto tra lo stesso prelievo eseguito nei 3 allevamenti.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nella specie equina, i miceti causa di cheratomicosi sono gli stessi isolati anche in soggetti clinicamente sani (Moore *et al.*, 1983; Samuelson *et al.*, 1984; Moore *et al.*, 1988; Barton, 1992; Andrew *et al.*, 1998; Brooks *et al.*, 1998; Brooks *et al.*, 2000; Andrew *et al.*, 2003; Rosa *et al.*, 2003; Stoppini *et al.*, 2003) e nell'ambiente (Nardoni *et al.*, 2005).

I funghi isolati più frequentemente appartengono ai generi *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* e *Cladosporium* (Moore *et al.*, 1983; Andrew *et al.*, 1998; Brooks, 2002; Barbasso *et al.*, 2002; Stoppini *et al.*, 2003).

Le specie fungine isolate sono saprofiti ed occasionalmente possono divenire patogene, secondariamente a traumi corneali che riducono la resistenza del tessuto corneale. L'epitelio corneale, se integro, rappresenta infatti una formidabile barriera contro la colonizzazione e l'invasione di batteri o funghi potenzialmente patogeni, presenti normalmente sulla superficie sia della cornea che della congiuntiva. Un difetto dell'epitelio corneale permette, quindi, ai batteri e ai funghi di aderire alla cornea e di dare inizio all'infezione (Brooks, 2002).

L'ambiente in cui normalmente vive un bovino, è tale che la congiuntiva e la cornea sono costantemente esposte a funghi e batteri. Inoltre le stesse caratteristiche anatomiche dell'occhio del bovino, così come quelle del cavallo, sono fattori predisponenti allo sviluppo di patologie corneali; in queste due specie animali, infatti, l'occhio presenta una maggiore superficie rispetto al cane e al gatto, quindi l'esposizione all'ambiente esterno è maggiore rispetto alle altre specie animali (Samuelson *et al.*, 1984).

In conclusione, visto il numero elevato di miceti presenti nell'ambiente in cui normalmente vivono i bovini, la presenza di una contaminazione e/o colonizzazione del fornice congiuntivale non è un fatto inaspettato.

I nostri risultati concordano con quanto rilevato da Samuelson *et al.* (1984). Gli Autori infatti riportano che la flora micotica congiuntivale nel bovino sano è rappresentata essenzialmente da *Cladosporium* spp e *Penicillium* spp.

La flora micotica del bovino risulta quindi diversa da quella del cavallo e dell'asino, rappresentata da *Aspergillus* spp (Samuelson *et al.*, 1984; Barsotti *et al.* 2006; Nardoni *et al.*, 2007), da quella del cane, dove si isolano soprattutto *Cladosporium*

spp e candidae e da quella del gatto, in cui i miceti più frequentemente isolati sono *Cladosporium* spp. e, in misura inferiore, *Penicillium* spp e *Aspergillus* spp (Samuelson *et al.*, 1984).

Come nel cavallo, anche nel bovino l'isolamento di una specie fungina per almeno 3 volte consecutive è stato rilevato solo in pochi soggetti (allevamento 1: 2 casi; allevamento 2:3 casi; allevamento 3:1 caso). Pertanto, anche nella specie bovina così come nell'equina, il fornice congiuntivale sembra essere contaminato soltanto dalla flora micotica ambientale (*Penicillium* spp.e *Cladosporium* spp.) (Samuelson *et al.*, 1984; Andrew *et al.*, 2003; Barsotti *et al.*, 2006; Nardoni *et al.*, 2007; Sgorbini *et al.*, 2008).

Nei soggetti in cui abbiamo rilevato una colonizzazione, non era presente comunque una sintomatologia riferibile ad una cheratite micotica, confermando la rarità della patologia (Elligott *et al.*, 2006). In questi bovini probabilmente il film lacrimale non operava un efficiente controllo nei confronti dei miceti.

La temperatura e l'umidità non sembrano influenzare la crescita di particolari specie fungine; infatti mentre *Penicillium* spp. e *Cladosporium* spp. sono stati rilevati praticamente ad ogni prelievo nell'arco del biennio, l'isolamento delle altre specie fungine non è correlato a temperatura e/o umidità stagionali particolari.

Sebbene le CFU siano risultate basse per tutti i miceti in tutti gli allevamenti testati, nell'allevamento 1 le CFU sono comunque più alte rispetto a quelle riscontrate negli allevamenti 2 e 3. Questo può essere imputabile alla temperatura costante e al minor ricambio di aria che facilitano la permanenza dei miceti nell'ambiente e quindi la contaminazione ambientale risulta maggiore.

La positività oculare è risultata maggiore nell'allevamento chiuso rispetto agli altri (89%) e, anche in questo caso, la causa può essere dovuta al minor ricambio di aria e quindi alla maggiore probabilità di contaminazione ambientale. In ogni caso la più alta positività oculare riscontrata nel presente studio è comunque più bassa rispetto a quanto riportato da Altri (100%) (Samuelson *et al.*, 1984). Questo potrebbe essere spiegato da temperature ed umidità ambientali tipici del clima temperato (Centro Italia) e meno favorevoli per la crescita micotica rispetto a temperature ed umidità relative più elevate nei climi sub-tropicali (Florida).

Nel lavoro di Nardoni *et al.* (2005), sono stati valutati i miceti presenti nell'aria di tre scuderie diverse per tipologia e management. In questo studio non sono state riscontrate differenze statisticamente significative nei tre tipi di scuderia per quanto

riguarda i miceti ambientali. Si può concludere che, in questo caso, la struttura chiusa sembra non influenzare la presenza di funghi aero-trasmessi, anche se gruppi di funghi diversi da *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp e *Mucoraceae* spp erano maggiormente presenti nella scuderia aperta. Le fonti di bioaerosol fungino in ambienti presi a campione non possono essere facilmente determinate a causa della natura onnipresente dei miceti. I *Penicillia* sono onnipresenti; le *Mucoraceae* spp. sono ampiamente distribuite su alimenti e compost; *Aspergillus fumigatus* è una specie termo-tollerante frequentemente riportata come forma predominante in materiali umidi; *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger* si riscontrano frequentemente rispetto agli altri generi.

Nel nostro studio i miceti ambientali isolati sono simili a quanto riportato da Nardoni *et al.* (2005) ad eccezione del *Cladosporium* spp, sempre presente nei tre allevamenti da noi esaminati per tutto l'arco del biennio.

I miceti isolati dal fornice congiuntivale dei bovini (*Penicillium* spp, *Cladosporium* spp ed Aspergilli) sembrano essere di derivazione ambientale, sebbene le specie *Absidia* spp., *Rhizopus* spp., *Mucor* spp e *Fusarium* spp, anch'esse presenti nell'ambiente siano state isolate solo in alcune occasioni. Questo potrebbe essere imputabile ad un maggior peso dei conidi o delle ife di queste specie che ne limiterebbe la presenza nell'aerosol e di conseguenza nell'occhio.

Nel nostro studio sembra esistere anche una relazione tra i miceti isolati dal fornice congiuntivale e quelli rilevati nell'alimento (*Cladosporium* spp., *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp.). L'unifeed ed il pellettato risultano meno contaminati rispetto a fieno ed erba. Questo potrebbe essere dovuto alla formulazione dell'alimento, ai trattamenti e alla conservazione.

L'analisi statistica non ha evidenziato differenze significative in tutti e tre gli allevamenti studiati per quanto riguarda le prevalenze rilevate nella stessa stagione in anni diversi. Questo spiega sia la costanza di isolamento per alcuni funghi, sia l'occasionalità per altri.

Non esistono differenze statisticamente significative nelle prevalenze tra i prelievi effettuati nel biennio all'interno dello stesso allevamento. In ogni caso nei prelievi effettuati durante le stagioni più calde (maggio, prelievi 3 e 7; agosto, prelievi 4 e 8), il numero delle specie fungine isolate da ciascun occhio è superiore (fino a 4) rispetto ai prelievi effettuati nelle stagioni più fredde (novembre, prelievi 1 e 5; febbraio, prelievi 2 e 6) (max due specie fungine).

Non esistono differenze statisticamente significative per le prevalenze ottenute per ogni specie fungina nei tre allevamenti durante la stessa stagione. Quindi non esistono differenze tra i tre allevamenti, nonostante la diversità di struttura. Questo risultato differisce da quanto riportato da altri Autori sulla specie equina (Moore *et al.*, 1988; Barsotti *et al.*, 2006). In questi studi, infatti, le prevalenze rilevate sugli animali che vivevano all'aperto erano più basse rispetto a quelle rilevate su cavalli che vivevano in scuderie chiuse o semichiusate.

Mentre per la specie equina la letteratura relativa alla flora micotica congiuntivale in soggetti clinicamente sani ed affetti da cheratomicosi è abbondante (Moore *et al.*, 1983; Barton, 1992; Andrew *et al.*, 1998; Brooks *et al.*, 1998; Brooks *et al.*, 2000; Barbasso *et al.*, 2002; Stoppini *et al.*, 2003; Barsotti *et al.*, 2006; Sgorbini *et al.*, 2008), la letteratura relativa alla flora micotica congiuntivale nel bovino, sia in soggetti sani che affetti da cheratomicosi è scarsa. A conoscenza degli Autori, esiste un unico lavoro sulla flora micotica congiuntivale in soggetti considerati clinicamente sani (Samuelson *et al.*, 1984), così come un solo lavoro in cui viene descritto un caso di cheratomicosi in un bovino Holstein (Elligott *et al.*, 2006).

Questo probabilmente perchè la cheratomicosi è una patologia relativamente comune nel cavallo (Moore *et al.*, 1983; Barton, 1992; Andrew *et al.*, 1998; Brooks *et al.*, 1998; Brooks *et al.*, 2000; Stoppini *et al.*, 2003), mentre nel bovino è rara (Elligott *et al.*, 2006).

Nel nostro studio nessun animale ha mai sviluppato cheratomicosi, nonostante il rilevamento di colonizzazione e/o contaminazione fungina del fornice congiuntivale in tutti i prelievi ed in tutti e tre gli allevamenti. Si potrebbe ipotizzare che, nonostante l'occhio del bovino sia più grande rispetto a quello dei carnivori e quindi più esposto alla contaminazione ambientale, potrebbero essere presenti in maniera costante ed in concentrazione elevata fattori aspecifici quali il lisozima, il complemento, etc, e specifici quali immunoglobuline di superficie tali da bloccare la penetrazione dei miceti presenti nel fornice all'interno della cornea. Altra ipotesi potrebbe essere anche legata essenzialmente al fatto che la specie bovina è considerata da reddito e quindi meno seguita dal punto di vista medico.

- Andreoni S., Farina C., Lombardi G.: Atlante di micologia medica. Ed. Systems, Milano, 2003.
- Andrew S. E., Nguyen A., Jones G. L. et al.: Seasonal effects on the aerobic bacterial and fungal conjunctival flora of normal thoroughbred brood mares in Florida. *Vet. Ophthalmol.*, 6: 45-50, 2003.
- Ball M.A.: Equine fungal keratitis. *Compendium*, pp. 182-186, 2000.
- Barbasso E., Stoppini R., Gallo G. et al.: Flora micotica nel fornice congiuntivale di cavalla del Nord Italia: considerazioni epidemiologiche e cliniche. *Proceedings of Annual Meet SOVI*, pp. 44-46, 2002
- Barsotti G., Sgorbini M., Nardoni S., Corazza M., Mancianti F.: Occurrence of fungi from conjunctiva of healthy horse in tuscan, Italy, *Veterinary Research Communications*, 30, 903-906, 2006.
- Barton M.H.: Equine keratomycosis. *Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.*, 14: 933-944, 1992.
- Beech J., Swenney C.R., Irby N.: Keratomycosis in 11 horse. *Equine Vet. J. Suppl.*, 2:39-44, 1983.
- Bistner S.I. and Riis R.C.: Clinical aspect of mycotic keratitis in the horse. *Cornell Veterinarian*, 69: 364-377, 1979.
- Brooks D.E., Andrew S.E., Dillavou C.L. et al.: Antimicrobial susceptibility patterns of fungi isolated from horses with ulcerative keratomycosis. *Am. J. Vet. Res.*, 59: 138-142, 1998.
- Elligott C.R., Wilkie D.A., Kuonen V.J., Bras I.D., Neihaus A.: Primary *Aspergillus* and *Fusarium* keratitis in a Holstein cow. *RIVISTA, VOLUME* 175-178, 2006.
- Gaarder J.E., Rebhun W.C., Ball M.A., Pattern V., Shin S., Erb H.: Clinical appearances, healing patterns, risk factor and outcomes of horses with fungal keratitis: 53 cases (1979-1996). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 213(1): 105-112, 1998.
- Gelatt K.N.: *Veterinary ophthalmology*. Ed. Lea and Febiger, Philadelphia, 1991.
- Gerrit D., Hans-Dieter G., Matthaeus S.: *Innere Medizin und Chirurgies des Rindes, (Medicina Interna e Chirurgia del Bovino)*. Ed. Point Veterinaire Italie, pp. 1180-1197, 2002.

- Grhan B., Walfer J., Keller C. and Wilcock B.: Equine keratomycosis: clinical and laboratory findings in 23 cases. *Progress in Vet. Comp. Ophthalmol.*, 3: 99-103, 1993.
- Kern T.J., Brooks D.E., White M.M.: Equine keratomycosis: current concept of diagnosis and therapy. *Equine Vet. J. Suppl.*, 2: 33-38, 1983.
- Kwon-Chung K.J., Bennet J.E.: *Medical mycology*. Ed. Lea e Febiger, Philadelphia, 1992.
- Lavach J.: *Large animal ophthalmology*. Ed. Mosby Co., St.Louis, 1990.
- Lennigton, Matthew J.C., Kenneth S.L.: Department of Small animal Medicine (Chandler) and Department of Pathology (Latimer), 2002.
- Moore C.P., Heller N., Majors L.J et al.: Prevalence of ocular microorganism in hospitalized and stabled horses. *Am. J. Vet. Res.* 49: 773-777, 1988.
- Moore C.P., Collins B.K., Fales W.H.: Susceptibility patterns of bacterial isolates from 63 cases of equine infectious keratitis. *Proc. ACVO* , pp. 40, 1995.
- Nardoni S., Mancianti F., Sgorbini M., Taccini F., Corazza M.: Identification and seasonal distribution of airborne fungi in three horse stables in Italy. *Mycopathologia*, 10, 4, 207-210, 2005.
- Nardoni S., Sgorbini M., Barsotti G, Corazza M., Mancianti F.: Conjunctival fungal flora in healthy donkeys, *Vet. Ophthalmology* 10, 4, 207-210, 2007.
- Nickel R., Schummer A., Seiferle E.: *trattato di anatomia degli animali domestici*. Casa editrice Ambrosiana Milano, vol. 4, 357-363, 1988.
- Peiffer R.L.: Keratomycosis in the horse. *Equine Practitioner*, 1: 32-37, 1979.
- Pelagalli G.V-Botte V.: *Anatomia Veterinaria sistematica e comparata*, Ediermes, vol. 2:301-318, 1999
- Perruccio C.: *Atlante di oftalmologia veterinaria*. Edizione medico scientifiche, Torino, 1985.
- Perruccio C., Barbasso E.: Cornea. In: *Oftalmologia Equina*. Ed SCIVAC, Cremona, pp 41-46, 1999
- Pisani E.H.R.: *Microbiotica conjuntival normal de equinos*. 41f. Sao paulo, SP Dissertacao (Mestrado), Faculdade de Medicina Veterinaria e zootecnica da Universidade de San Paolo, 1993.
- Raper K.B., Fannel D.I.: *The genus of ASPERGILLUS*. The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1965.

- Rosa M., Cardozo L.M., da Silvia Pereira J. Et al.: Fungal flora of normal eyes of healthy horses from the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Vet. Ophthalmol.*, 6: 51-55, 2003.
- Rosenberger G.: Malattie del bovino. Ed. EDAGRICOLE, pp 656-676, 1996.
- Rosenberger G.: L'esame clinico del bovino. EDAGRICOLE, pp 476-487, 1993.
- Samuelson D.A., Andresen B.S., Gwin R.M.: Conjunctival fungal flora in horse, cattle, dogs, and cats. *JAVMA*, 184: 1240-1242, 1984.
- Severin G.A.: Severin's Veterinary Ophthalmology notes. Ed. Severin, Forth Collins, 1995.
- Sgorbini M., Barsotti G., Nardoni S., Mancianti F., Rossi S., Corazza M.: Fungal flora of normal eyes in healthy newborn foals living in the same stud farm in Italy, *Journal of Equine Veterinary Science*, 28, 2008
- Slatter D.: Fundamentals of veterinary ophthalmology. Ed. W.B. Saunders Company, London, 1990.
- Stoppini R., Barbasso E., Perruccio C., Ratto A., Gallo G.: Cheratomicosi equina in italia settentrionale: 13 casi clinici (1998-2000). *Ippologia*, 4: 13-28, 2003.
- Whitley R.D., Moore C.P.: Microbiology of the equine eye in health and disease. *Vet. Clinics North Am. An. Pract.*, 2: 451-466, 1984.

RINGRAZIAMENTI

Un ringraziamento particolare a tutte le persone che in questi ultimi anni di Università mi hanno aiutato a realizzare il presente lavoro e a raggiungere quest'obiettivo:

...un grazie particolare va ad uno dei pilastri di questa tesi, la Dott.sa Nardoni Simona che prima di considerarla l'esperta di micologia è per me un'amica; grazie perché con la tua pazienza, esperienza e generosità hai eseguito le identificazioni delle muffe e lieviti dei miei prelievi e mi hai sempre aiutata nelle pratiche di laboratorio

... un grazie sincero va alla Prof.ssa Mancianti che con la sua semplicità mi ha sostenuta, incoraggiata e aiutata nella realizzazione di questo lavoro

... un grazie particolare alla Dott.sa Sgorbini che mi ha permesso di sviluppare questo lavoro sul bovino e che nel periodo della stesura ha dovuto sopportare le mie paure e che pazientemente ha corretto i miei "erroracci"

...un grazie al Dot. Barsotti che ha curato la parte clinica di questo lavoro e che meticolosamente ha corretto parte della mia stesura

Ma credo che questa tesi non sarebbe mai potuta nascere senza il mitico Dot. Sbrana Alberto (Alberto per gli amici): un grazie sincero di tutto cuore perché in questi 3 e forse 4 anni mi hai trasmesso la passione per il bovino, mi hai insegnato molto...soprattutto quello che non c'è scritto sui libri ma che è fondamentale per vivere; sei sempre stato una figura di riferimento per tutto: sei un maestro, un amico, un babbo. Le risate, le interrogazioni durante i tragitti che ci portavano da una stalla ad un'altra. Con te e i nostri amici bovini ho sempre ritrovato il relax che la vita frenetica di oggi ti toglie. Mi dispiace per te ma.....mi dovrai sopportare ancora per molti anni! Grazie davvero di tutto cuore

...un grazie speciale a Rivo e a tutti i ragazzi della stalla di San Piero, al Di Lupo che mi riprende sempre quando gli do del "lei" e a Cesare e a tutti i ragazzi di San Rossore che mi prendono sempre in giro e che hanno coniato il mio soprannome "Isolina di stagno". Grazie a tutti voi per la pazienza e per l'aiuto che mi avete dato per eseguire i tamponi oculari; con voi e con Alberto questi prelievi si sono trasformati in sano e puro divertimento

...un grazie speciale allo zio Flavio con cui insieme ogni giorno ci troviamo per dare da mangiare alle nostre mucche: Camilla, Gelsomina, Margherita e ai due vitellini Stella e Cooki.

...grazie a tutti i miei amici più cari che da sempre mi sopportano per questa mia passione sfrenata che ho nei confronti degli animali

...un grazie infinite ai mie amici veterinari: il Dott Breschi Federico, il Dott. Fanucchi Umberto e la Dott.sa Lucchesi Elga che ogni giorno con la loro semplicità ed estrema pazienza mi insegnano i “segreti” del mondo dei piccoli animali

...grazie a Chiara perché con la sua bravura in inglese mi ha aiutato a tradurre molti testi anche perché altrimenti...sarei stata sempre lì con il dizionario in mano

...grazie alla Misericordia di Cenaia, la mia seconda famiglia, dove ogni giorno si impara a condividere e ad aiutare gli altri nelle situazioni più difficili: nel dolore

...potevo dimenticarmi della mia compagna di battaglie?...quante risate insieme tra esami, tirocinei...grazie di tutto cuore a Maria ...boia chi molla!!!

...e poi..qualcuno non vorrebbe ma...io gli faccio una sorpresa: grazie di tutto cuore a Simone che mi ha aiutato nella parte informatica (vista la...mia ignoranza in materia), e che mi ha sempre sostenuto con il suo affetto

E infine un grazie a tutti coloro che nel passato, presente e futuro costituiscono il mondo che mi gira intorno e che mi sono sempre vicini