



**SIBO**

Società Italiana Banche degli Occhi



# **Atlante di valutazione delle cornee**

**Edizione 2018**

*“Ho passato la vita a guardare negli occhi della gente,  
è l'unico luogo del corpo dove forse esiste ancora un'anima.”*

*José Saramago*

(Azinhaga, 16 novembre 1922 – Tías, 18 giugno 2010)

---

## INDICE

---

1	Valutazione della cornea con la lampada a fessura .....	4
1.1	La lampada a fessura .....	4
1.2	Come posizionare la cornea .....	6
1.3	Principi d'impiego della lampada a fessura .....	7
1.4	Miscellanea .....	11
2	Valutazione della cornea con il microscopio speculare .....	16
2.1	Principi ottici e strumentazione .....	16
2.2	Analisi quantitativa.....	17
2.3	Analisi qualitativa .....	19
3	Valutazione della cornea con il microscopio ottico .....	23
3.1	Fisica in pillole .....	23
3.2	Il microscopio ottico.....	23
3.3	Anatomia del microscopio ottico .....	25
3.4	Fisiologia del microscopio ottico.....	26
3.5	Patologia del microscopio ottico.....	27
3.6	Miscellanea .....	28
	Indice delle figure .....	31

# 1 Valutazione della cornea con la lampada a fessura

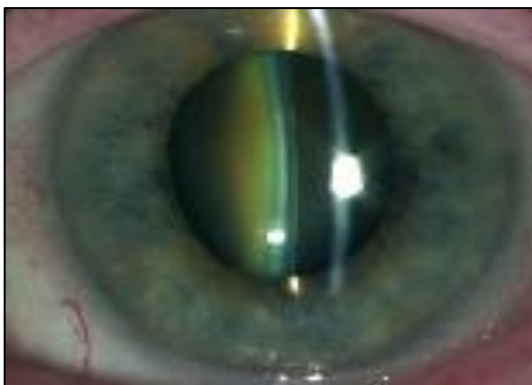
## 1.1 La lampada a fessura

La lampada a fessura (biomicroscopio) è un microscopio binoculare progettato per essere utilizzato in posizione orizzontale (**Figura 1**).

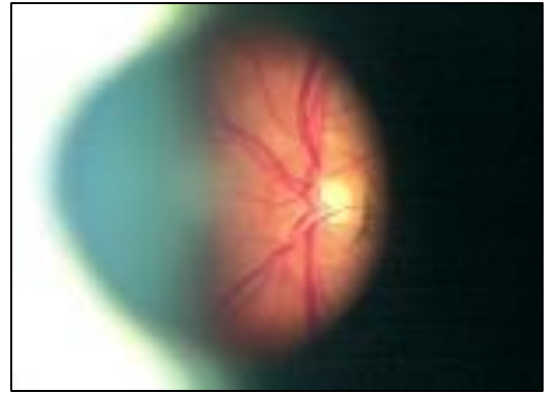


**Figura 1:** lampada a fessura.

*In vivo* fornisce una visione ingrandita, stereoscopica (tridimensionale) delle strutture oculari anteriori e, con l'utilizzo di lenti aggiuntive, anche di quelle posteriori (**Figura 2 e 3**).

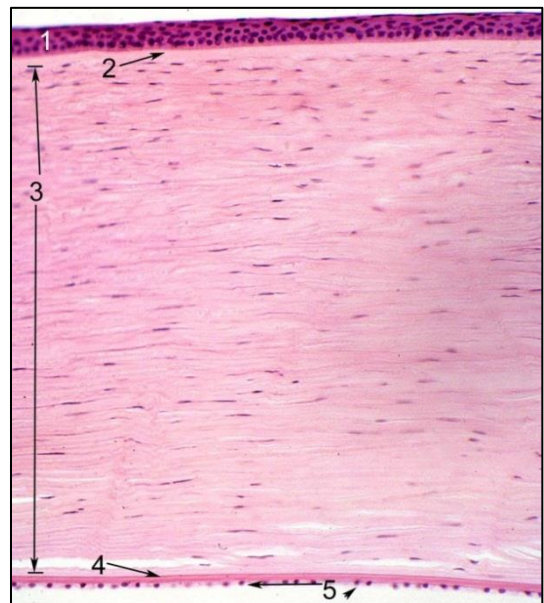
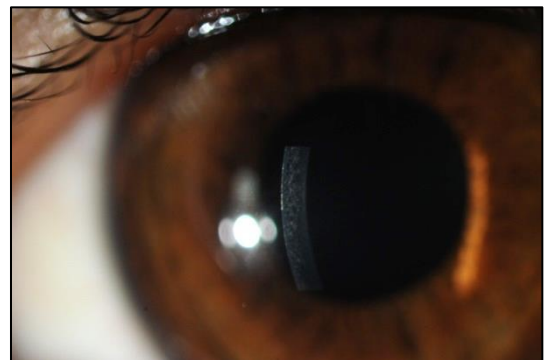


**Figura 2:** valutazione del segmento anteriore alla lampada a fessura *in vivo*.



**Figura 3:** valutazione della retina alla lampada a fessura *in vivo*.

La lampada a fessura è uno strumento utile nella valutazione della cornea sia *in vivo* che nel tessuto isolato, in grado di fornire in maniera non invasiva l'equivalente di una sezione istologica: epitelio, stroma ed endotelio (**Figura 4**).



**Figura 4:** valutazione della cornea alla lampada a fessura ("sezione istologica *in vivo*") [in alto], sezione corneale: epitelio (1), membrana di Bowman (2), stroma (3), membrana di Descemet (4) ed endotelio (5) [in basso].

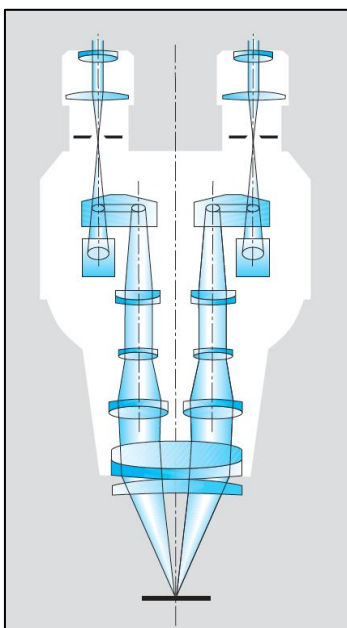
Tale dispositivo permette di eseguire una selezione preliminare dei tessuti, in accordo alle Linee Guida dell'EEBA ("Technical Guidelines for Ocular Tissue"): "[...] slit lamp examination, performed when whole eyes are enucleated or when corneoscleral buttons are excised, is recommended because it provides additional information [...]".

La lampada a fessura è composta da:

- microscopio;
- sistema di illuminazione;
- supporto mobile;
- strumenti fotografici aggiuntivi.

Il microscopio è formato da:

- stereomicroscopio ad ingrandimento variabile da 6× a 40× (**Figura 5**);
- oculari paralleli, dove lo sguardo focalizzato all'infinito consente una visione senza affaticamento quando lo strumento viene utilizzato per un lungo periodo di tempo, o convergenti, dove lo sguardo focalizzato a breve distanza risulta migliore quando lo strumento viene utilizzato per ridotti periodi di tempo intervallati tra loro (**Figura 6**).



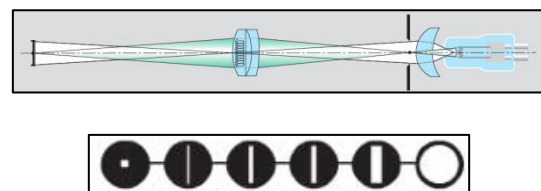
**Figura 5:** schema generale di uno stereomicroscopio.



**Figura 6:** oculari paralleli [in alto] e convergenti [in basso].

Il sistema di illuminazione è formato da una sorgente luminosa alogena e di un condensatore a lenti che sono in grado di produrre un fascio di luce a fessura ad una distanza definita dallo strumento.

La fessura può variare in lunghezza, larghezza e posizione, con la possibilità di attraversare filtri specifici (blu, verde, ecc.) per particolari applicazioni (**Figura 7**).



**Figura 7:** schema generale di un sistema di illuminazione [in alto] e della fessura prodotta [in basso].

Il supporto mobile è il sistema meccanico che permette al microscopio ed al sistema di illuminazione di essere incernierati sullo stesso asse attorno a cui ruotano indipendentemente.

Questo permette ad entrambi di focalizzarsi su uno stesso piano, nello stesso punto (per particolari osservazioni – vedi diffusione sclerale – è possibile dissociarli), ma con diverse inclinazioni sull'asse orizzontale (**Figura 8**).

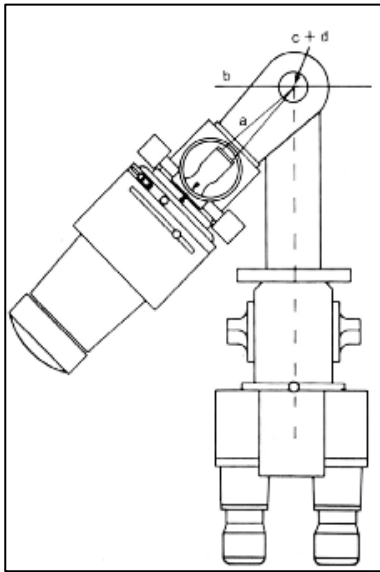


Figura 8: schema generale di supporto mobile.

Un comando a joystick consente di spostare lo strumento nelle tre direzioni dello spazio: sinistra/destra, avanti/indietro (messa a fuoco) e su/giù.

Gli elementi fotografici aggiuntivi possono comprendere:

- fotocamera digitale;
- beam splitter (per fornire una visione coassiale);
- flash elettronico (per riprodurre l'effetto dell'illuminazione);
- luce di riempimento (una fonte accessoria di illuminazione diffusa per ottenere delle informazioni generali sul contesto evidenziato dalla fessura).

## 1.2 Come posizionare la cornea

La cornea del donatore può essere collocata di fronte alla lampada a fessura per una corretta messa a fuoco utilizzando dispositivi diversi (Figura 9 e 10):

- flacone di trasporto per cornea sorretto da una pinza da laboratorio ad aggaffi;

- camera per osservazione corneale sorretta da una pinza da laboratorio ad aggaffi;
- flacone di trasporto per cornea sorretto da un sostegno forato munito di specchio inclinato a 45°;
- camera umida di trasporto per bulbo oculare per esaminare l'intero occhio.



Figura 9: flacone di trasporto per cornea su pinza ad aggaffi [in alto], camera per visualizzazione corneale su pinza ad aggaffi [in mezzo], flacone di trasporto per cornea su sostegno munito di specchio [in basso].



Figura 10: sistema con pinze per sostegno ad aggaffi e specchio.

## 1.3 Principi d'impiego della lampada a fessura

A seconda del tipo di illuminazione, possono essere visualizzati e studiati particolari dettagli del tessuto in esame:

- con l'illuminazione diretta il fascio di luce è direttamente puntato verso l'oggetto messo a fuoco (modalità accoppiata);
- con l'illuminazione indiretta il fascio di luce è decentrato per illuminare dietro l'oggetto messo a fuoco (modalità disaccoppiata).

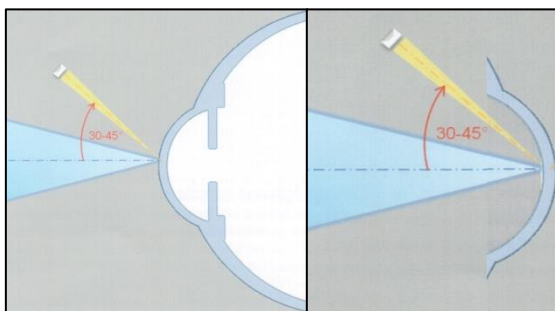
I tipi di illuminazione diretta sono:

- diffusa;
- focale (sezione o parallelepipedo);
- riflessione speculare.

I tipi di illuminazione indiretta sono:

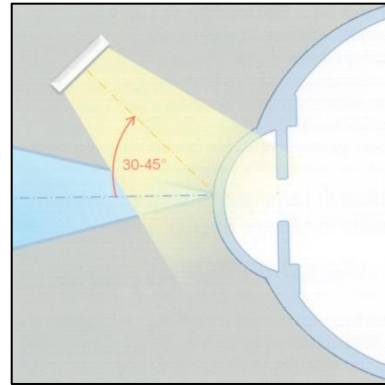
- retroilluminazione;
- scatter sclerotica.

Nella valutazione di una cornea posso essere applicate entrambe le tecniche di illuminazione sul lato epiteliale o sul lato endoteliale (**Figura 11**).

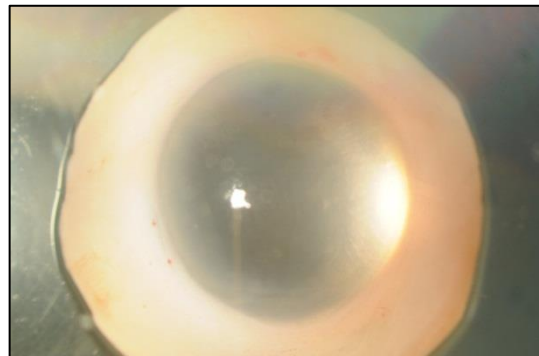


**Figura 11:** tecniche di illuminazione applicate alla valutazione della cornea.

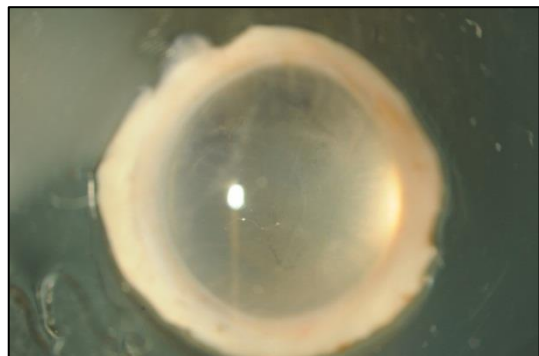
Nell'illuminazione diretta diffusa della cornea l'ingrandimento è basso e la fessura è completamente aperta, al fine di eseguire una valutazione panoramica del tessuto per esaminare superficie, dimensione, forma, trasparenza ed eventuali corpi estranei o opacità in esso presenti (**Figure da 12 a 17**).



**Figura 12:** illuminazione diretta diffusa della cornea.



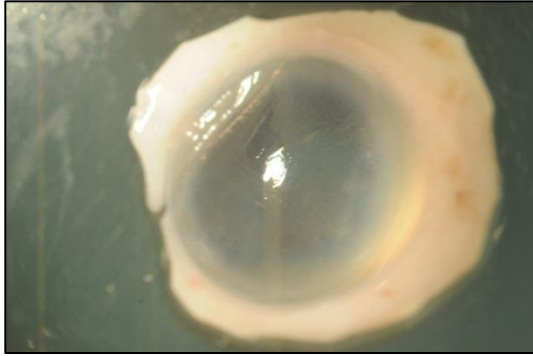
**Figura 13:** vista anteriore – superficie, dimensione, forma e trasparenza corneale normali; anello sclerale di forma regolare e dimensione corretta ( $\geq 2\text{mm}$ ).



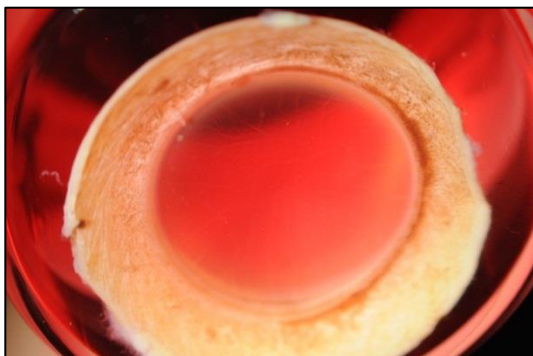
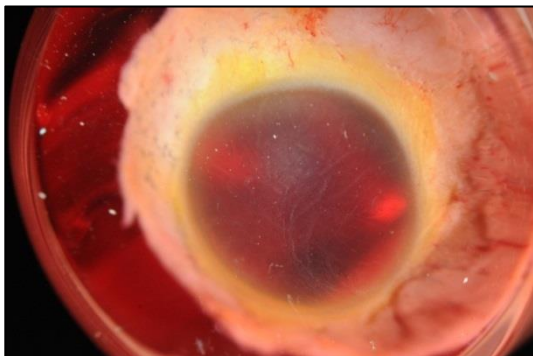
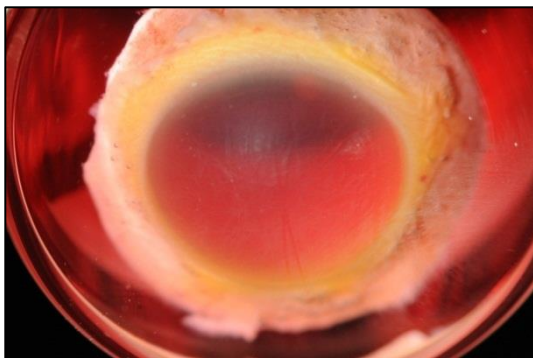
**Figura 14:** vista anteriore – superficie, dimensione e forma corneale normali, presenti alcune pieghe; anello sclerale di forma abbastanza regolare, ma dimensione non corretta ( $\leq 2\text{mm}$ ).



**Figura 15:** vista anteriore – superficie, dimensione e forma corneale normali, diametro di trasparenza  $< 8\text{mm}$  (gerontoxon); anello sclerale di forma abbastanza regolare, ma dimensione non corretta ( $\leq 2\text{mm}$ ).

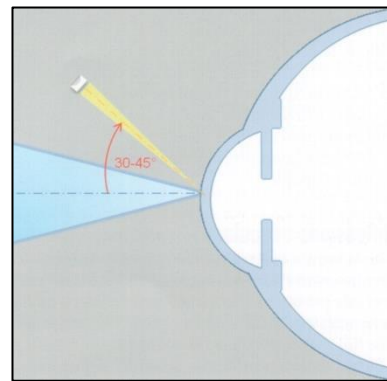


**Figura 16:** vista anteriore – superficie, dimensione e forma corneale normali, presenti alcune pieghe; anello sclerale di forma irregolare e dimensione non corretta ( $\leq 2\text{mm}$ ); incisione in cornea chiara da prelievo.

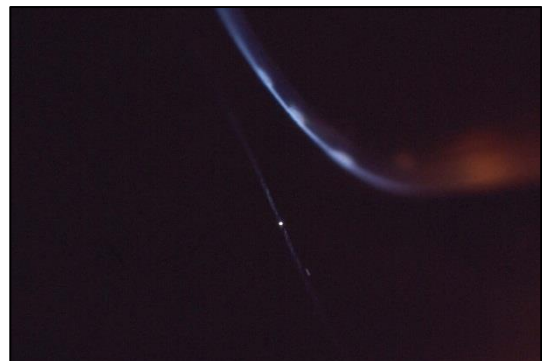


**Figura 17:** vista anteriore in alto ed in mezzo, vista posteriore in basso – superficie normale, presenti alcune pieghe; anello sclerale abbastanza regolare, ma cornea indentata (distanza minima dal bordo sclerale  $\leq 2\text{mm}$ ); colorazione giallognola dovuta alla presenza di residue di iodopovidone.

Nell'illuminazione diretta focale della cornea l'ingrandimento è medio o alto e la fessura è stretta ( $< 0,5\text{mm}$  per la sezione) o media (tra  $0,5\text{mm}$  e  $2\text{mm}$  per il parallelepipedo): la sezione consiste in una "fetta di luce" utile per determinare la profondità delle lesioni, il parallelepipedo consiste in un "cubo curvo" utile per valutare l'epitelio, lo stroma, la membrana di Descemet e l'eventuale presenza di edema (**Figure da 18 a 22**).

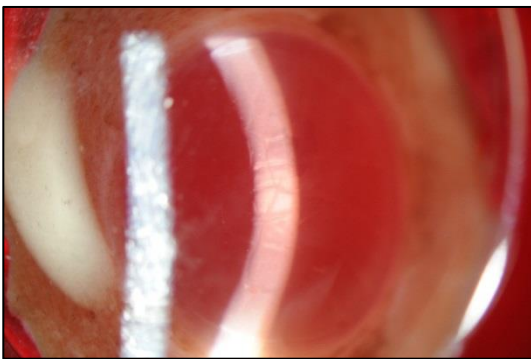
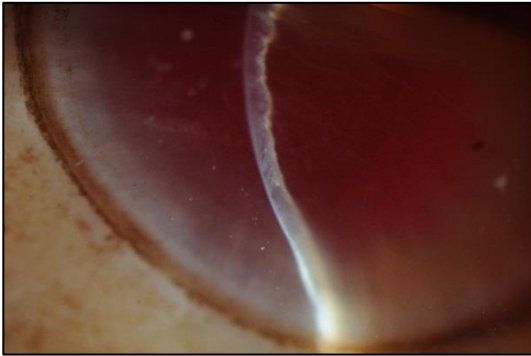
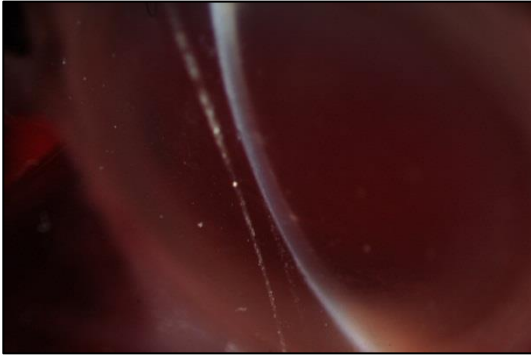


**Figura 18:** illuminazione diretta focale della cornea.

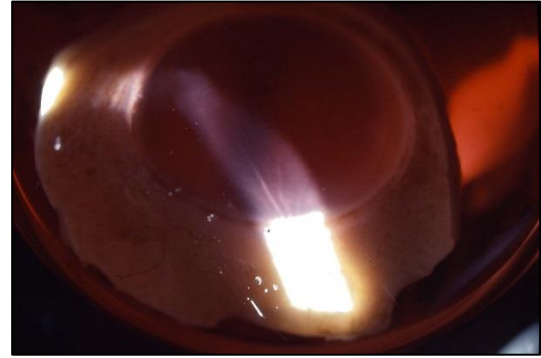


**Figura 19:** la sezione ed il parallelepipedo mettono in evidenza la dimensione e la profondità di leucomi, depositi e detriti.

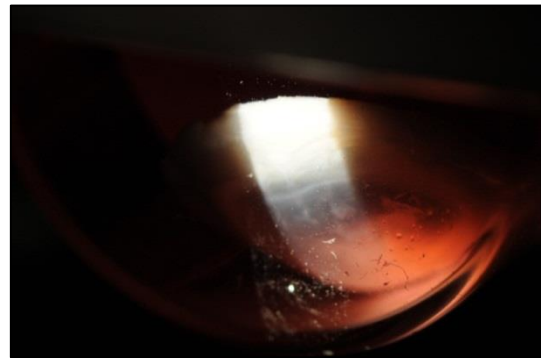




**Figura 20:** la sezione ed il parallelepipedo permettono la classificazione delle pieghe della membrana di Descemet da ipotonia e trazione (lievi, medie e grossolane).



**Figura 21:** la torsione della cornea durante l'escissione provoca profonde pieghe radiali e mortalità dell'endotelio.



**Figura 22:** evidenze di chirurgia della cataratta: cicatrice dell'incisione [in alto], punti di sutura singoli [in mezzo], tunnel corneale [in basso].

Nell'illuminazione diretta a riflessione speculare della cornea l'ingrandimento è alto e la fessura è un piccolo e corto parallelepipedo: l'angolo

di incidenza del fascio di luce sulla cornea è uguale all'angolo di riflessione della luce nel biomicroscopio e permette di valutare l'endotelio, evidenziando i margini cellulari e l'eventuale presenza di guttae (Figure 23 e 24).

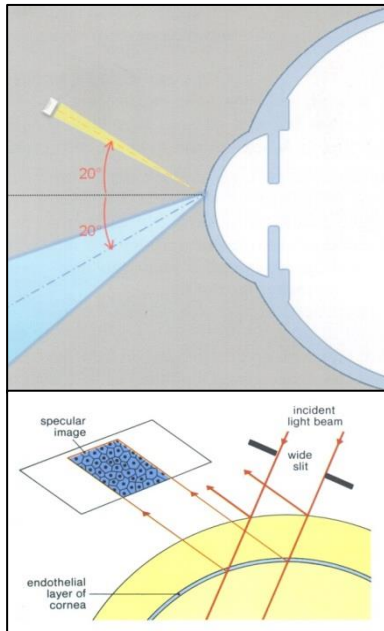


Figura 23: illuminazione diretta a riflessione speculare della cornea.

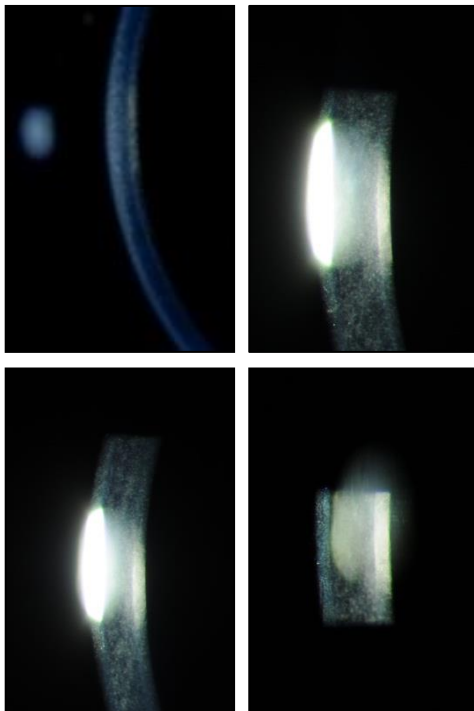


Figura 24: endotelio corneale con evidenze di distrofia.

Nell'illuminazione indiretta a retroilluminazione della cornea l'ingrandimento è basso o medio e la fessura è un piccolo parallelepipedo: la zona da esaminare viene illuminata attraverso la riflessione diffusa del fascio di luce nel mezzo (*in vivo* anche per riflessione diretta su aree come l'iride, il cristallino o il fundus), evidenziando l'eventuale presenza di cicatrici, edema epiteliale, pigmentazione e precipitati corneali, sangue, vacuoli e vasi fantasma (Figure 25 e 26).

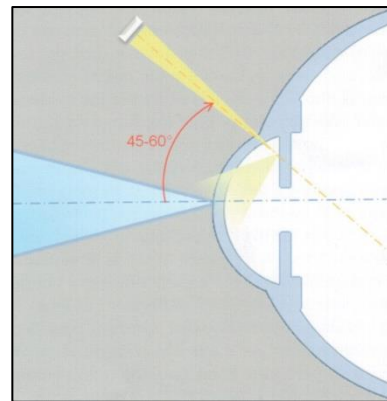


Figura 25: illuminazione indiretta a retroilluminazione della cornea.

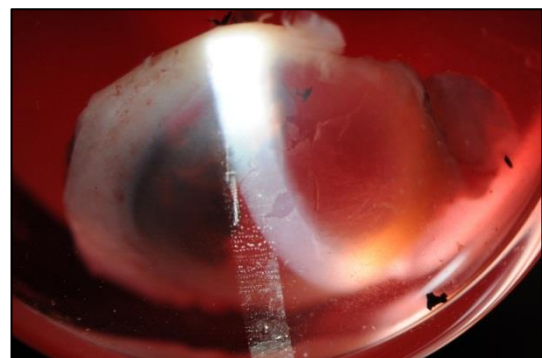
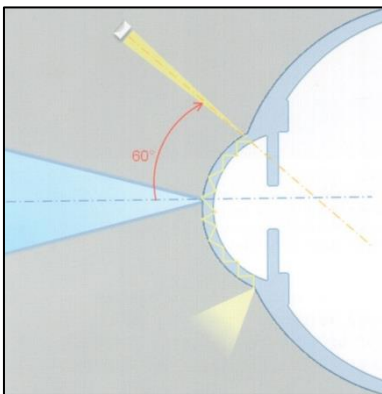
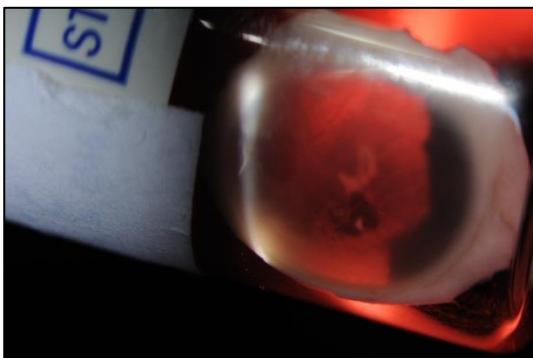
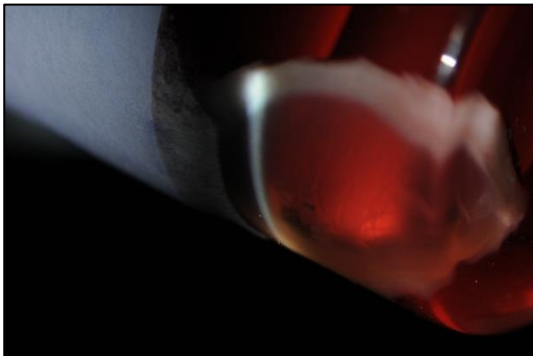


Figura 26: difetti epiteliali ed edema.

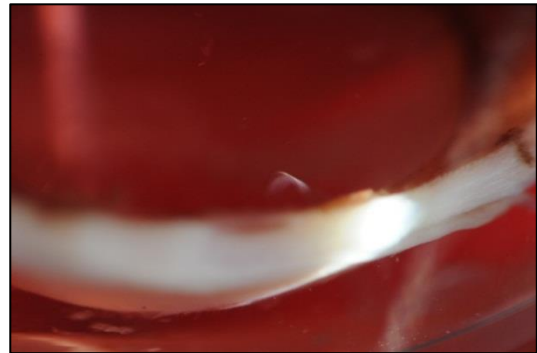
Nell'illuminazione indiretta a scatter sclerotica della cornea l'ingrandimento è basso e la fessura è un piccolo parallelepipedo: il fascio di luce decentrato viene proiettato a livello del limbus e riflesso internamente attraverso il tessuto corneale (riflessione interna simile alla propagazione della luce attraverso una fibra ottica), evidenziando alterazioni a bassa densità ottica come distrofia, edema epiteliale e rottura della membrana di Descemet (**Figure da 27 a 29**).



**Figura 27:** illuminazione indiretta a scatter sclerotica della cornea.



**Figura 28:** cheratopatia da esposizione: disepitelizzazione, rigonfiamento ed opacizzazione dell'epitelio.



**Figura 29:** rottura della membrana di Descemet.

La lampada a fessura è uno strumento utile per valutare l'idoneità dei tessuti corneali al trapianto.

La quantità e qualità delle informazioni derivate da un esame alla lampada a fessura sono correlate al livello di pratica acquisito nell'applicazione delle varie tecniche.

#### 1.4 Miscellanea

Di seguito viene presentata una serie di figure rappresentative di anomalie tissutali che possono essere riscontrate ad un'analisi della cornea alla lampada a fessura (**Figure da 30 a 51**).

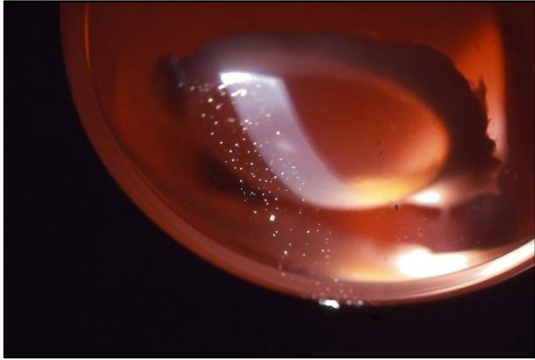


Figura 30: leucoma.



Figura 31: leucoma.

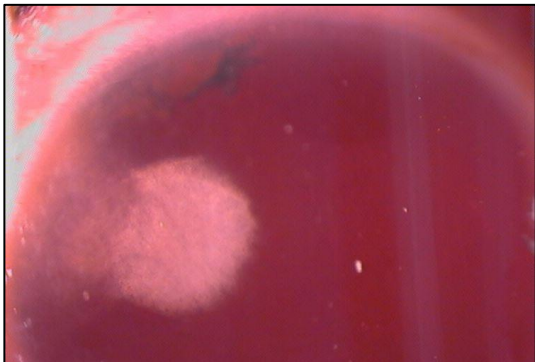


Figura 32: termocheratoplastica (chirurgia refrattiva).

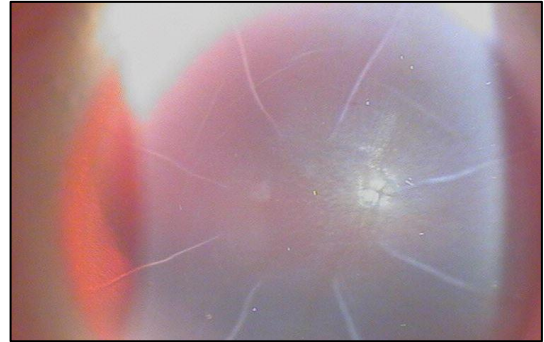


Figura 33: cheratotomia radiale (chirurgia refrattiva).

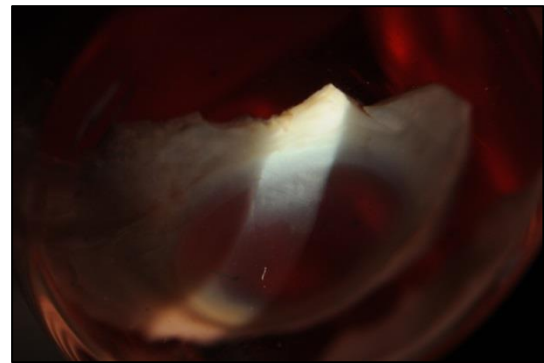


Figura 34: pterigio.

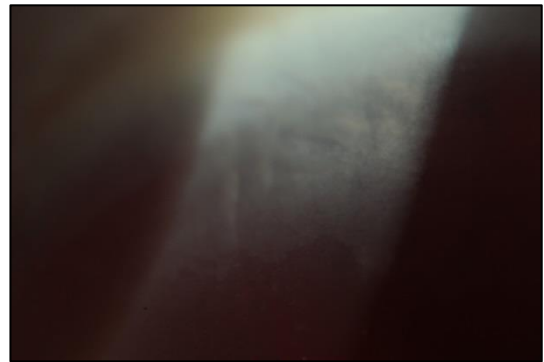
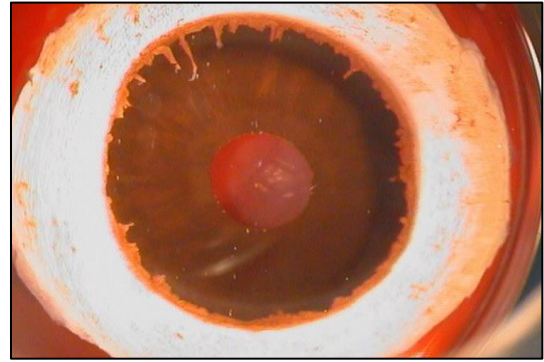
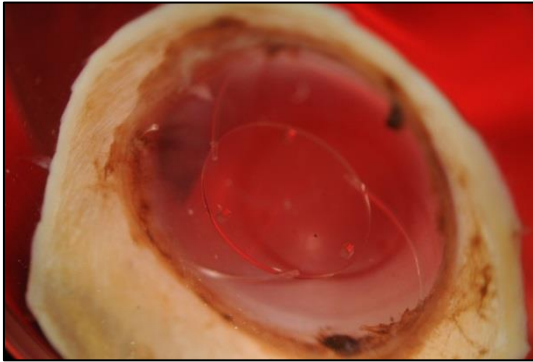
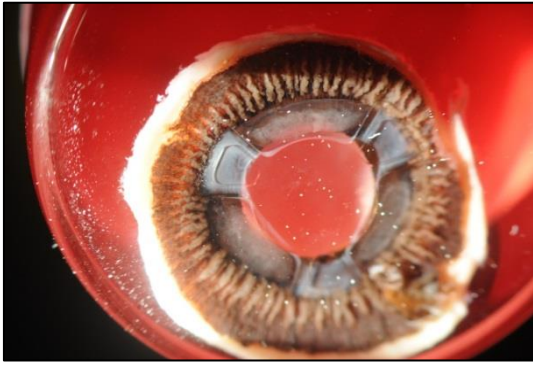
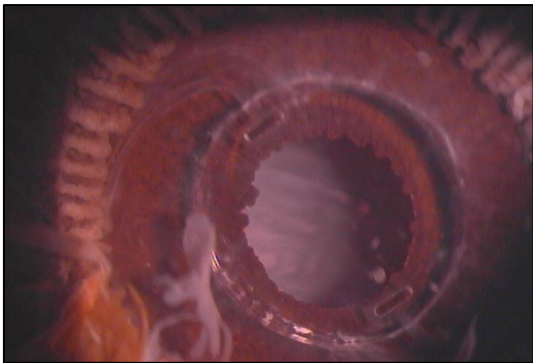


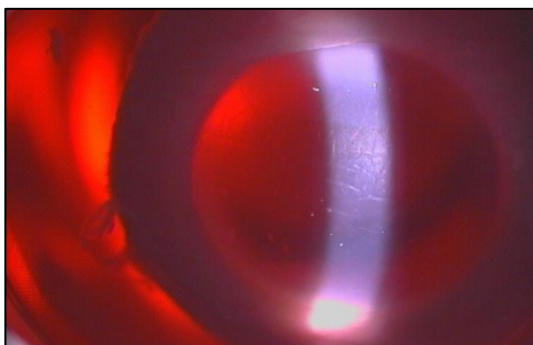
Figura 35: presenza di ciglio.



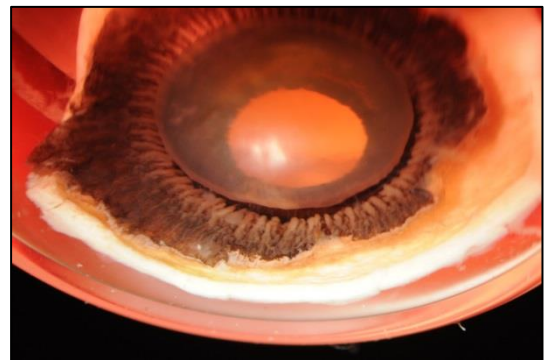
**Figura 38:** presenza di iride in sede.



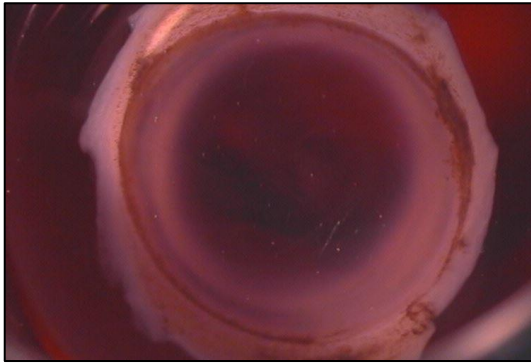
**Figura 36:** IOL, iride e corpo ciliare.



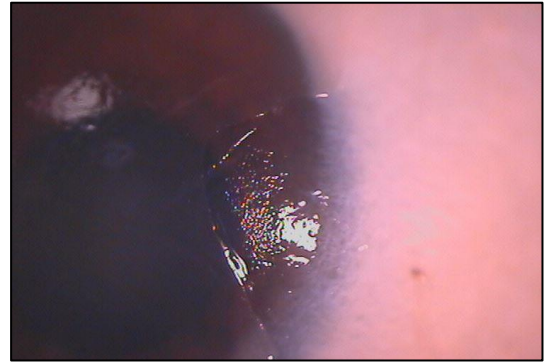
**Figura 37:** pieghe da ipotono.



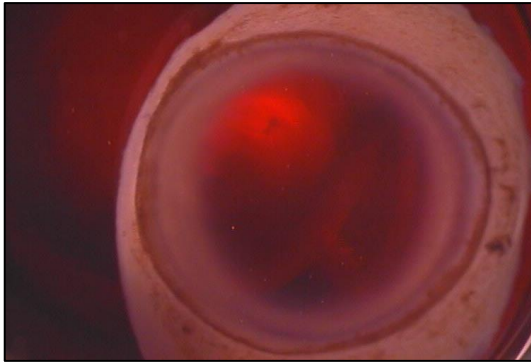
**Figura 39:** presenza di iride e cristallino.



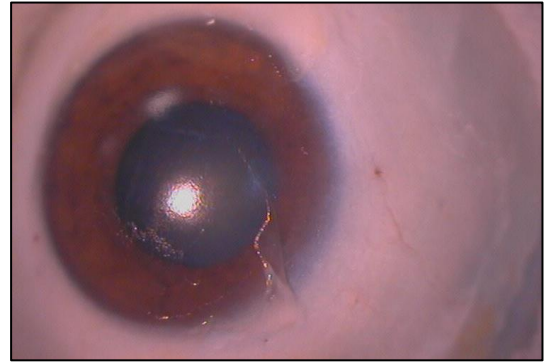
**Figura 40:** anello sclerale insufficiente.



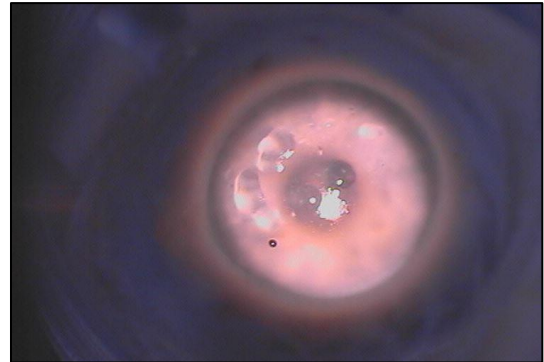
**Figura 42:** bulbo con danno corneale da prelievo.

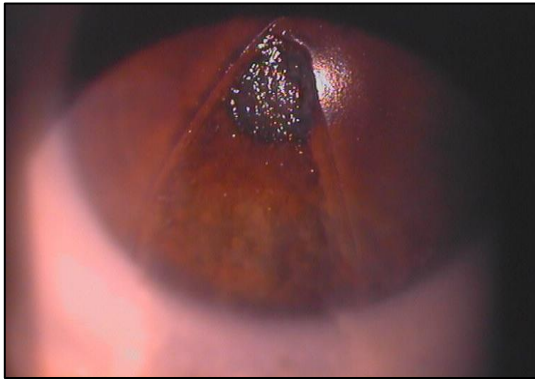


**Figura 41:** sospetto melanoma.

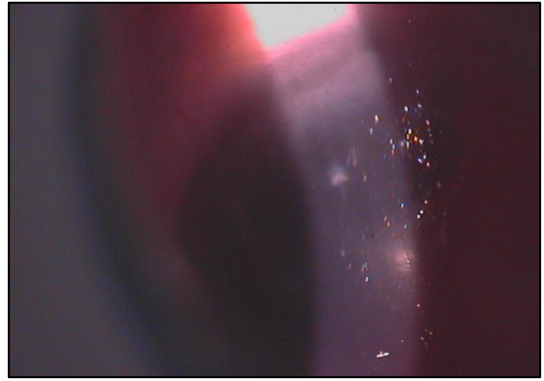


**Figura 43:** corpo estraneo [in alto], esiti di corpo estraneo con opacità [in basso].

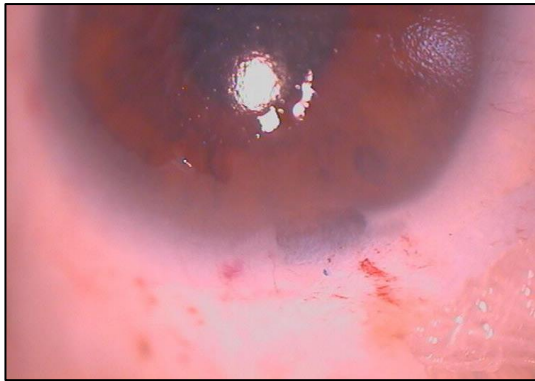




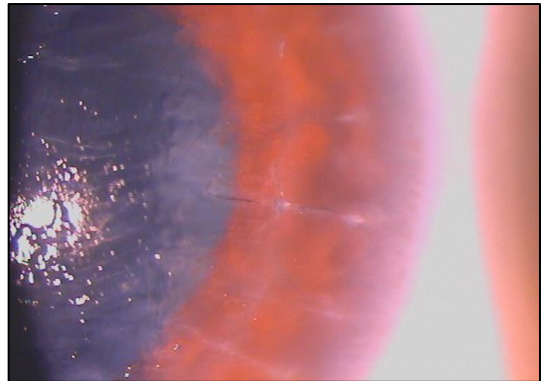
**Figura 44:** danno stromale da prelievo.



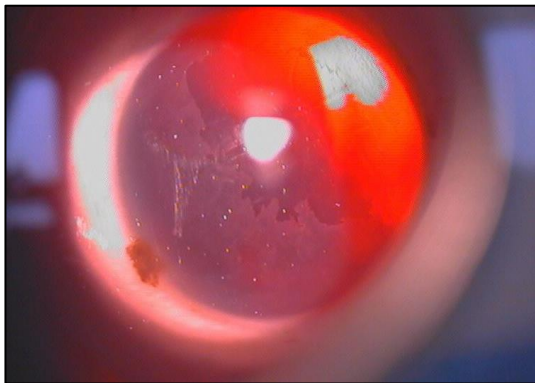
**Figura 48:** esito di perforazione corneale.



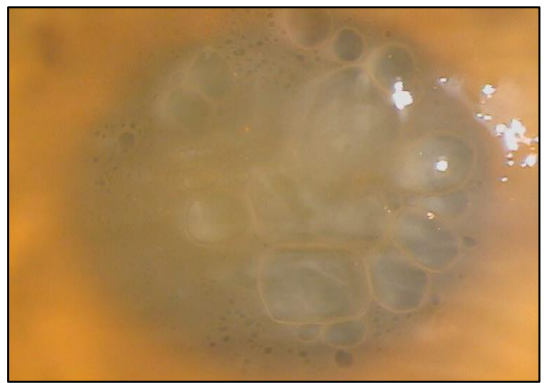
**Figura 45:** erosione stromale al limbus.



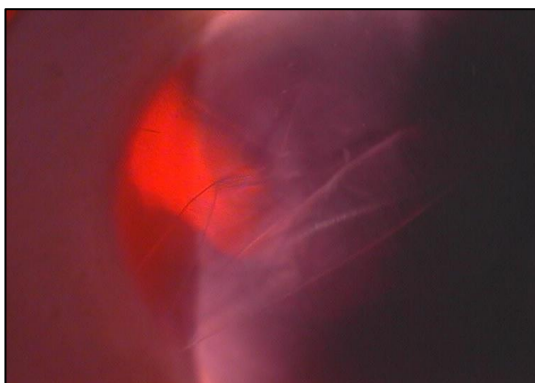
**Figura 49:** esito di chirurgia con punto in sede.



**Figura 46:** sospetta pigmentazione.



**Figura 50:** edema a bolle.



**Figura 47:** strappo della membrana di Descemet.



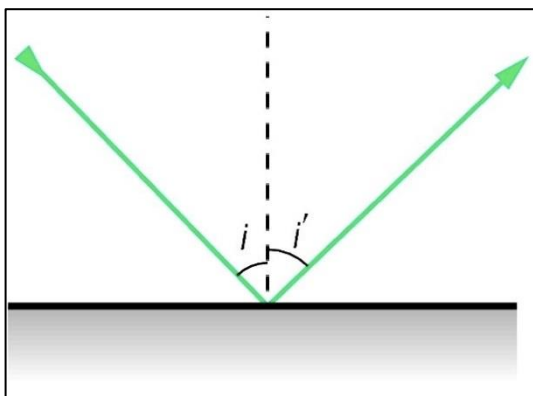
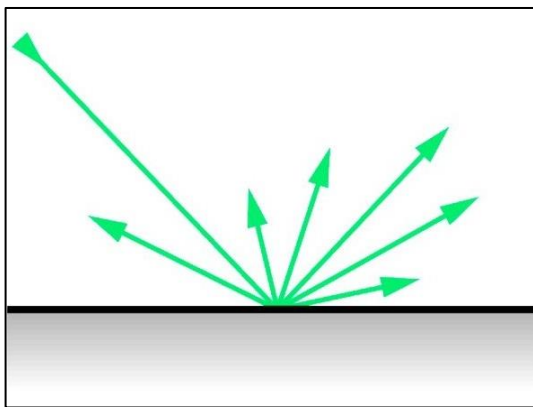
**Figura 51:** prelievo senza sclera con punto in sede.

## 2 Valutazione della cornea con il microscopio speculare

### 2.1 Principi ottici e strumentazione

La luce incidente su una superficie può essere riflessa, oltre che assorbita e rifratta.

Una piccola porzione di luce viene riflessa specularmente: l'angolo di riflessione è uguale all'angolo di incidenza (**Figura 52**).



**Figura 52:** luce incidente e riflessione speculare.

Quando un raggio di luce attraversa un mezzo non omogeneo, ad ogni interfaccia parte della luce viene riflessa.

La luce riflessa specularmente dalla superficie corneale posteriore viene raccolta attraverso un sistema focalizzato.

Per elaborare segnali di questo tipo si utilizza uno specifico microscopio (**Figura 53**) dotato di:

- videocamera integrata;
- software di analisi;
- dispositivo di pachimetria ottica.



**Figura 53:** microscopio speculare.

Il flacone di trasporto con liquido di conservazione o la viewing chamber si posiziona nell'apposito alloggiamento (**Figura 54**).



**Figura 54:** posizionamento del flacone di trasporto.

La cornea deve essere posizionata sul fondo del flacone di trasporto con il lato endoteliale verso il basso (**Figura 55**).





Figura 55: corretto posizionamento della cornea all'interno del flacone di trasporto.

Le cellule periferiche sono escluse non essendo interamente circondate da altre cellule inserite (Figura 57).

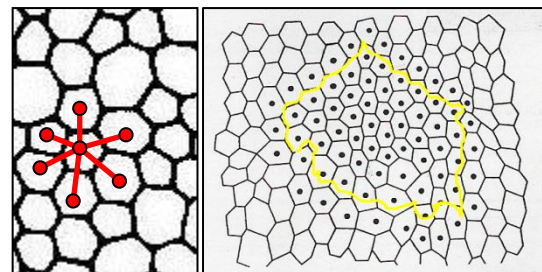
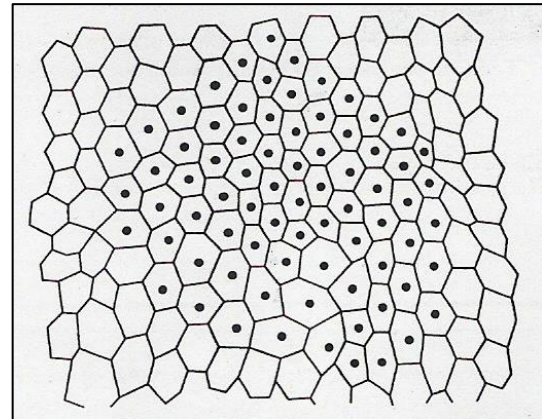


Figura 57: "Center Method".

Gli snodi permettono un movimento sugli assi x, y e z, laddove l'alloggiamento basculante permette di inclinare il tessuto rispetto alla fessura del microscopio (Figura 56).

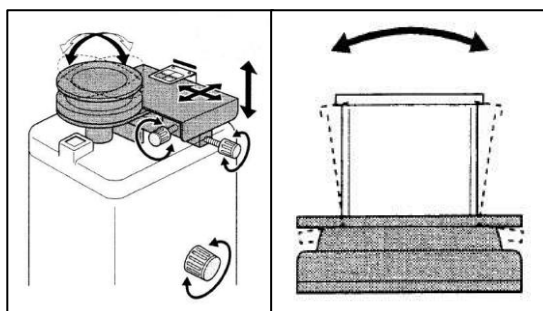


Figura 56: sistema di regolazione della centratura del campione da sottoporre ad analisi.

Il software permette di effettuare la conta endoteliale con metodica "Center Method".

Individuando il centro di ciascuna cellula, il software ne determina i margini e calcola l'area mediante i pixel corrispondenti.

## 2.2 Analisi quantitativa

I parametri più importanti che caratterizzano il risultato dell'analisi sono (Figura 58):

- densità endoteliale (CD);
- coefficiente di variazione (CV);
- esagonalità (6A);
- pachimetria ( $\mu\text{m}$ ).

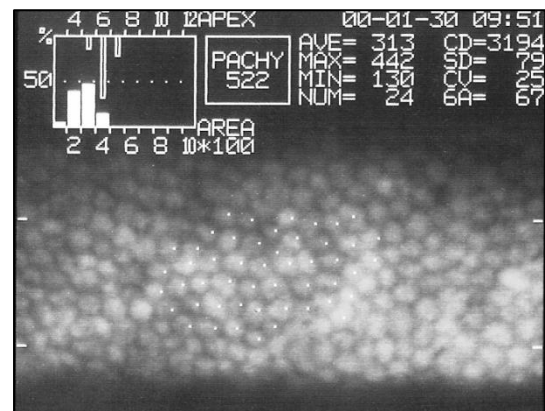


Figura 58: risultato dell'analisi.

La densità cellulare (CD) è definita come:

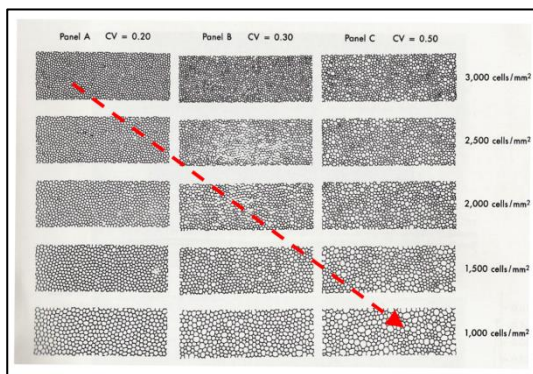
$$CD [cell/mm^2] = \frac{106}{area\ cellulare\ media}$$

Il coefficiente di variazione (CV) è definito come:

$$CV = \frac{SD}{area\ cellulare\ media}$$

Il coefficiente di variazione dovrebbe assumere valori nell'intervallo 0,25-0,30.

Valori elevati significano una notevole variabilità delle dimensioni cellulari che viene denominata polimegatismo (**Figura 59**).



**Figura 59:** correlazione tra CD e CV (la freccia rossa indica la "direzione d'instabilità").

Cornee con la stessa CD possono avere differenti CV.

La sola CD non evidenzia la stabilità corneale.

L'esagonalità (6A) è definita come:

$$6A = \% \text{ cellule con 6 lati}$$

L'esagonalità dovrebbe assumere valori maggiori del 50%.

Un elevato numero di cellule con più o meno di sei lati indica instabilità cellulare ed è denominato polimorfismo.

È importante ricordare che il microscopio speculare analizza una piccola area centrale (<1mm<sup>2</sup>) anche con misurazione multiple.

Alcuni Autori hanno riportato che:

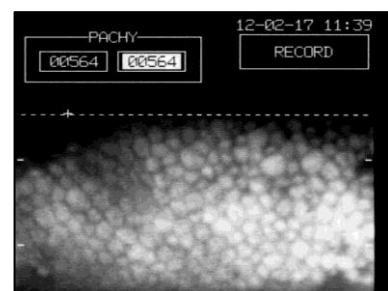
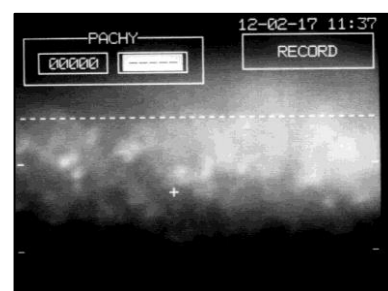
- la CD assiale è un buon indicatore della CD totale;
- un deficit cellulare periferico può essere dedotto sia da marcato pleomorfismo e polimegatismo, sia da una CD significativamente più elevata nell'occhio controlaterale.

I dati del microscopio speculare devono sempre essere interpretati congiuntamente ad un esame del tessuto alla lampada a fessura.

Per calcolare la pachimetria ottica con modalità "manuale" occorre (**Figura 60**):

- azzerare la scala micrometrica focalizzando l'epitelio;
- leggere il valore focalizzando sull'endotelio (distanza ep-end).

La pachimetria dovrebbe assumere valori maggiori di 500µm (attendibile solo per "valori estremi").

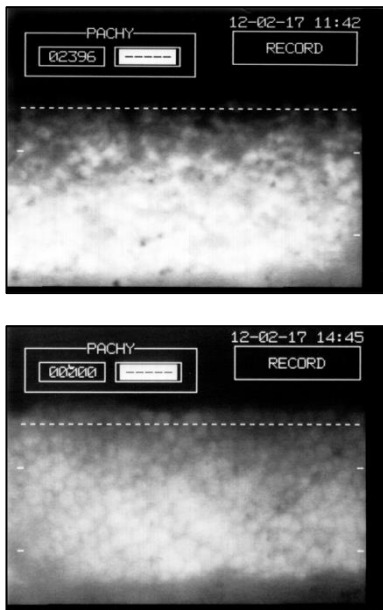


**Figura 60:** calcolo della pachimetria ottica con modalità manuale.

## 2.3 Analisi qualitativa

Prima di iniziare l'esame è essenziale riportare il tessuto a temperatura ambiente (circa 25°C) per evitare artefatti.

La cornea fredda non permette una corretta visualizzazione dell'endotelio (**Figura 61**).



**Figura 61:** cornea in ipotermia [in alto] ed a temperatura ambiente [in basso] a confronto.

Alcuni Autori hanno correlato le variazioni morfologiche osservate in microscopia speculare con:

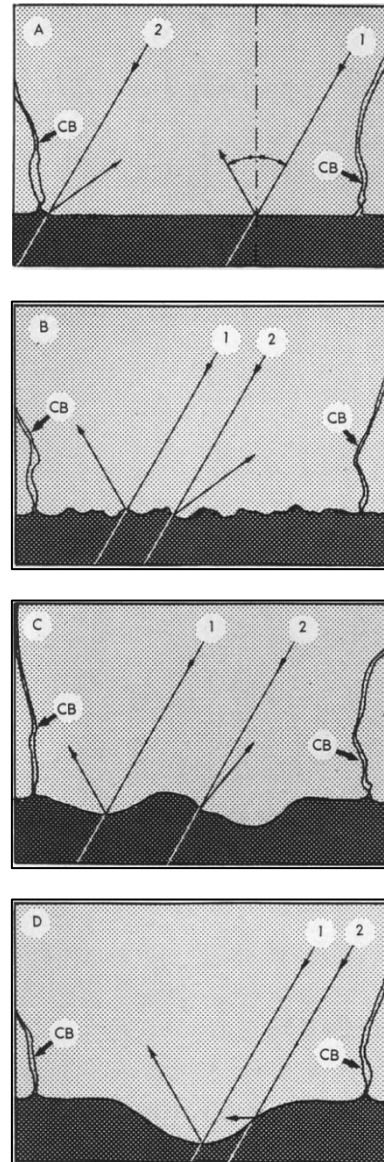
- preparati istologici in microscopia ottica;
- preparati istologici in microscopia elettronica a scansione.

È essenziale riconoscere le strutture normali e quelle patologiche, cioè "interpretare il chiaroscuro".

Le immagini dipendono dalla regolarità della superficie endoteliale (**Figura 62**):

- una superficie regolare è rappresentata da un'area più chiara;
- una superficie rugosa od ondulata è rappresentata da aree non uniformi chiare e scure;

- una escrescenza posteriore è rappresentata da un'area scura con apice chiaro.



**Figura 62:** variazione dell'angolo di riflessione speculare nel caso di una superficie irregolare.

I margini cellulari appaiono come sottili linee scure (**Figura 63**).



**Figura 63:** margini cellulari.

La differenza di altezza fra cellule contigue simula dei margini doppi (Figura 64).

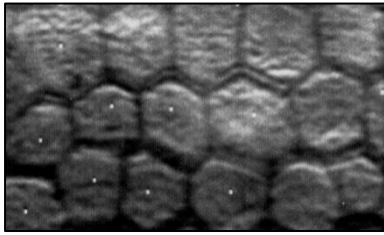


Figura 64: margini cellulari doppi tra cellule contigue.

La forma prevalente delle cellule è quella esagonale.

Nel caso di polimorfismo, che consegue a sofferenza cellulare, si osservano quadri cellulari variegati: cellule giganti, allungate, compresse, indentate ed a margherita (Figura 65 e 66).



Figura 65: variazione della forma delle cellule.

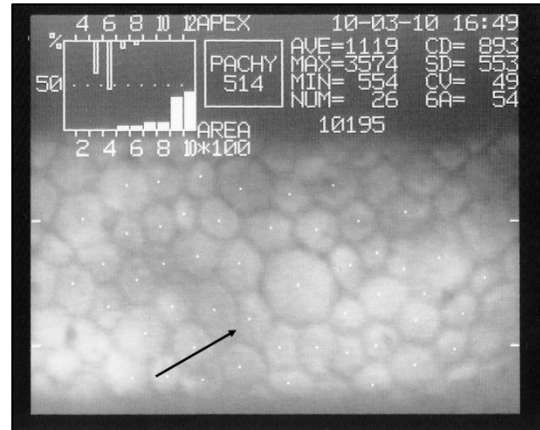


Figura 66: forma delle cellule a margherita.

Le aree scure rappresentano: cilia, vacuoli o blebs, globuli rossi, depositi di pigmento (Figura 67).

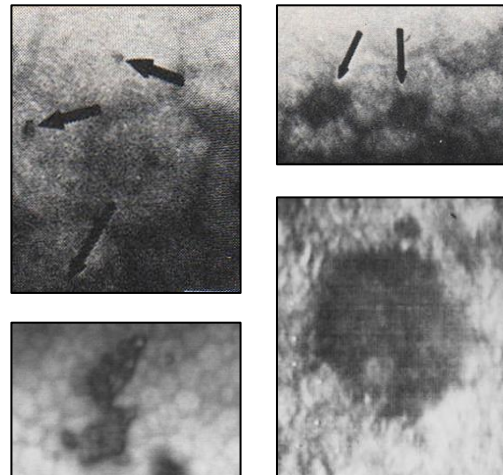


Figura 67: esempi di aree scure.

Le aree chiare rappresentano: nuclei, leucociti adesi, corpi ialini (Figura 68).

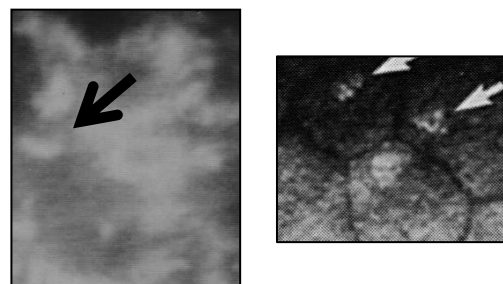


Figura 68: aree bianche.

Nella distrofia di Fuchs le cellule endoteliali mostrano escrescenze verrucoidi: guttae.

Nella gutta (**Figura 69**) si ha una dispersione della luce (area scura) e una riflessione della luce (area chiara).

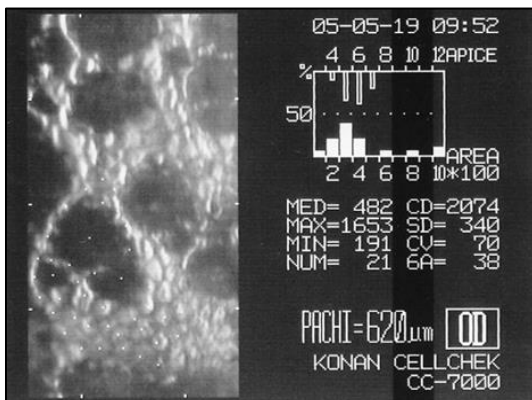
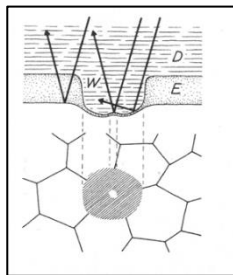
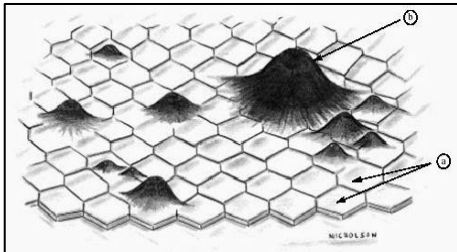


Figura 69: aspetto delle gutte.

Le pieghe sono la manifestazione fisica dell'edema corneale: possono essere lievi, moderate o severe e popolate con cellule normali o sofferenti – necrotiche (**Figura 70**).

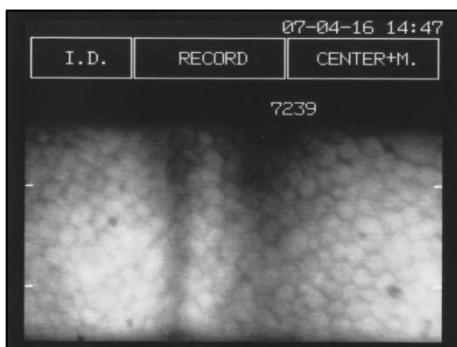


Figura 70: aspetto delle pieghe.

Nella necrosi possono essere individuati tre stadi morfologici (**Figura 71 e 72**):

- inizialmente la cellula ha un aspetto rigonfio e margini sfumati;
- successivamente si ha la necrosi della cellula (residuano detriti cellulari);
- infine le cellule circostanti migrano e si modificano per coprire la lacuna (rosetta).

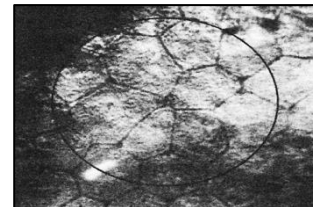
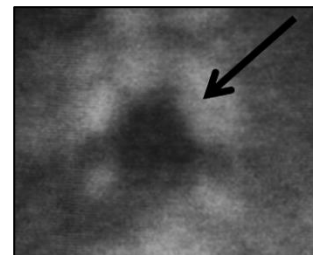
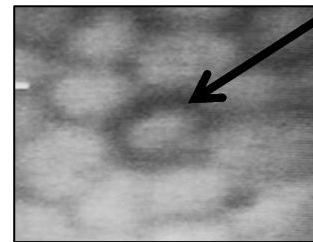


Figura 71: evoluzione di una cellula verso la necrosi.

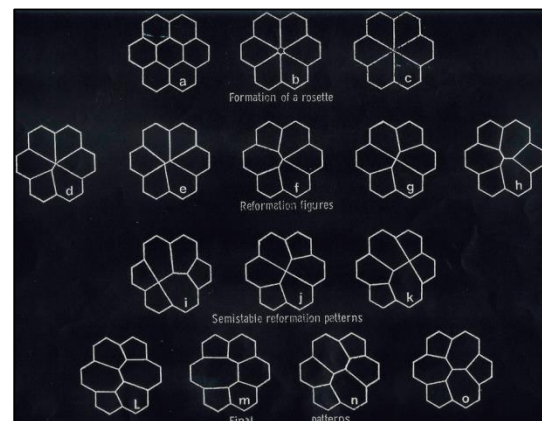
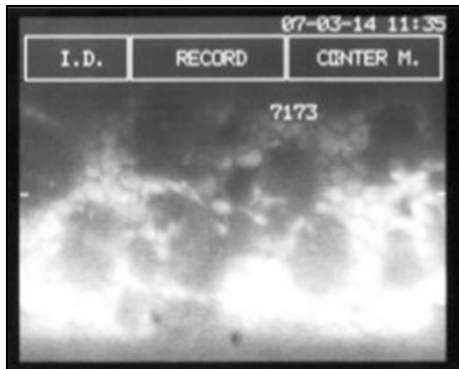


Figura 72: evoluzione delle cellule circostanti una cellula necrotica (da Steffen Sperling – per gentile concessione di Birte Olesen – Danish Cornea Bank).

Ampie chiazze scure rappresentano aree di necrosi cellulare massiva (**Figura 73**).



**Figura 73:** aree necrotiche.

## 3 Valutazione della cornea con il microscopio ottico

### 3.1 Fisica in pillole

Durante l'utilizzo del microscopio ottico, la luce può interagire con la materia nei seguenti modi:

- riflessione;
- rifrazione;
- diffrazione;
- assorbimento.

Quando la luce colpisce una superficie liscia e viene riflessa con angolo uguale, si ha la riflessione speculare. Se la superficie non è liscia, invece, la riflessione avviene secondo angoli casuali e abbiamo la riflessione diffusa.

La luce che attraversa mezzi con differenti indici di rifrazione è deviata dalla traiettoria rettilinea, a causa delle differenti velocità nei diversi mezzi. L'indice di rifrazione di un mezzo è il rapporto tra la velocità della luce nel vuoto e quella nel mezzo stesso.

La legge di Snell, nota anche come legge di Descartes o legge di Snell-Descartes, descrive le modalità di rifrazione di un raggio luminoso nella transizione tra due mezzi con indice di rifrazione diverso (Figura 74):

$$\frac{\sin \theta_1}{\sin \theta_2} = \frac{n_1}{n_2}$$

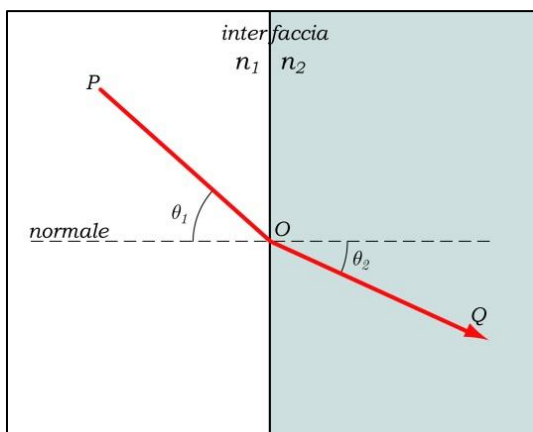


Figura 74: legge di Snell.

La luce che attraversa uno spigolo o una piccola parte di un oggetto viene diffusa per diffrazione, secondo l'equazione:

$$d = \frac{\lambda}{n \sin \alpha}$$

dove

d = dimensione lineare di un oggetto;

$\lambda$  = lunghezza d'onda della luce;

n = indice di rifrazione del mezzo;

$\alpha$  = angolo di diffrazione.

La luce che attraversa un oggetto trasparente ha ampiezza (intensità) ridotta rispetto alla luce che gli passa attorno. La differenza di intensità luminosa è percepita dall'occhio come contrasto. La maggior parte dei campioni biologici osservati in campo chiaro è trasparente. In questo caso il contrasto è creato mediante colorazione o tecniche di microscopia.

Più specificamente nel nostro campo: la luce viene deviata quando passa attraverso mezzi con diversi indici di rifrazione; le strutture fini producono raggi fortemente deviati; i campioni biologici sono trasparenti (non assorbono la luce) ed il loro scarso contrasto può essere aumentato otticamente.

### 3.2 Il microscopio ottico

Un oggetto avvicinato all'occhio appare più grande perché l'angolo di visione e la sua proiezione sulla retina aumentano (Figura 75).

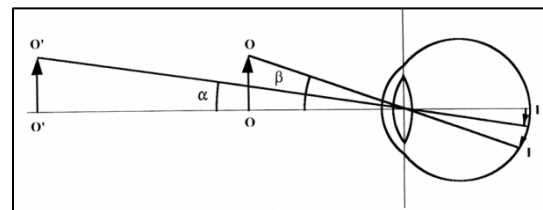
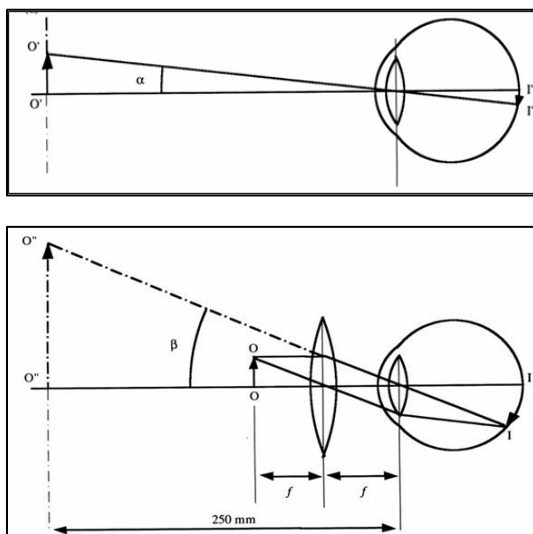


Figura 75: gli angoli  $\alpha$  e  $\beta$  sono esempi di angoli di visione di uno stesso oggetto posto a due differenti distanze dall'occhio.

I principali limiti per la percezione dei piccoli dettagli sono:

- l'occhio umano normale non mette a fuoco un oggetto posto a meno di 25cm (punto prossimo);
- se l'angolo di visione diventa molto piccolo (meno di un minuto di arco) due punti non appaiono separati, in quanto le loro immagini sulla retina non stimolano cellule retiniche distinte.

Se un oggetto è posto in prossimità del fuoco di una lente convessa, l'angolo di visione viene aumentato e l'oggetto appare più grande. In questo modo è possibile risolvere i piccoli dettagli dell'immagine ingrandita (**Figura 76**).



**Figura 76:** visione con una lente d'ingrandimento.

L'ingrandimento di una lente è il rapporto tra la tangente degli angoli  $\alpha$  e  $\beta$  ( $\tan \alpha : \tan \beta$ ). In pratica, l'ingrandimento può essere espresso come il rapporto tra il punto prossimo e la distanza focale della lente:

$$\text{Ingrandimento} = 25\text{cm} : \text{distanza focale [cm]}$$

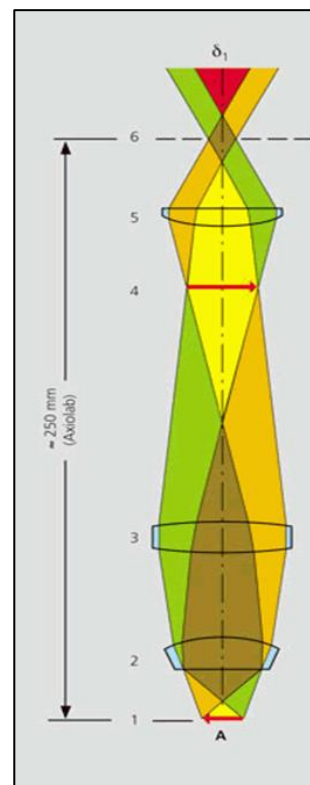
Con una singola lente convessa non è possibile ottenere un ingrandimento maggiore di 8-10x.

Se una lente singola non è sufficiente, varie lenti possono essere poste una dopo l'altra per costituire il microscopio composto.

Un tipico microscopio composto ingrandisce in due fasi (**Figura 77**):

- l'obiettivo (2) produce un'immagine ingrandita dell'oggetto (1) nel piano dell'immagine intermedia (4);
- l'oculare (5) ingrandisce l'immagine intermedia come una lente d'ingrandimento.

Nei microscopi moderni l'obiettivo con correzione all'infinito (ICS) proietta raggi paralleli a distanza infinita e l'immagine è formata da una lente intermedia (3).



**Figura 77:** sistema ottico di un microscopio composto.

I microscopi ICS presentano due vantaggi principali:

- la combinazione dell'obiettivo con la lente intermedia consente di eliminare la maggior parte delle aberrazioni;



- la messa a fuoco si effettua muovendo solo l'obiettivo, perché la distanza tra lente intermedia e obiettivo può essere variata senza problemi.

L'ingrandimento complessivo del microscopio è dato dalla formula:

$$M_{Microscopio} = M_{Obiettivo} \times M_{Oculare}$$

La risoluzione è la distanza minima alla quale due punti sono visualizzati come distinti.

$$d_0 = \frac{\lambda}{N.A.Obiettivo + N.A.Condensatore} = \frac{\lambda}{2N.A.}$$

dove

$d_0$  = limite di risoluzione;

$\lambda$  = lunghezza d'onda della luce;

N.A. = apertura numerica.

Un elevato ingrandimento che non sia accompagnato da una corrispondente risoluzione non è efficace. Il limite della risoluzione del microscopio ottico è  $0,2\mu\text{m}$ .

Per ottenere la massima risoluzione:

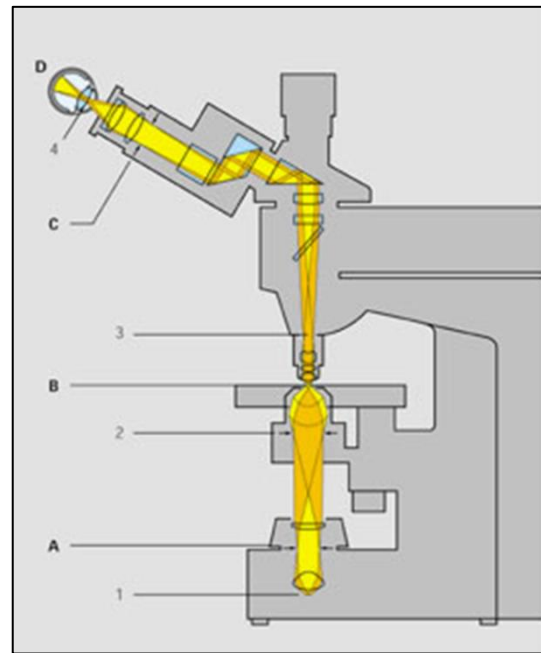
- l'obiettivo deve avere elevata N.A. per raccogliere il maggior numero di ordini di diffrazione;
- si deve usare la minima lunghezza d'onda possibile (la luce verde-azzurra o verde è il miglior compromesso tra visibilità e risoluzione).

### 3.3 Anatomia del microscopio ottico

I principali componenti del microscopio ottico sono (**Figura 78**):

- sorgente luminosa (1);
- condensatore (2);
- obiettivo (3);

- oculare (4).



**Figura 78:** spaccato di un microscopio ottico.

La sorgente luminosa può essere costituita da:

- un filamento al tungsteno, che permette uno spettro continuo di luce da 300 a 1500nm;
- una lampada alogena, caratterizzata da intensa luminosità (non si verifica annerimento del vetro).

Il condensatore concentra la luce sul preparato, con intensità costante su tutto il campo, e fornisce illuminazioni specifiche per il contrasto di fase, il campo oscuro o altro.

L'obiettivo raccoglie la luce dal campione e con la lente intermedia forma l'immagine sul piano intermedio. Determina la maggior parte dell'ingrandimento e della risoluzione del microscopio.

L'obiettivo è caratterizzato dal valore di apertura numerica (N.A.). Tale valore rappresenta la misura dell'angolo di luce coperto e costituisce un indice indiretto del potere risolutivo del microscopio (**Figura 79**).

$$N.A. = n \sin \alpha$$

dove

$n$  = indice di rifrazione del mezzo ( $n_{aria} = 1$ );

$\alpha$  = mezzo angolo di apertura dell'obiettivo.

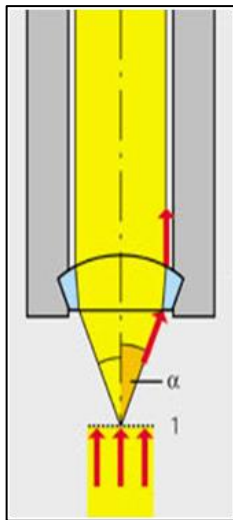


Figura 79: obiettivo ed apertura numerica.

Il valore del semiangolo di accettazione aumenta se si utilizzano liquidi di immersione, dello stesso indice di rifrazione del vetro, posti tra l'oggetto ed il vetrino.

La risoluzione massima si ottiene quando tutta la luce diffratta viene raccolta dall'obiettivo, ossia quando il diaframma del condensatore ha la stessa N.A. dell'obiettivo (Figura 80).

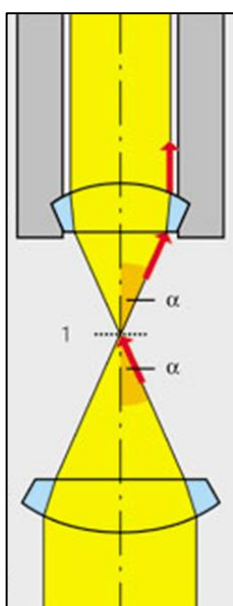


Figura 80: risoluzione massima.

Gli obiettivi riportano un codice cromatico per l'ingrandimento e per il tipo di liquido d'immersione impiegabile (Figura 81).

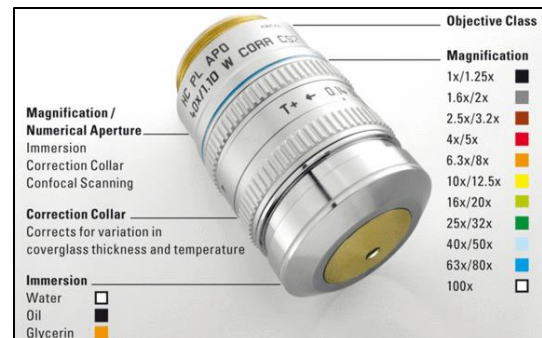


Figura 81: codice cromatico rappresentato sugli obiettivi.

L'oculare ingrandisce l'immagine intermedia formata dall'obiettivo e dalla lente intermedia, completa la correzione delle aberrazioni residue dell'immagine intermedia ed introduce reticoli o puntatori nel piano coniugato dell'immagine intermedia.

### 3.4 Fisiologia del microscopio ottico

L'immagine di un oggetto posto in un piano ottico viene proiettata in ciascun piano successivo della stessa serie:

- serie delle aperture → illuminazione;
- serie dei campi → immagine.

Le due serie sono completamente separate.

La comprensione di questi piani è importante per utilizzare un'appropriata illuminazione e per inserire reticoli o filtri nella giusta posizione:

SERIE DELLE APERTURE	SERIE DEI CAMPI
Filamento della lampada	
	Diaframma della lampada
Diaframma del condensatore	
	Piano del preparato
Piano focale posteriore dell'obiettivo	
	Piano dell'immagine intermedia
Pupilla dell'osservatore	
	Retina dell'osservatore

Una sorgente di luce omogenea viene proiettata direttamente dal condensatore sul piano del campione e successivamente sulla retina dell'occhio (secondo i piani coniugati).

La sorgente di luce deve essere larga e priva di struttura.

Nel 1893 August Köhler ha ideato una tecnica secondo la quale una lente colletttrice è posizionata di fronte alla lampada con il suo filamento situato vicino al punto di fuoco e proietta un'immagine del filamento sul piano del diaframma del condensatore. Quindi l'immagine del filamento della lampada non si troverà sulla retina dell'osservatore e l'obiettivo della lampada colletttrice apparirà come una fonte secondaria omogenea, proiettata sul piano del campione.

### 3.5 Patologia del microscopio ottico

Esistono due ordini di aberrazione delle lenti:

- di 1° ordine → cromatica e sferica;
- di 2° ordine → coma, astigmatismo e curvatura di campo.

Nell'aberrazione cromatica le lunghezze d'onda che compongono la luce bianca vengono rifratte con diverse angolazioni e non vengono messe a fuoco (Figura 82).

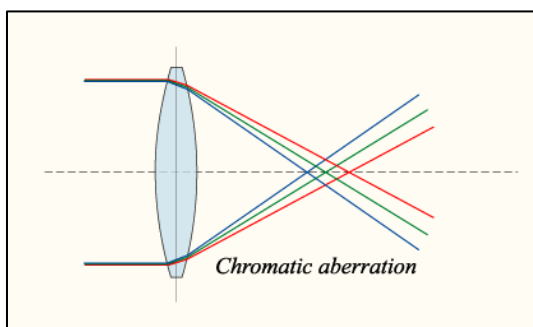


Figura 82: aberrazione cromatica.

L'immagine appare circondata da frange che variano di colore a seconda del punto di fuoco. Questa aberrazione viene corretta mediante la combinazione di lenti.

Nell'aberrazione sferica le onde luminose che passano alla periferia della lente vengono rifratte più di quelle che passano al centro: i fasci di luce non sono concentrati nello stesso punto e vi è una vasta zona di confusione (Figura 83).

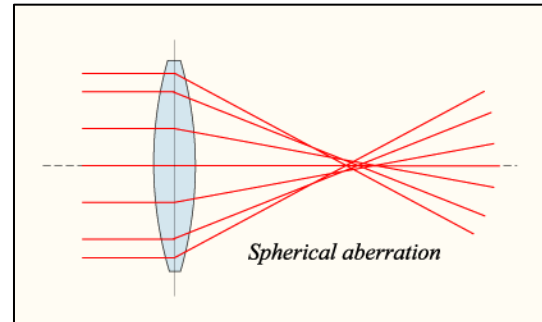


Figura 83: aberrazione sferica.

Coma deriva il suo nome dall'aspetto simile ad una cometa dell'immagine che subisce l'aberrazione. In generale, i punti che si trovano al di fuori dell'asse vengono proiettati come una sfocatura conica o a forma di cometa (Figura 84).

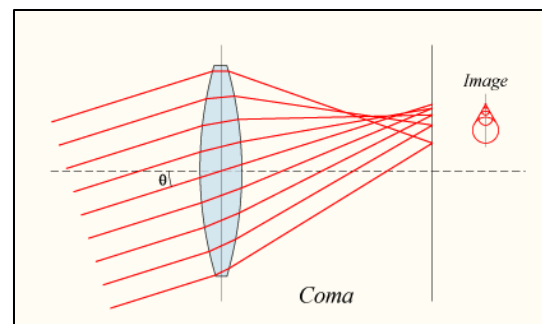


Figura 84: coma.

L'astigmatismo è simile all'aberrazione cromatica, ma dipende più fortemente l'obliquità del fascio luminoso.

Nella curvatura di campo il piano dell'immagine è curvo ed appare nitido al centro o ai bordi del campo visivo, ma non in entrambi. La curvatura di campo può costituire un serio problema per la microfotografia.

Gli obiettivi possono essere costruiti in maniera tale da correggere le aberrazioni descritte. Esistono, quindi, varie tipologie di obiettivi:

- acromatici, che presentano una correzione per l'aberrazione cromatica secondo due lunghezze d'onda (rosso e blu);
- semi-apocromatici, che presentano una migliore correzione del colore rispetto agli acromatici, permettono di avere una maggiore apertura numerica degli acromatici di pari ingrandimento, maggiore risoluzione ed un contrasto migliore;
- apocromatici, che presentano una correzione per l'aberrazione cromatica secondo tre lunghezze d'onda (rosso, blu e verde).

### 3.6 Miscellanea

Di seguito viene presentata una serie di figure rappresentative di anomalie tissutali che possono essere riscontrate ad un'analisi della cornea al microscopio ottico (Figure da 85 a 92).



Figura 85: endotelio normale.

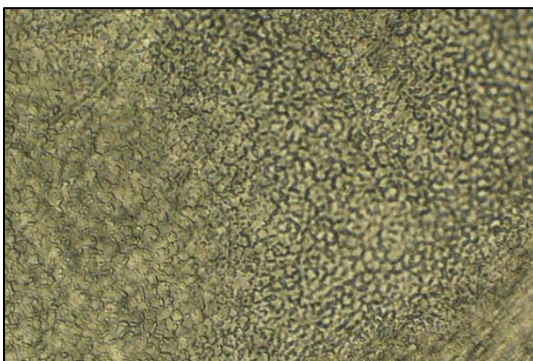


Figura 86: endotelio polimorfico (rosso alizarina).

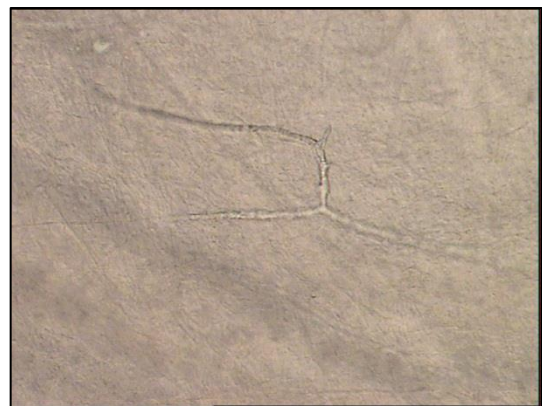


Figura 87: vascolarizzazione corneale.

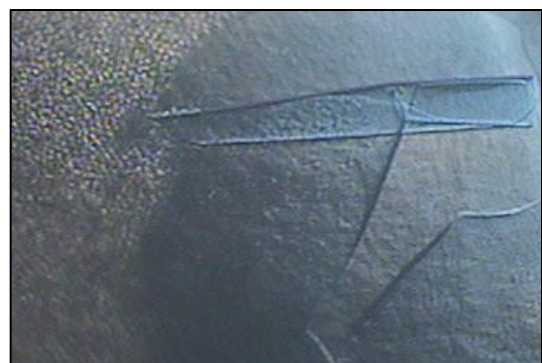
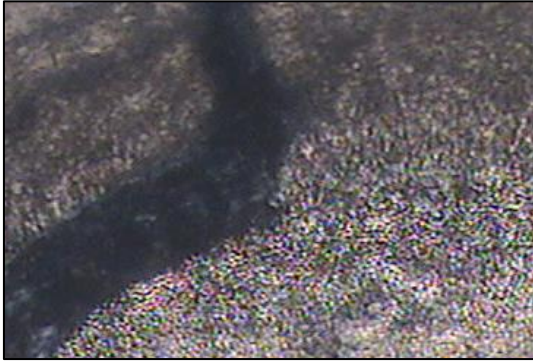


Figura 88: endotelio asportato (blu tripano).



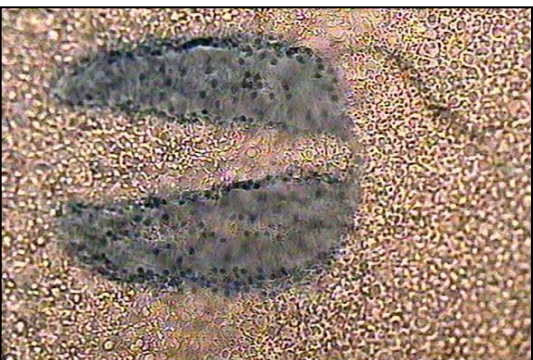
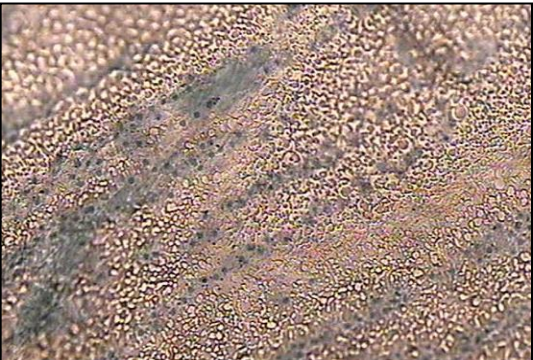
**Figura 91:** esito di corpo estraneo in zona ottica.



**Figura 89:** danni iatrogeni da prelievo (blu tripiano).



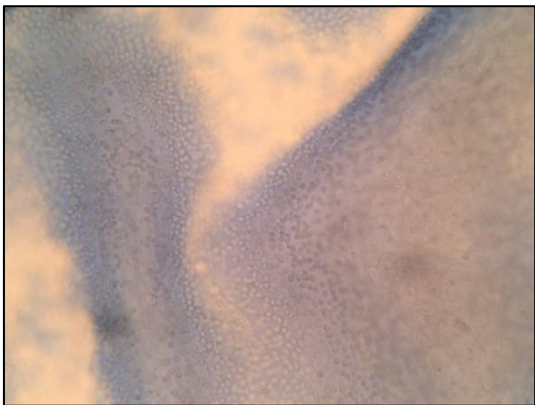
**Figura 92:** cicatrice corneale post-chirurgica.



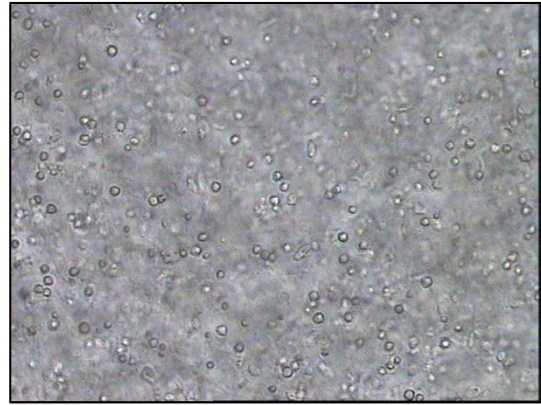
**Figura 90:** danni iatrogeni da prelievo (blu tripiano).



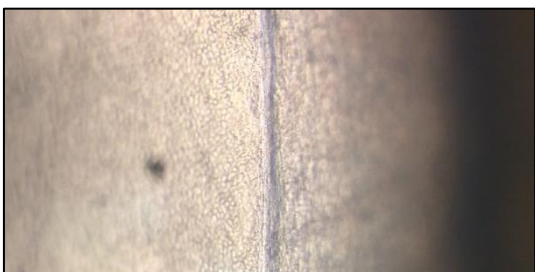
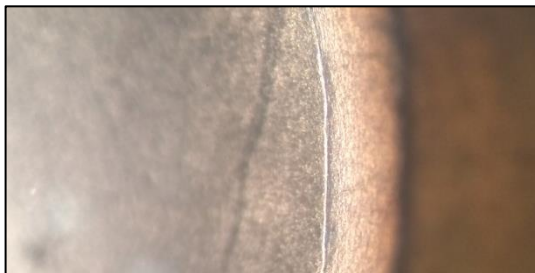
**Figura 93:** punto di sutura corneale residuo post-chirurgico.



**Figura 94:** diffusa e uniforme colorazione con blu tripano della cornea posteriore dopo coltura a 31°C (40×) [in alto]. Nel dettaglio (100×) [in basso] si apprezza totale assenza del fisiologico mosaico endoteliale con le cellule che appaiono degenerate in forma sferoidale.



**Figura 96:** contaminazione corneale da Acanthamoeba.



**Figura 95:** linea di Schwalbe prominente, anteriorizzata, all'interno della cornea trasparente su 360° (40×) [in alto]. Nel dettaglio (100×) [in basso] si riconosce la linea di Schwalbe perché limite dell'endotelio corneale (lato sinistro della foto).

## Indice delle figure

Figura 1: lampada a fessura. ....	4	Figura 20: la sezione ed il parallelepipedo permettono la classificazione delle pieghe della membrana di Descemet da ipotonia e trazione (lievi, medie e grossolane).....	9
Figura 2: valutazione del segmento anteriore alla lampada a fessura <i>in vivo</i> .....	4	Figura 21: la torsione della cornea durante l'escissione provoca profonde pieghe radiali e mortalità dell'endotelio. ....	9
Figura 3: valutazione della retina alla lampada a fessura <i>in vivo</i> . ....	4	Figura 22: evidenze di chirurgia della cataratta: cicatrice dell'incisione [in alto], punti di sutura singoli [in mezzo], tunnel corneale [in basso]. ....	9
Figura 4: valutazione della cornea alla lampada a fessura ("sezione istologica <i>in vivo</i> ") [in alto], sezione corneale: epitelio (1), membrana di Bowman (2), stroma (3), membrana di Descemet (4) ed endotelio (5) [in basso]. ....	4	Figura 23: illuminazione diretta a riflessione speculare della cornea. ....	10
Figura 5: schema generale di uno stereomicroscopio.....	5	Figura 24: endotelio corneale con evidenze di distrofia.....	10
Figura 6: oculari paralleli [in alto] e convergenti [in basso]. ....	5	Figura 25: illuminazione indiretta a retroilluminazione della cornea. ....	10
Figura 7: schema generale di un sistema di illuminazione [in alto] e della fessura prodotta [in basso]. ....	5	Figura 26: difetti epiteliali ed edema. ....	10
Figura 8: schema generale di supporto mobile. ....	6	Figura 27: illuminazione indiretta a scatter sclerotica della cornea. ....	11
Figura 9: flacone di trasporto per cornea su pinza ad agganci [in alto], camera per visualizzazione corneale su pinza ad agganci [in mezzo], flacone di trasporto per cornea su sostegno munito di specchio [in basso].....	6	Figura 28: cheratopatia da esposizione: disepitelizzazione, rigonfiamento ed opacizzazione dell'epitelio.....	11
Figura 10: sistema con pinze per sostegno ad agganci e specchietto. ....	6	Figura 29: rottura della membrana di Descemet. ....	11
Figura 11: tecniche di illuminazione applicate alla valutazione della cornea.....	7	Figura 30: leucoma.....	12
Figura 12: illuminazione diretta diffusa della cornea. ....	7	Figura 31: leucoma.....	12
Figura 13: vista anteriore – superficie, dimensione, forma e trasparenza corneale normali; anello sclerale di forma regolare e dimensione corretta ( $\geq 2\text{mm}$ ).....	7	Figura 32: termocheratoplastica (chirurgia refrattiva). ....	12
Figura 14: vista anteriore – superficie, dimensione e forma corneale normali, presenti alcune pieghe; anello sclerale di forma abbastanza regolare, ma dimensione non corretta ( $\leq 2\text{mm}$ ).....	7	Figura 33: cheratotomia radiale (chirurgia refrattiva). ....	12
Figura 15: vista anteriore – superficie, dimensione e forma corneale normali, diametro di trasparenza $< 8\text{mm}$ (gerontoxon); anello sclerale di forma abbastanza regolare, ma dimensione non corretta ( $\leq 2\text{mm}$ ). ....	7	Figura 34: pterigio. ....	12
Figura 16: vista anteriore – superficie, dimensione e forma corneale normali, presenti alcune pieghe; anello sclerale di forma irregolare e dimensione non corretta ( $\leq 2\text{mm}$ ); incisione in cornea chiara da prelievo. ....	8	Figura 35: presenza di ciglio. ....	12
Figura 17: vista anteriore in alto ed in mezzo, vista posteriore in basso – superficie normale, presenti alcune pieghe; anello sclerale abbastanza regolare, ma cornea indentata (distanza minima dal bordo sclerale $\leq 2\text{mm}$ ); colorazione giallognola dovuta alla presenza di residue di iodopovidone. ....	8	Figura 36: IOL, iride e corpo ciliare.....	13
Figura 18: illuminazione diretta focale della cornea. ....	8	Figura 37: pieghe da ipotono. ....	13
Figura 19: la sezione ed il parallelepipedo mettono in evidenza la dimensione e la profondità di leucomi, depositi e detriti. ....	8	Figura 38: presenza di iride in sede.....	13
		Figura 39: presenza di iride e cristallino. ....	13
		Figura 40: anello sclerale insufficiente.....	14
		Figura 41: sospetto melanoma.....	14
		Figura 42: bulbo con danno corneale da prelievo. ....	14
		Figura 43: corpo estraneo [in alto], esiti di corpo estraneo con opacità [in basso]. ....	14
		Figura 44: danno stromale da prelievo. ....	15
		Figura 45: erosione stromale al limbus. ....	15
		Figura 46: sospetta pigmentazione. ....	15
		Figura 47: strappo della membrana di Descemet. ....	15
		Figura 48: esito di perforazione corneale.....	15
		Figura 49: esito di chirurgia con punto in sede. ....	15
		Figura 50: edema a bolle.....	15
		Figura 51: prelievo senza sclera con punto in sede. ....	15
		Figura 52: luce incidente e riflessione speculare.....	16
		Figura 53: microscopio speculare.....	16
		Figura 54: posizionamento del flacone di trasporto.....	16
		Figura 55: corretto posizionamento della cornea all'interno del flacone di trasporto.....	17
		Figura 56: sistema di regolazione della centratura del campione da sottoporre ad analisi. ....	17

Figura 57: "Center Method". .....	17	Figura 95: linea di Schwalbe prominente, anteriorizzata, all'interno della cornea trasparente su 360° (40×) [in alto]. Nel dettaglio (100×) [in basso] si riconosce la linea di Schwalbe perché limite dell'endotelio corneale (lato sinistro della foto). .....	30
Figura 58: risultato dell'analisi. ....	17	Figura 96: contaminazione corneale da Acanthamoeba. ....	30
Figura 59: correlazione tra CD e CV (la freccia rossa indica la "direzione d'instabilità"). .....	18		
Figura 60: calcolo della pachimetria ottica con modalità manuale. ....	18		
Figura 61: cornea in ipotermia [in alto] ed a temperatura ambiente [in basso] a confronto. ....	19		
Figura 62: variazione dell'angolo di riflessione speculare nel caso di una superficie irregolare. ....	19		
Figura 63: margini cellulari. ....	19		
Figura 64: margini cellulari doppi tra cellule contigue. ....	20		
Figura 65: variazione della forma delle cellule. ....	20		
Figura 66: forma delle cellule a margherita. ....	20		
Figura 67: esempi di aree scure. ....	20		
Figura 68: aree bianche. ....	20		
Figura 69: aspetto delle gutte. ....	21		
Figura 70: aspetto delle pieghe. ....	21		
Figura 71: evoluzione di una cellula verso la necrosi. ....	21		
Figura 72: evoluzione delle cellule circostanti una cellula necrotica (da Steffen Sperling – per gentile concessione di Birte Olesen – Danish Cornea Bank). ....	21		
Figura 73: aree necrotiche. ....	22		
Figura 74: legge di Snell. ....	23		
Figura 75: gli angoli $\alpha$ e $\beta$ sono esempi di angoli di visione di uno stesso oggetto posto a due differenti distanze dall'occhio. ....	23		
Figura 76: visione con una lente d'ingrandimento. ....	24		
Figura 77: sistema ottico di un microscopio composto. ....	24		
Figura 78: spaccato di un microscopio ottico. ....	25		
Figura 79: obiettivo ed apertura numerica. ....	26		
Figura 80: risoluzione massima. ....	26		
Figura 81: codice cromatico rappresentato sugli obiettivi. ....	26		
Figura 82: aberrazione cromatica. ....	27		
Figura 83: aberrazione sferica. ....	27		
Figura 84: coma. ....	27		
Figura 85: endotelio normale. ....	28		
Figura 86: endotelio polimorfico (rosso alizarina). ....	28		
Figura 87: vascolarizzazione corneale. ....	28		
Figura 88: endotelio asportato (blu tripano). ....	28		
Figura 89: danni iatrogeni da prelievo (blu tripano). ....	29		
Figura 90: danni iatrogeni da prelievo (blu tripano). ....	29		
Figura 91: esito di corpo estraneo in zona ottica. ....	29		
Figura 92: cicatrice corneale post-chirurgica. ....	29		
Figura 93: punto di sutura corneale residuo post-chirurgico. ....	29		
Figura 94: diffusa e uniforme colorazione con blu tripano della cornea posteriore dopo coltura a 31°C (40×) [in alto]. Nel dettaglio (100×) [in basso] si apprezza totale assenza del fisiologico mosaico endoteliale con le cellule che appaiono degenerate in forma sferoidale. ....	30		