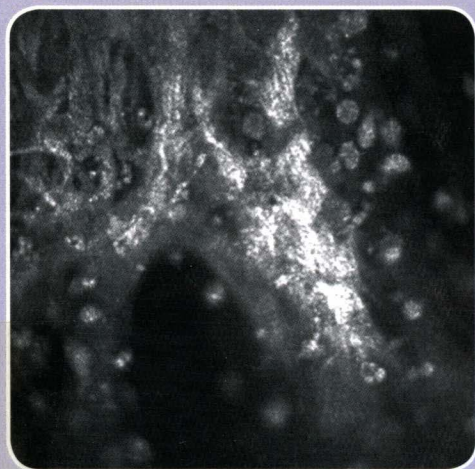
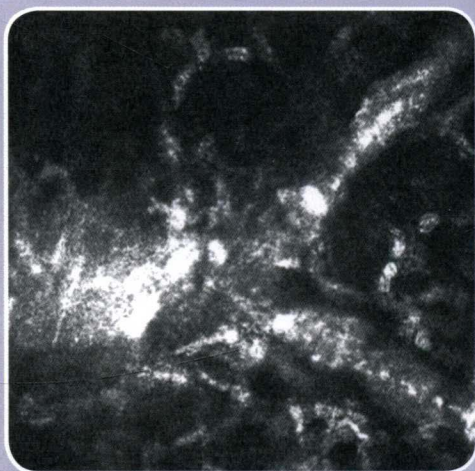
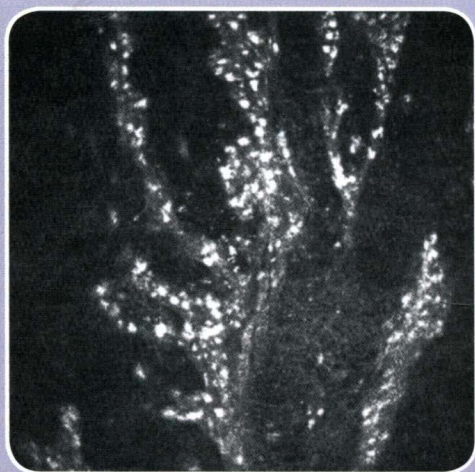


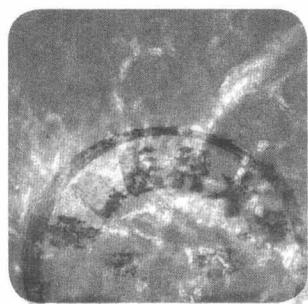
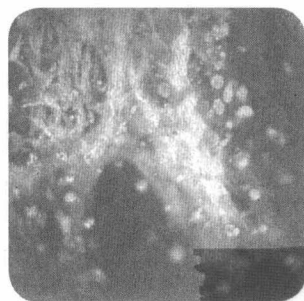
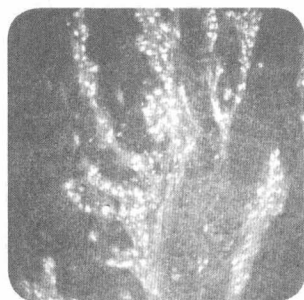
# 共焦显微镜 临床应用指南

主 编 黎 明 姚 晓 明



# 共焦显微镜 临床应用指南

主 编 黎 明 姚晓明  
副主编 于 莉 唐 松 何 静  
编 委 (按姓氏笔画排序)  
于 莉 马 枢 邓宏伟  
邢宝刚 刘桂琴 孙轶军  
何 静 应方微 张 醇  
钟华红 姚晓明 聂丹瑶  
唐 松 曹端荣 曾 琨  
赖铭莹 黎 明



人民卫生出版社

图书在版编目 ( CIP ) 数据

共焦显微镜临床应用指南 / 黎明, 姚晓明主编. —北京:  
人民卫生出版社, 2015

ISBN 978-7-117-20035-6

I. ①共… II. ①黎…②姚… III. ①共聚焦激光扫描  
显微镜 - 角膜疾病 - 诊疗 - 指南 IV. ①R772.2-62

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2014) 第 282107 号

人卫社官网	<a href="http://www.pmph.com">www.pmph.com</a>	出版物查询, 在线购书
人卫医学网	<a href="http://www.ipmph.com">www.ipmph.com</a>	医学考试辅导, 医学数 据库服务, 医学教育资 源, 大众健康资讯

版权所有, 侵权必究!

共焦显微镜临床应用指南

主 编: 黎 明 姚晓明

出版发行: 人民卫生出版社 ( 中继线 010-59780011 )

地 址: 北京市朝阳区潘家园南里 19 号

邮 编: 100021

E - mail: [pmph@pmph.com](mailto:pmph@pmph.com)

购书热线: 010-59787592 010-59787584 010-65264830

印 刷: 北京铭成印刷有限公司

经 销: 新华书店

开 本: 787 × 1092 1/16 印张: 8 插页: 6

字 数: 195 千字

版 次: 2015 年 2 月第 1 版 2015 年 2 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 978-7-117-20035-6/R · 20036

定 价: 49.00 元

打击盗版举报电话: 010-59787491 E-mail: [WQ@pmph.com](mailto:WQ@pmph.com)

( 凡属印装质量问题请与本社市场营销中心联系退换 )

## 主编简介

黎明,男,深圳市眼科医院角膜与眼表疾病科副主任医师。2000年进入中山大学中山眼科中心学习,攻读眼科硕士学位,其间接触到角膜共焦显微镜并与之结缘。毕业以后从事眼科临床工作,长期进行角膜共焦显微镜的相关临床研究。

在研究生期间参与了重组人表皮生长因子(rhEGF)滴眼液Ⅱ期临床试验及卫生部课题基金(961122)、广东省自然科学基金(960145)和广东省重点科技攻关项目(962205004)资助的系列科研。

毕业后多次参与深圳狮子会组织的防盲扶贫活动。2005年于SCI期刊*EYE*发表*Tear Function and Goblet Cell Density after Pterygium Excision*,在国内眼科杂志上发表论文30余篇。

参与的“角膜移植免疫排斥反应的系列防治研究”获2004年中华人民共和国教育部二等奖和2005年广东省科学技术三等奖。2009年获深圳市高层次人才奖励。



姚晓明,医学博士,毕业于广州暨南大学医学院,主任医师,深圳市政协委员,中国医师协会理事,成都爱迪眼科医院名誉院长,深圳市慈善会晓明眼库基金法人,深圳市医学会眼科专业委员会委员,深圳市红十字会器官捐献委员会执行主任,《中国实用眼科杂志》、《中华眼外伤职业眼病杂志》和《山东大学耳鼻喉眼学报》编委,斯里兰卡国际眼库(Sri Lanka International Eye Bank)国际荣誉顾问,美国国际复明眼库(International Sight Restoration Eye Bank)会员。

主编《眼库》、《现代眼库》、《手法无缝线小切口白内障手术》、《眼表移植学》,参编《眼表疾病学》、《实用眼表疾病学》、《现代角膜移植及角膜激光手术》、《角膜病基础理论与临床》、《实用眼科遗传学》和《实用眼科免疫学》等十余部学术著作。

推动我国首部器官捐献移植条例——《深圳经济特区人体器官捐赠移植条例》的立法,创立中国大陆第一个狮子会眼库。先后组织医疗队赴藏、疆、蒙、黔等国内大多数省、自治区以及缅甸、柬埔寨、尼泊尔、斯里兰卡等国为贫困白内障患者实施免费复明手术。获2013年度深港生活大奖“年度致敬人物”、深圳关爱行动10年“慈善楷模”、斯里兰卡眼捐献协会斯中友谊奖。



## 序

角膜病是常见的眼科疾病之一,严重的角膜病变也是导致失明的重要危险因素。从患病人群而言,角膜盲已经是我国排第二位的致盲性眼病,虽然角膜移植为角膜盲的复明提供了可能,但是供体材料的短缺,限制了移植手术的大范围开展。因此,如何有效地预防和及时治疗角膜病变,降低其持续发展而失明的风险,同样是临床医生应重点关注的方向。

以往的角膜病诊断更多依赖于病史、症状和体征的分析以及医生的个人经验,在诊断的正确性和可重复性方面存在较大偏差。近年来学科的发展为临床诊断提供了新的选择。角膜共焦显微镜作为基于光学检测平台的角膜分析设备,能够对角膜进行活体的组织学水平的观察,具有检查无创伤、可重复进行及患者依从度高等优点,从而为角膜病的早期诊断以及治疗提供更多的临床证据支持。

该书著者在国内较早引进并在临床应用角膜共焦显微镜进行角膜病的诊断和分析,经过数十年的临床实践,积累了大量典型病例和角膜共焦检查的影像资料,通过系统的归纳和周密的分析,将这些宝贵的临床经验整理成文,为角膜病的诊断和治疗提供了很好的学术参考。

我个人非常乐见该书的付梓成册,相信该书会成为广大医生诊断角膜病的良好助手,能为角膜病的诊断和眼科影像学的发展起到推动作用。

陈家祺

2014年10月15日

# 前 言

病理学一直被视为基础医学与临床医学之间的“桥梁学科”，它一直是许多临床疾病的诊断“金标准”。例如，真菌性角膜溃疡、阿米巴性角膜溃疡和细菌性角膜溃疡的临床表现相似，眼科医生往往根据经验作出病因诊断，即使采集标本病检，也常常因不同的病程和取材技术而导致不正确的结果。活体共焦显微镜的出现，颠覆了传统的病理诊断模式，使得临床医生可以在活体细胞水平直接观察人体角膜病变的发展和转归。借助于眼部组织的特殊结构和特性，活体共焦显微镜的直接病理诊断功能表现得淋漓尽致。它既可直接观察到角膜及其他眼表结构的细胞图像，免去传统的标本送检步骤，直接得到类似病理组织切片的诊断结果，还可任意选取疾病的某个时间段进行疾病的动态跟踪。除优化眼表疾病的诊治方案、重新定义一些眼表疾病的特征之外，共焦显微镜还有助于一些眼眶病、青光眼、白内障以及眼底病的诊断。虽然其成像效果受到角膜透明度及光源衰减的影响，但是随着技术的不断发展，它将越来越接近临床病理的检查结果。

作为眼科医生，我们在临床实践中对角膜共焦显微镜在眼表疾病的诊断和治疗方面的优越性深有体会，现将多年积累资料汇总，编撰成《共焦显微镜临床应用指南》一书，希望对眼科同道有微薄帮助，不足之处也望同道不吝指正。

在本书的编撰过程中，中山大学中山眼科中心的陈家祺教授、陈龙山教授、龚向明教授、已故林跃生教授给予热情指导，黎秀禄先生、黎伟先生、刘书琴女士和李占海先生给予鼎力支持，北京高视远望科技有限责任公司和深圳华明生物科技有限公司提供了珍贵的文献，在此一并表示感谢。

最后本书对以下朋友及长辈表示感谢（排名不分先后）：孙宁、方兰、王虹、颜志棋、周琦、陈维、赵跃宇、谢大明、王德成、毛玉芳、杨秀英、于海荣、于慧、于伟、汤进、涂睿、刘茁、胡波、张波、刘学军、马佳、何炯、朱萍、李刚、钟远伦、杜友怀、曹正江、王东川、叶意、王展峰、肖启国、张梅、孙明霞、宋书华、王敏华、范志刚、余新平、黄国富。

黎 明 姚晓明

2014年8月25日于深圳

# 目 录

第一章 共焦显微镜的光学原理及检查方法(应方微 黎明 何静 钟华红).....	1
第一节 共焦显微镜发展简史.....	1
第二节 共焦显微镜的基本光学原理.....	2
第三节 共焦显微镜检查的适应证和禁忌证.....	4
一、适应证.....	4
二、禁忌证.....	4
第四节 共焦显微镜检查的基本要求.....	4
一、对仪器的要求.....	4
二、对受检者的要求.....	5
三、对检查室的要求.....	5
第五节 共焦显微镜的类型和检查方法.....	5
一、检查设备.....	5
二、检查方法.....	6
三、两种共焦显微镜性能对比.....	7
第六节 正常角膜的共焦显微镜图像.....	9
一、中国人共焦显微镜数据.....	10
二、正常角膜的共焦显微镜图像.....	10
第二章 共焦显微镜与变态反应性结膜炎(邓宏伟 聂丹瑶).....	17
一、流行病学.....	17
二、病因和发病机制.....	18
三、临床表现及并发症.....	18
四、病理特点.....	18
五、实验室检查.....	18
六、共焦显微镜检查.....	19
七、治疗.....	21
八、预后.....	21
第三章 共焦显微镜与真菌性角膜炎(黎明 曹端荣).....	23
第一节 真菌性角膜炎的研究进展.....	23
一、真菌性角膜炎发病诱因的变迁.....	23
二、真菌性角膜炎发病机制.....	23

	三、真菌性角膜炎传统早期诊断方法	24
	四、共焦显微镜在真菌性角膜炎中的应用现状	24
第二节	真菌性角膜溃疡的共焦显微镜研究	25
	一、活体真菌溃疡菌丝及孢子的共焦显微镜图像	25
	二、培养真菌菌落涂片的共焦显微镜图像特点	27
第三节	真菌性角膜炎共焦显微镜检查时机的选择	28
	一、刮片前病灶中真菌的共焦显微镜图像特点	29
	二、刮片后溃疡病灶中真菌菌丝的共焦显微镜图像特点	29
	三、角膜刮片后共焦显微镜图像变化的原因	31
	四、真菌性角膜溃疡共焦显微镜检查的注意事项	31
第四节	非典型真菌性角膜溃疡的检查方法	32
	一、非典型真菌性角膜溃疡的一般特征	32
	二、暗视野显微镜检查	32
	三、非典型真菌性角膜溃疡的共焦显微镜检查	32
	四、暗场显微镜用于非典型真菌性角膜溃疡的诊断	34
第五节	共焦显微镜在真菌性眼内炎的应用研究	36
	一、真菌性眼内炎伴前房积脓的共焦显微镜图像特点	36
	二、激光角膜共焦显微镜检查注意事项	39
第四章	共焦显微镜与角膜移植(姚晓明 何静)	44
第一节	角膜移植的共焦显微镜特点	44
	一、板层角膜移植术	44
	二、穿透性角膜移植术	46
第二节	共焦显微镜对角膜移植术后排斥反应的观察	47
	一、植片排斥反应累及角膜上皮	47
	二、植片排斥反应累及角膜基质	47
	三、植片排斥反应累及角膜内皮	47
	四、内皮排斥反应与免疫细胞之间的关系	50
第五章	共焦显微镜与圆锥角膜(姚晓明 黎明)	56
	一、不同阶段圆锥角膜的共焦显微镜观察结果	56
	二、圆锥角膜的共焦显微镜分级	58
	三、圆锥角膜病理进展过程	58
第六章	共焦显微镜与眼睑重建术(刘桂琴 黎明)	60
第一节	硬腭黏膜的组织学结构	60
	一、硬腭黏膜移植片的切取方法	60
	二、硬腭黏膜的组织结构	60



第二节	新鲜硬膜黏膜片的共焦显微镜图像	61
第三节	移植后活体硬膜黏膜片共焦显微镜图像	63
	一、睑缘粘连分离术后第 1 天的共焦显微镜图像特点	63
	二、睑缘粘连分离术后 6 个月的共焦显微镜图像特点	64
第七章	共焦显微镜与角膜营养不良(黎明 姚晓明 马枢 孙轶军)	68
第一节	角膜营养不良累及角膜上皮	68
第二节	角膜营养不良累及前弹力层	69
第三节	角膜营养不良累及角膜基质	71
第四节	角膜营养不良累及角膜后弹力层	73
第五节	角膜营养不良累及角膜内皮层	74
第六节	格子状角膜营养不良的嗜神经现象	76
第八章	共焦显微镜与青光眼滤过手术(赖铭莹 曾琨)	80
第一节	青光眼术后滤过泡形成过程	81
	一、树突状细胞浸润	81
	二、滤过泡结膜上皮水肿	82
	三、积液暗区形成	83
	四、滤过泡形成	84
	五、瘢痕形成	85
	六、滤过泡瘢痕化	86
第二节	青光眼术后功能性及非功能性滤过泡形态特点	87
	一、I 型滤过泡	88
	二、II 型滤过泡	88
	三、III 型滤过泡	91
	四、IV 型滤过泡	91
第九章	共焦显微镜与硅油、重水、乳化重水(黎明 唐松)	95
第一节	共焦显微镜与硅油	95
第二节	共焦显微镜与乳化硅油	96
	一、乳化硅油的类型	96
	二、乳化硅油的分布方式	98
	三、乳化硅油滴损害角膜内皮的机制	98
第三节	共焦显微镜与重水小泡	99
第十章	共焦显微镜与虹膜(黎明 张醇 钟华红)	102
第一节	虹膜的组织学	102
第二节	粘连虹膜的共焦显微镜图像类型	103

第十一章	共焦显微镜与人工角膜(于莉 姚晓明).....	107
第一节	人工角膜的历史与现状.....	107
	一、人工角膜的设计和制作.....	107
	二、临床应用的人工角膜.....	108
	三、人工角膜的材料研究.....	108
	四、国内研发的人工角膜特点.....	110
第二节	共焦显微镜对人工角膜的观察.....	111
	一、多孔复合水凝胶人工角膜(PCPAH).....	111
	二、 $\beta$ -磷酸三钙-聚乙烯醇复合水凝胶人工角膜.....	112
第十二章	共焦显微镜其他临床应用(姚晓明 曹端荣 邢宝刚).....	116
第一节	其他感染性角膜炎的共聚焦显微镜检查.....	116
	一、棘阿米巴性角膜炎.....	116
	二、单纯疱疹病毒性角膜炎.....	117
	三、细菌感染性角膜炎.....	117
	四、角膜后沉着物(KP).....	117
第二节	非感染性疾病的共焦显微镜图像.....	118
	一、长期使用抗青光眼药物相关角膜病变.....	118
	二、糖尿病相关角膜病变.....	118

# 第一章 共焦显微镜的光学原理及检查方法

自 19 世纪中叶起,科学家们采用各种仪器对角膜的各层组织陆续开展研究。传统的光学显微镜和电子显微镜虽然可以对活体取材标本和尸体标本进行研究,却不能直接用于眼部结构的活体检查,因此在一定程度上降低了其临床应用价值。随着裂隙灯显微镜、角膜内皮镜和扫描激光检眼镜等检查仪器的先后问世,科学家对活体角膜组织结构的认识也越来越深入,人体角膜各层结构的研究也由传统的组织细胞病理学检查,发展到能直接对活体眼球组织结构进行成像和量化分析。对角膜的传统非侵入性检查主要依赖于裂隙灯和角膜内皮镜,但由于光学显微镜的低分辨率、低放大倍率以及角膜组织的低对比度等特性,仅能获得部分形态学的图像,无法进行病因学和组织病理学的综合分析<sup>[1]</sup>。因此,科学家们迫切需要一种同时兼备裂隙灯显微镜活体检查和类似电子显微镜高分辨双重功能的非侵入性仪器用于角膜疾病的活体研究。

## 第一节 共焦显微镜发展简史

1955 年, Minsky 首次发明了共焦显微镜。起初,共焦显微镜主要用于观察研究脑神经网络,并未应用于眼科<sup>[2]</sup>。此后,许多科学家在实践基础上不断改进设计,使共焦显微镜在眼科研究方面的应用范围不断扩展。1989 年, Cavanagh 等<sup>[3]</sup>采用共焦显微镜发现了角膜的独特结构。Cavanagh 认为,角膜具有透明特性,位于眼球最前面,可透过光线成像,便于直接检查,因此,他利用共焦显微镜的光学共焦切片功能观察活体人眼角膜,并于 1993 年首次报道了一名 52 岁正常人角膜的共焦显微镜检查图像<sup>[4]</sup>。此后,共焦显微镜在眼科的应用研究逐渐增多, Li 等<sup>[5]</sup>应用共焦显微镜对全角膜厚度和角膜亚层厚度进行测量, Mustonen<sup>[6]</sup>、 Patel 等<sup>[7]</sup>又对正常角膜各层细胞进行定性和定量分析。

1968 年, Petran 等发明了世界上第一台可直接实时观察角膜的共焦显微镜。它以绕轴心旋转的 Nipkow 盘为基础,可对薄层动物角膜切片直接进行体外观察和摄像<sup>[8]</sup>。1969 年, Egger 等首次报道了离体角膜上皮细胞、基质细胞核和内皮细胞的共焦显微镜观察结果<sup>[9]</sup>。但直到 1986 年, Lemp 在对 Petran 的共焦显微镜进行改进后,才将其直接应用于活体人眼角膜的研究<sup>[10]</sup>。此后, Lemp 与 Jester、Cavanagh 等合作,对兔角膜和活体人眼角膜进行了系列研究,并在 1993 年首次由 Cavanagh<sup>[3]</sup>报道了第一例人类活体角膜的共焦显微镜图像。共焦显微镜不仅能分辨上皮细胞层中的表皮细胞、翼状细胞和基底细胞,还可显示角膜中不同层次的神经形态和某些免疫细胞(如上皮下的 Langerhans 细胞等)的形态<sup>[11]</sup>。这一时期的共焦显微镜采用低比值的数值光圈,直接压平角膜进行观察和单像扫描。事实上,这种共焦显微镜并不是真正意义上的“实时”检查,且与角膜直接接触,也存在损伤角膜的可能性。

此后, Masters<sup>[12]</sup>构思了第一台应用于眼科临床的共焦显微镜,以 Nipkow 盘为基础,带

有实时放大图像的摄像机,同时记录检查结果。他采用较高比值的数值光圈显微镜,并在以后的设计中加入内部可调节焦距的组合物镜,但仍需在角膜表面进行静态观察,即固定工作距离,通过可变焦物镜进行物体深部不同层次的检查。在此后的一段时间内,Masters 致力于共焦显微镜在获取图像方面的改进。他用共焦平行扫描系统获取活体兔角膜的放大图像,通过微型计算机控制聚焦平面,用快速平行扫描降低受检者眼球转动的干扰,使得共焦显微镜对活体角膜的检查越来越简便易行。

1994年,Thaer和Masters<sup>[13]</sup>发明了第一台裂隙扫描共焦显微镜。这种新型的共焦显微镜以扫描和去扫描的两侧反光镜为基础,采用卤素灯照明系统,通过改变裂隙的宽度以最大限度地达到光学切片厚度和图像清晰度之间的平衡,扫描图像由实时摄像机同步记录。其比Nipkow盘为基础设计的共焦显微镜具有的更高光输出量,有助于获取活体人眼角膜基底细胞和其相邻的翼状细胞层的图像,这是共焦显微镜发明20余年来第一台实际意义上的“实时共焦显微镜”。

与其他类型共焦显微镜相比,裂隙扫描共焦显微镜高光输出量具有两个优势:一是受检者可耐受较长时间的检查并避免严重的眼部不适感觉,眼的光损伤相对减轻;二是可观察角膜组织中低反光层,从而探究正常人角膜的基底细胞层。一般情况下,传统的以Nipkow盘为基础的角膜共焦显微镜很难检测到活体人角膜的基底细胞层,而裂隙扫描共焦显微镜则可通过调节裂隙的宽度控制总光输出量和改变轴深扫描,根据活体角膜的透明度和厚度设置不同的扫描参数,获得角膜各层结构的细胞图像,包括基底细胞层。裂隙扫描共焦显微镜最重要的特性就是采用非组合的、长工作距离和高NA值的水浸式物镜,不仅可根据受检角膜的透明度控制所需的输出光量,还可调节被检平面的放大倍数和选择视野。

目前在临床使用的共焦显微镜主要有四种,即以Nipkow盘为基础的Tandem扫描共焦显微镜、单侧Nipkow盘共焦显微镜、裂隙扫描共焦显微镜和激光扫描共焦显微镜。激光的高强穿透性,使获得的图像更加清晰,而借助计算机的三维图形重建功能获取具有三维立体图像、分辨率高,甚至具有色彩的共焦显微镜图像已成为可能。已有活体染色角膜细胞研究的报道,使共焦显微镜的图像愈来愈接近于病理图像,可以预料,不久将会看到活体角膜的共焦显微镜“病理”图像。

近10年来,共焦显微镜被广泛地应用于各种角膜疾病的临床研究,如各种感染性角膜病的诊断和鉴别诊断<sup>[14-15]</sup>、圆锥角膜的组织形态学研究<sup>[16]</sup>、准分子激光切削术后角膜组织的细胞病理学改变<sup>[17]</sup>、相关虹膜、腭黏膜重建的睑板等组织。共焦显微镜具有渐进性光学切片功能,不用取材、固定和染色,甚至在角膜半透明状态下也可直接对活体角膜进行无损伤性组织形态学检查,从而成为在活体细胞水平观察人体角膜病变的发展和转归、监测临床治疗效果的重要手段。

## 第二节 共焦显微镜的基本光学原理

共焦显微镜具有常规显微镜所没有的共焦(confocal)特性,即仅允许处于焦平面上的薄层样品反光通过目镜被观察和记录,因此获得的是样品中一个薄层的图像(约 $10\mu\text{m}$ ),具有相当高的对比度和分辨率。

共焦显微镜的基本光学原理可用图1-1说明。共焦显微镜系统被精密调准,光源通过

光栅孔射出的光线,经物镜形成受衍射限制的光点,此光点照射位于物镜焦平面上的样品中的一点,由此点反射回来的光线再次通过物镜及其后的观察孔光栅被其后的探测器所探测,即可形成共焦显微镜图像。

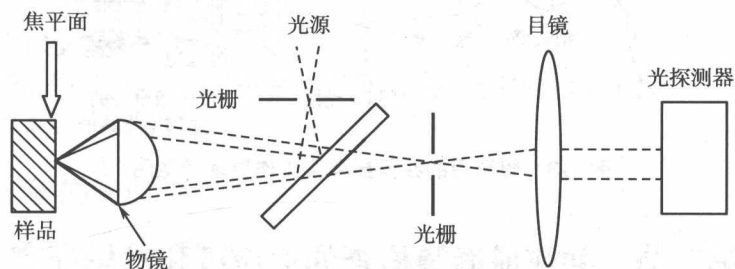


图 1-1 共焦显微镜光学成像示意图

图 1-1 显示,来自焦平面以外物体的反射光线不能被聚焦到观察孔的光栅里去,而被散焦到其孔光栅之外,使此孔光栅后面的探测器上的接收信号的幅值迅速地减小,而不能成像。这样,非焦平面的物像经过屏蔽后,获得的焦平面图像具有很好的对比度和很高的分辨率(图 1-2)。

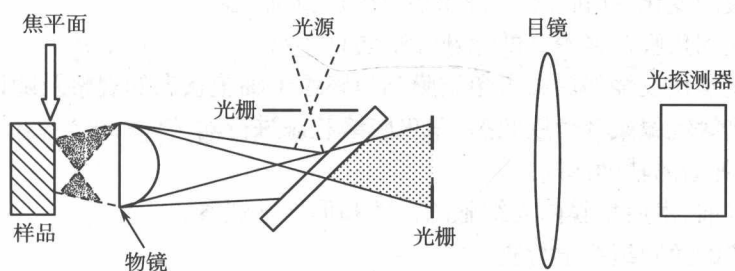


图 1-2 共焦显微镜非焦平面成像示意图

共焦显微镜较普通显微镜更适于生物组织的研究,因为它产生的图像不接收焦平面之外的光线,所以能消除用普通显微镜观察时非焦平面物像反光的干扰。另外,通过物镜的缓慢移动,能使共焦显微镜对扫描物体产生无损伤光学断层扫描作用,从而使得到的图像有类似病理切片的效果。

临床上应用的共焦显微镜视设计不同,通常有  $10\sim 26\mu\text{m}$  的景深,横向分辨率为  $1\sim 2\mu\text{m}$ ,由同一物镜同时完成点光源的聚焦和物像反射光的聚焦,并在光探测器后外接摄影机(图 1-3)。共焦显微镜通过点光源聚焦在所检查的平面,并由点探测器搜集同一平面的反射光线和散射光线,这样产生一个点扩散功能,通过改变光孔的直径控制扫描组织的横向分辨率( $x, y$ ),并通过改变光源聚焦深度,同时进行深度检查( $z$ 轴),因此可对狭窄区域内的组织细胞平面产生放大作用,并通过计算机扫描系统和成像系统,完成完整的成像分析及动态观察。共焦显微镜通过改变光孔的直径控制一定厚度物体横断面的分辨率( $x, y$ ),并随着光源聚焦层次的变化,同时进行深度检查( $z$ 轴),借助于计算机的即时成像功能(时间),从四维完成完整的视像分析和动态观察<sup>[34-35]</sup>。

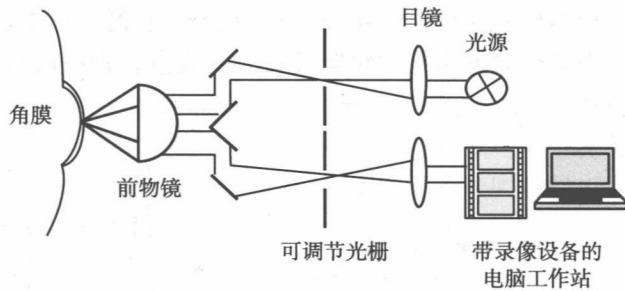


图 1-3 眼科用的共焦显微镜工作原理示意图

### 第三节 共焦显微镜检查的适应证和禁忌证<sup>[36]</sup>

#### 一、适应证

1. 感染性角膜疾病的快速无创性诊断及随诊。
2. 角膜移植术和角膜屈光手术的术前、术后定量检测,观察角膜各层细胞、组织结构和神经的愈合。
3. 观察泪膜的变化,评价干眼患者泪膜及角膜的状态。
4. 角膜变性和角膜营养不良的诊断及随访。
5. 对眼表化学伤及烧伤后患者角结膜和角膜缘干细胞状态的观察及随访。
6. 对角膜接触镜佩戴者角膜状态、角巩膜缘状态进行随访。
7. 角、结膜肿瘤的辅助诊断。
8. 白内障术前、术后角膜内皮细胞的计数和形态学观察。
9. 正常人群的角膜组织学检查。

#### 二、禁忌证

1. 血管系统和呼吸系统有器质性病变影响眼球活动者。
2. 眼球震颤,无固视能力者。
3. 对表面麻醉剂过敏者。
4. 各种先天性及后天性睑裂过小者。
5. 角膜溃疡变薄,濒于穿孔者,不宜强行做共焦显微镜检查,应该根据病情缓急而定。

### 第四节 共焦显微镜检查的基本要求

任何用于活体人眼检查的仪器以不构成受检者眼部损害为首要条件,因此,要求共焦显微镜与其他用于在体眼部检查的仪器一样,既需要仪器固有硬件上的配置,也需要受检者的合作。

#### 一、对仪器的要求

1. 合适的头部固定装置 防止受检者头部急速转动造成角膜擦伤。

2. 有效的散热措施 仪器过热可能造成受检者与仪器接触部位的灼伤。
3. 有限的暴露时间 受检者眼部在一定光强度下的暴露不能超过规定的光强度照射和暴露时间。
4. 照明系统的光波必须无光毒性效应。
5. 检查系统(物镜)和受检者角膜之间要保持一定的安全距离。
6. 较高的即时图像分辨率,可以避免因眼球转动造成的伪影干扰。
7. 图像具有良好的对比度。

## 二、对受检者的要求

1. 无心血管系统和呼吸系统器质性病变,或有器质性病变但对眼球活动影响轻微。
2. 严格遵守检查规程,被检眼角膜在表面麻醉下进行。
3. 有一定的注视功能,能够配合检查。

## 三、对检查室的要求

1. 光照强度稳定,避免对仪器光学干涉作用的影响。
2. 安静舒适,以减少对患者注意力的干扰。

# 第五节 共焦显微镜的类型和检查方法

常用的共焦显微镜有两种,即日本的 Confoscan 2.0, Model P3 和德国的 Heidelberg Rostock Cornea Module。

## 一、检查设备

1. 日本 Nidek 公司的卤素灯光源 Confoscan 共焦显微镜 (Confoscan 2.0, Model P3, Fortune Technologie Srl, Italy)

(1) 主要配置:12V/100W 的卤素光源和 IR(红外线)、UR(紫外线)滤光器;×40/0.75NA<sub>∞</sub>/0 水浸式物镜;CCD 照相机;高速数码同步摄像机;计算机系统;LCD 15" 显示器;NAVIS 软件系统。

(2) 主要参数:× 放大倍数为 1000;水浸式物镜的视野为 340 $\mu$ m × 255 $\mu$ m,景深 10 $\mu$ m,侧像分辨率是 1~2 $\mu$ m;物镜与角膜的距离为 2mm;扫描裂隙宽度固定为 0.28mm;扫描频率为 20Hz;每次扫描可获得 350 幅图像,每次曝光时间为 20 毫秒,每秒钟可得 25 幅图像;扫描厚度一般设置为 0.6mm。

2. 德国海德堡公司的角膜激光共焦显微镜 (Heidelberg Rostock Cornea Module, Heidelberg Engineering Inc, Germany)

(1) 主要配置:Rostock 角膜显微物镜、颞托和前额托适配器;眼球运动监视 CCD 摄像头;外部电子部件;LCD 15" 显示器;Heidelberg Eye Explorer、Heidelberg Eye Explorer License Manager、Heidelberg Retina Tomograph II Cornea Module 软件系统。

(2) 主要参数:Rostock 角膜显微物镜放大倍数为 ×800,内部含有一个 670nm 波长的激光源,它包含的角膜面积为 400 $\mu$ m × 400 $\mu$ m,二维图像的大小是 384 像素 × 384 像素。每

组三维图像由 40 个连续的等距离(间隔  $2\mu\text{m}$ )二维图像组成。检查前激光扫描摄像头的显微物镜的屈光度设定为 +12 度,焦点位置显示的深度值应该在  $-150\sim+150\mu\text{m}$  之间。

(3) 激光角膜共焦显微镜成像原理(图 1-4、图 1-5):

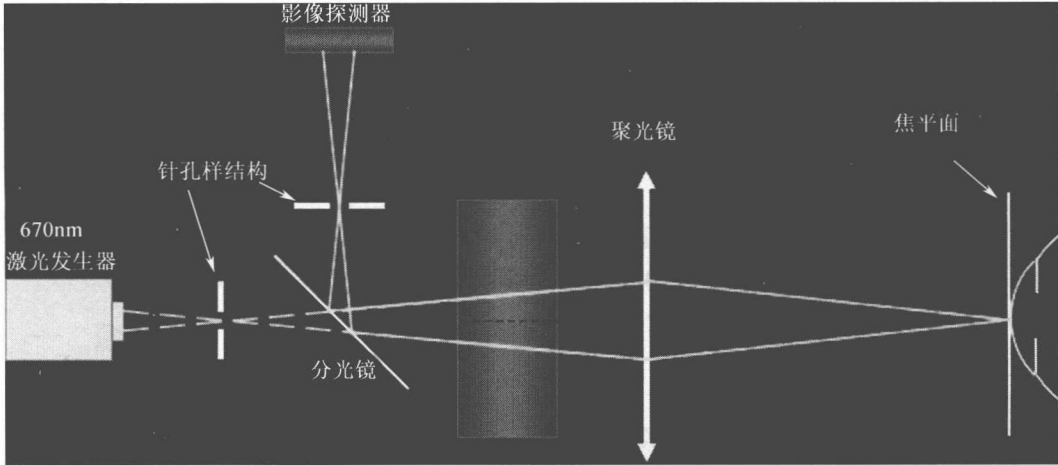


图 1-4 显示光源发出的激光经过一系列折射光路到达被检组织后部分被反射回来,其中来自于共焦平面的反射光可穿过针孔样的光栅结构被探测器接收(德国 Heidelberg Engineering Inc. 提供)

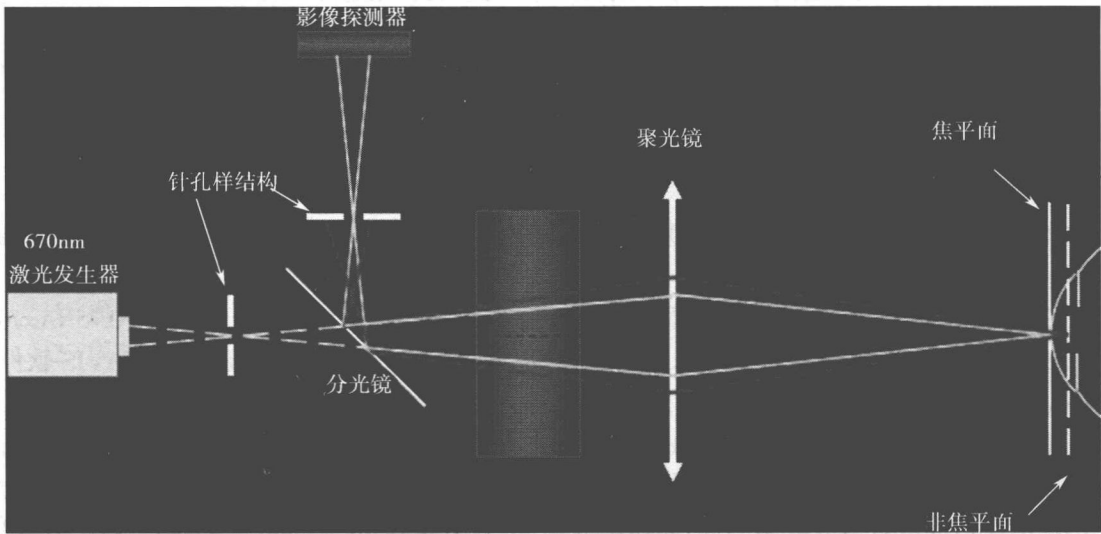


图 1-5 显示来自于非共焦平面的散射光则被针孔样的光栅结构阻挡,不能被探测器接收,从而保证了图像的高分辨率和高对比度(德国 Heidelberg Engineering Inc. 提供)

## 二、检查方法

患眼用 0.5% 爱尔凯因滴眼液(0.5%Alcaine, Alcon)滴眼 1 次,开睑器开睑,患者的下颌及前额固定在显微镜的检查托架上,以保持头正位。

1. 采用共焦显微镜(日本 Nidek 公司,ConfoScan2 型)时,在 40 倍水浸式圆锥状物镜(Achroplan 40/0.75 W)表面涂眼用凝胶(Viscotirs Gel, CIBA Vision Ophthalmics)或透明质酸



钠(天津晶明科技开发公司),开启计算机与摄像系统后,调节镜头,使表面的透明介质与角膜病变处接触,镜头与角膜前表面之间的距离为 1.98mm。进行检查,角膜各层的扫描图像可以通过液晶显示器同步显示,同时也可被摄像机自动记录。检查结束后慢放录像,仔细分析图像后,选定清晰有价值的图像存入计算机,经多媒体系统处理图像后,摄取照片,再转刻入 CD-ROM 保存。每帧图像,其有效的侧像分辨率为  $1\mu\text{m}$ ,景深为  $10\mu\text{m}$ ,视野范围为  $340\mu\text{m} \times 255\mu\text{m}$ 。

2. 采用德国海德堡公司的角膜激光共焦显微镜(Heidelberg Rostock Cornea Module)时,受检眼滴 0.5% 爱尔凯因 3 次;用蘸有丙酮的软棉签仔细清洁显微镜头前表面,在显微镜头前表面点一大滴凝胶物质或透明质酸钠,并确保其中不含气泡;从无菌包装中取出角膜接触帽,将其装在物镜头上;打开电源开关。受检者坐于检查台前,额头顶住额带,下颌靠稳下颌托,嘱受检者注视前方固定光点。调节 CCD 摄像头的位置,使 CCD 摄像头的光轴与激光扫描摄像头的光轴垂直。然后将激光扫描摄像头缓缓前移,直至受检者角膜与 Rostock 角膜接触帽之间的距离为 5~10mm,将激光扫描摄像头上下左右移动,直到角膜接触帽定位在角膜中心。嘱受检者尽量睁眼,慢慢将激光扫描摄像头相对移动,直至角膜接触帽接触其角膜。当显示器上出现角膜图像时,微调焦距,扫描角膜各层的图像,同时踩下记录按钮,记录所需图像,通过显示器筛选需要的图像并存盘。

### 三、两种共焦显微镜性能对比

两种共焦显微镜的性能对比见表 1-1。

表 1-1 目前临床应用的共焦显微镜相关性能比较表

	HRT3(HEIDELBERG)	Confoscan4(NIDEK)
光源	共焦激光	卤素灯
图像质量	由于采用共焦激光作为光源,角膜各层组织成像均非常清晰	除内皮细胞成像比较清晰外,其余各层组织成像质量均明显逊于前者,细胞几乎无法辨认
图像定位	监视摄像头照片与扫描图像是实时对应的,可以根据摄像头照片明确判断当前图像在角膜上所处的位置;由于设定了零焦平面,可以直接看出当前图像所处的深度	没有监视摄像头,无法得知所采集的图像在角膜上所处的位置;没有设定零焦平面,无法得知所采集的图像所处的深度
扫描方向	从上皮层表面向内皮层方向扫描,符合正常思维习惯	从内皮层向上皮层方向扫描
采集模式	具有 Section(单张采集)、Sequence(动态采集)、Volume(立体采集)三种采集模式	只可采集单张的图像,动态采集模式单一,不实用
接触方式	一次性无菌的角膜接触帽接触患者角膜,避免了交叉感染	镜头涂凝胶直接接触角膜,镜头需浸泡消毒灭菌,交叉感染的风险较大
外固视	有可移动的外固视灯,可根据需要检查的部位利用外固视灯引导患者转动眼位配合检查	没有外固视灯,无法引导患者转动眼位对所关注的部位进行靶向扫描

(应方微 黎明 何静)