

## ИМПРЕСИОННА ЦИТОЛОГИЯ НА ОЧНАТА ПОВЪРХНОСТ – КЛИНИЧНИ ПРИЛОЖЕНИЯ

Розалия Христова<sup>1</sup>, Георги Марков<sup>1</sup>, Яни Здравков<sup>1</sup>,  
Александрина Влахова<sup>2</sup>, Иван Танев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Клиника по очни болести, УМБАЛ „Александровска“, Медицински университет – София

<sup>2</sup>Клиника по обща и клинична патология, УМБАЛ „Александровска“,  
Медицински университет – София

## CLINICAL APPLICATION OF IMPRESSION CYTOLOGY

Rozaliya Hristova<sup>1</sup>, Georgi Markov<sup>1</sup>, Yani Zdravkov<sup>1</sup>, Alexandrina Vlahova<sup>2</sup>,  
Ivan Tanev<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, Alexandrovska University Hospital, Medical University-Sofia

<sup>2</sup>Department of General and Clinical Pathology, Alexandrovska University Hospital,  
Medical University-Sofia

### Адрес за кореспонденция:

Розалия Христова  
УМБАЛ „Александровска“  
ул. Св. Георги Софийски 1  
1431 София  
e-mail: alleta@abv.bg

### Address for correspondence:

Rozaliya Hristova  
Alexandrovska University Hospital  
1 Sv. Georgi Sofiyski St  
1431 Sofia  
e-mail: alleta@abv.bg

### РЕЗЮМЕ

**Въведение:** Импресионната цитология е алтернативен на ексцизионната биопсия минимално инвазивен метод за хистологично изследване на очната повърхност.

**Цел:** Да се определят настъпилите промени в проби импресионна цитология при пациенти със заболявания на очната повърхност и да се оценят диагностичните възможности на класическия метод, въведен от Ценг и сътр., и стандартни хистологични техники.

**Материали и методи:** Проведен бе анализ на импресионна цитология от 31 пациенти (36 очи) и 15 здрави контроли (30 очи), преминали през Клиниката по очни болести, УМБАЛ „Александровска“. Резултати: Изследваната атология на очната повърхност бе представена от инсуфициенция на лимбалните стволови клетки при 77.42% (n=24), като при 18 от тях тя бе асоциирана с невротрофична кератопатия. Оптичната кохерентна томография показва епителни дефекти в 80.65% (n=25), стромална хиперрефлексивност при всички пациенти и специфични изменения. Пробите, обработени по класическата методика на Ценг, демонстрираха хиперцелуларитет и характерна морфология на конюнктивните и роговични клетки. Наличието на PAS+ клетки в роговичния епител е белег за конюнктивализация, установен при 87.09% (n=27) от пациентите. В някои случаи бе наблюдавана кератинизация на епитела. Възпалителна инфилтрация бе открита при 67.74% (n=21) от изследваните пациенти, поради наличието на хиперцелуларитет преценката за типа клетъчна реакция е затруднена. Стандартните хистологични препарати демонстрираха хипоцелуларитет, многослоен плосък невроговяващ епител, като в 31.25% се наблюдаваха промени, характерни за регенераторни процеси. Клетъчната морфология при възпалителна реакция позволяваше определяне на клетките като лимфоцити или неутрофили.

**Заключение:** Изборът на метод за обработване на пробите трябва да бъде съобразен с изследваната патология, като е необходим индивидуализиран подход към всеки пациент за оптимални диагностични и терапевтични резултати.

**Ключови думи:** импресионна цитология, невротрофична кератопатия, очна повърхност

### ABSTRACT

**Introduction:** Impression cytology is an alternative to excisional biopsy minimally invasive method of histological examination of the ocular surface.

**Aim:** The purpose of this study was to determine changes in impression cytology samples of patients with ocular surface disease and to assess the diagnostic capabilities of the classical method introduced by Tseng et al. and standard histological techniques.

**Materials and Methods:** Analysis of 31 patients (36 eyes) and 15 healthy controls (30 eyes) from the Department of Ophthalmology, Alexandrovska University Hospital was conducted.

**Results and Discussion:** The pathology included mainly limbal stem cell deficiency in 77.42% (n=24) of the patients, 18 of whom had associated neurotrophic keratopathy. Optical coherence tomography demonstrated epithelial defects in 80.65% (n=25), stromal hyperreflectivity in all patients and specific changes. Samples processed using the classic method of Tseng et al., demonstrated hypercellularity and characteristic morphology of conjunctival and corneal cells. PAS+ cells in the corneal epithelium is a hallmark of conjunctivalization, which was present in 87.09% (n=27) of the patients. In some cases, the stratified squamous epithelium was keratinizing (keratinization). Inflammatory infiltration was found in 67.74% (n=21) of patients. However, due to hypercellularity the assessment of the reaction type was ambiguous. Standard histological samples demonstrated hypocellularity, stratified squamous non-keratinizing epithelium, and in 31.25% typical finds of regenerative processes were present. Cellular morphology in inflammatory reactions allowed defining the cells as lymphocytes or neutrophils.

**Conclusion:** The method of choice for processing the samples should be tailored to the investigated pathology and an individualized approach to every patient is required in order to obtain optimal diagnostic and therapeutic results.

**Keywords:** *impression cytology, neurotrophic keratopathy, ocular surface*

## ВЪВЕДЕНИЕ

С термина очна повърхност, въведен от Tseng и Tsubota (1), се обозначава епителният слой, покриващ предния сегмент на окото. Той включва два хистологично и физиологично различни видове епител – роговичен и конюнктивен. При различни повърхностни заболявания се наблюдават характерни промени в този епителен слой, основно метаплазия към порезистентния конюнктивен фенотип и дори кератинизация. Егберт и сътр. през 1977 г. (2) въвеждат импресионната цитология като алтернативен на ексцизионната биопсия минимално инвазивен метод за хистологично изследване на очната повърхност. Впоследствие той намира приложение при изследването на голям брой заболявания, включително плоскоклетъчна метаплазия (3), кератоконюнктивитис сика (4), дефицит на витамин А (5), атопия и вернален конюнктивит (6), аутоимунни заболявания като синдром на Стивънс-Джонсън и очен цикатризиращ пемфигоз (7), малигнени тумори – карцинома in situ и меланоми (8-10), трофични и дегенеративни процеси – инсуфициенция на лимбалните стволови клетки (11), периферен улцеративен кератит и други. Получените проби могат да се изследват чрез светлинна и електронна микроскопия и от тях може да се изолира ДНК за генетични изследвания (12). Методът се използва при диагностиката на повърхностни инфекциозни процеси, причинени от хламидия, акантамеба, херпес-вируси и аденовируси (13,14).

Цел на настоящото проучване бе да се определят настъпилите хистологични и биохимични промени в проби импресионна цитология при пациенти с възпалителни, туморни и дегенеративни заболявания на очната повърхност и да се оценят диагностичните възможности на класическия метод, въведен от Ценг и сътр. (3), и стандартни хистологични техники.

## INTRODUCTION

Tseng and Tsubota (1) introduced the term ocular surface to signify the epithelial layer covering the anterior segment of the eye. It comprises two histologically and physiologically different types of epithelium – corneal and conjunctival. The spectrum of ocular surface disease leads to typical changes in this layer – mainly metaplasia towards the more resilient conjunctival phenotype and even keratinization.

In 1977 Egbert et al. (2) introduced impression cytology, a minimally invasive method for histological examination of the ocular surface, as an alternative to excisional biopsy. Thereafter it was used in a number of pathologies, including squamous metaplasia (3), keratoconjunctivitis sicca (4), vitamin A deficiency (5), atopic and vernal conjunctivitis (6), autoimmune diseases, e.g. Stevens-Johnson syndrome and ocular cicatricial pemphigoid (7), malignant tumors - carcinoma in situ and melanoma (8-10), neurotrophic and degenerative conditions – limbal stem cell deficiency (LSCD) (11), peripheral ulcerative keratitis etc. The samples can be examined by light and electron microscopy, and DNA for genetic testing may be extracted, as well (12). The method is also used in the diagnosis of superficial infectious diseases, caused by chlamydia, acanthamoeba, herpetic viruses and adenoviruses (13,14).

## AIM

The purpose of this study was to determine the histological and biochemical changes in impression cytology samples in patients with metaplasia, inflammatory and degenerative ocular surface disease and to assess the diagnostic capabilities of the classical method introduced by Tseng et al. (3) and standard histological techniques.

## MATERIALS AND METHODS

This was a prospective observational study, approved by the Ethical Committee of Medical University Sofia (Resolution for Project № 8348/22.11.2018). Informed consent was obtained from all patients and the procedures were conducted in accordance with the tenets of the Declaration of Helsinki.

## МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Проведено бе проспективно обсервационно проучване, одобрено от етичната комисия при Медицински университет – София (Решение към Проект № 8348/22.11.2018 г.). От всички участници бе взето информирано съгласие и процедурите бяха проведени, спазвайки етичните стандарти на Хелзинкската декларация.

Проведен бе анализ на проби импресионна цитология от 31 пациенти (36 очи) на средна възраст 56.9 години, от 19 до 85, от които 13 мъже и 18 жени и 15 здрави контроли (30 очи), преминали през Клиниката по очни болести, УМБАЛ „Александровска“.

Проведени бяха рутинни офталмологични изследвания – зрителна острота, тонометрия, биомикроскопия, офталмоскопия. Оптична кохерентна томография на преден очен сегмент (AS-OCT) бе използвана за оценка на дефектите в епителния слой и стромалното засягане. За уточняване на клетъчните промени при всички пациенти бе проведена импресионна цитология с целулозоацетатни филтри с размер на порите 0.4 микрометра по утвърдената методика, описана от Ценг и сътр. При 16 от пациентите препаратите се обработиха допълнително по стандартни цитологични методи (Цитокolor и Папенхайм). Наблюдаваните промени бяха сравнени с проби от здрави доброволци без субективни оплаквания и без данни за заболявания на очната повърхност. Методиката включва поставяне на топикална анестезия, импресия в областта на розовицата с леко притискане на целулозоацетатния филтър, трансфер на получените клетки и фиксиране на филтъра във формалинов разтвор.

За визуализиране на тъканите под светлинна микроскопия бе използван класическият метод чрез маркиране с хематоксилин и еозин, Папаниколау и периодна киселина на Шиф (Periodic acid Schiff - PAS) директно върху целулозоацетатния филтър.

При цитологичната обработка бяха използвани стандартните техники с Цитокolor и Папенхайм върху материално стъкло след фиксиране (air-drying).

## РЕЗУЛТАТИ

При здравите контроли рутинните офталмологични изследвания не демонстрираха патология на очната повърхност.

Субективната симптоматика при пациентите със заболявания на очната повърхност включваше дразнене, съзене, дискомфорт, фоточувствителност, намаление на зрението.

Изследваната патология на очната повърхност бе основно представена от инсуфициенция на лимбалните стволкови клетки при 77.42% (n=24), като при 18 от тях тя бе асоциирана с невротрофична кератопатия. Други проучени заболявания включваха очна розацея, периферен улцеративен кератит, пterygium, плоскоклетъчна метаплазия и розовични дистрофии.

При всички пациенти се наблюдаваха хиперемия на конюнктивата, повърхностна и/или дълбока неоваскуларизация на розовицата, намалена розовична прозрачност, точковидно багрене с флуоресцеин (Фиг. 1А). При пациентите с невротрофична кератопатия се наблюдаваха розовични

Analysis of impression cytology samples from 31 patients (36 eyes) with mean age 56.9 years, range 19–85, of whom 13 males and 18 females and 15 healthy controls (30 eyes) from Alexandrovskia University Hospital was performed.

All subjects underwent routine ophthalmologic examination – visual acuity assessment, biomicroscopy and ophthalmoscopy. Anterior segment optical coherence tomography (AS-OCT) was used to assess the epithelial defects and stromal involvement. To study cellular changes impression cytology samples from all participants were collected using cellulose-acetate membrane filters with pore size 0.4 micrometers by the established technique of Tseng et al. In 16 of the patients the samples were additionally processed using standard cytology methods (Cytocolor and Papenheim). The samples were compared to healthy subjects without subjective symptoms and no ocular surface disease.

The procedure included instillation of topical anesthetic, impression on the corneal defect with gentle pressing of the filter, transfer of the sampled cells and inserting the filter in formalin solution.

To visualize the tissue under light microscopy the classic method with hematoxylin and eosin, Papanicolaou and Periodic acid-Schiff was used directly on the filter paper.

Standard cytology techniques include application of Cytocolor and Papenheim reagents directly on the glass slide after air-drying.

## RESULTS

Routine ophthalmic examination of healthy controls did not reveal any ocular surface pathology.

Patients with ocular surface disease had subjective complaints of irritation, tearing, discomfort, photosensitivity, decrease in vision.

Ocular surface pathology mainly included limbal stem cell deficiency in 77.42% (n=24), associated with neurotrophic keratopathy in 18 of these patients. Other ocular surface disorders (OSDs) included ocular rosacea, peripheral ulcerative keratitis, pterygium, squamous neoplasia and corneal dystrophies.

All patients demonstrated conjunctival hyperemia, superficial and/or deep corneal neovascularization, reduced corneal transparency, stippled fluorescein staining (Fig. 1A). Patients with NK had corneal ulcers with duration of more than 3 weeks with thickened round edges and a surrounding zone of epithelial weakness.

AS-OCT demonstrated epithelial defects in 80.65% (n=25) of the patients (Fig. 1B), stromal hyperreflectivity in all of the patients, some specific signs – loosely attached hyperplastic epithelium in ocular surface squamous neoplasia (OSSN), compact subepithelial fibrous tissue in pterygium, loss of palisades of Vogt in associated LSCD.

Samples processed using the classic method of Tseng demonstrated hypercellularity, conjunctival and corneal cellular morphology corresponding to previous data and specific to the pathology changes (Fig. 2A). Detection of PAS+ cells in the corneal epithelium is typical of conjunctivalization, which was present in 87.09% (n=27) of the patients. In 41.93% of the cases severe xerosis with stratified squamous keratinized epithelium metaplasia was demonstrated by the Papanicolaou stain (Fig. 3). Inflammatory infiltration was present in 67.74% (n=21) of the patients, but cellular details were not distinctive of the type of the reaction (neutrophilic, lymphocytic, etc.). In a patient with OSSN impression cytology demonstrated altered nuclear-cytoplasmic ratio, high numbers of nucleoli, diskarotosis with clusters

язви с дълбочина повече от 3 седмици, с подкопани ръбове и нестабилност на епителния слой около дефекта.

Оптичната кохерентна томография показва епителни дефекти в 80.65% (n=25) от пациентите (Фиг. 1Б), стромална хиперрефлексивност при всички пациенти, някои специфични изменения – хлабаво прикрепен хиперпластичен епител при плоскоклетъчна метаплазия на очната повърхност, плътна фиброзна тъкан субепително при формиран птерициум, заличаване на лимбалните палисади на Фогт при асоцииран дефицит на лимбалните стволови клетки.

Пробите, обработени по класическата методика на Ценг, демонстрираха хиперцелуларитет, морфология на конюнктивните и роговични клетки, съответстваща на описаната в литературата и типични за изследваната патология промени (Фиг. 2А). Наличие на PAS+ клетки в роговичния епител е белег за конюнктивализация, който бе установен при 87.09% (n=27) от изследваните пациенти. В 41.93% от случаите бе установена тежка ксероза на епитела с метаплазия към многослоен плосък врозоваващ епител (кератинизация), маркирана с реактива на Папаниколау (Фиг. 3). Възпалителна инфилтрация бе открита при 67.74% (n=21) от изследваните пациенти, като клетъчните детайли трудно позволяваха да се направи преценка за типа на реакцията (неутрофилна, лимфоцитна и т.н.). При проба от пациент с плоскоклетъчна метаплазия на очната повърхност (ocular surface squamous neoplasia – OSSN) импресионната

of metaplastic cells. Based on this result an incisional biopsy was performed and revealed carcinoma in situ.

Samples from deep ulcers with surrounding epithelial weakness and bullous keratopathy contained more cells from the basal layers without implication of consecutive impressions.

A disadvantage we found is the momentary transparency of the filter strip after transfer from xylene to mounting medium, which warranted repeated xylene use to visualize the cells without artefacts.

Standard histological samples processed using Cytochrome and Papenheim demonstrated predominant hypocellularity, typical stratified non-keratinized squamous epithelium (Fig. 2B). Sparse cylindrical cells were observed. A total of 31.25% of the samples demonstrated a regenerative state of the epithelium. Cellular morphology in inflammatory infiltration was detailed enough to determine the reaction as lymphocytic or neutrophilic. One sample demonstrated intracytoplasmic inclusions, typical of active herpetic infection (Fig. 4).

Normal distribution of corneal and conjunctival cells was present in all healthy controls. Corneal epithelium is squamous with low nuclear-cytoplasmic ratio. Conjunctival epithelium is cylindrical/cuboidal and presence of PAS+ cell rich in mucin is a characteristic find.

## DISCUSSION

Ocular surface diagnostic methods are of interest both for the scientific research field, as well as in the setting of clinical application.

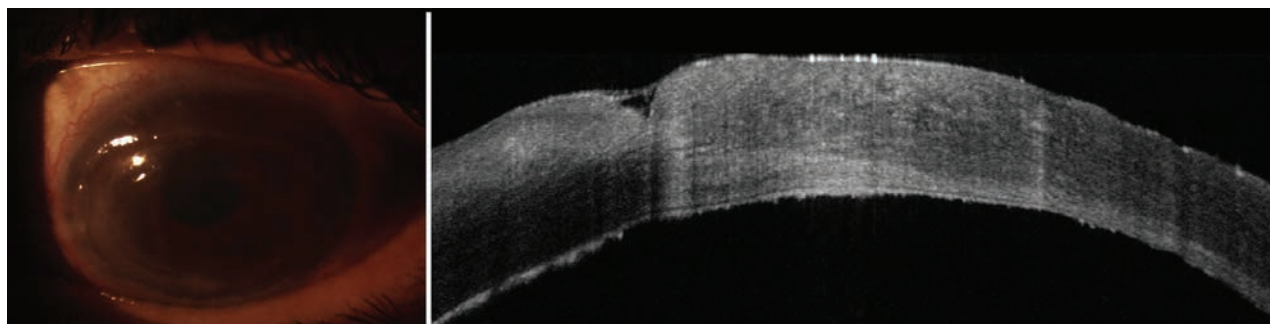


Fig. 1. A. Patient with neurotrophic keratopathy following chronic Alcaim abuse. B. AS-OCT in the same patient demonstrating extensive de-epithelization, moderate stromal hyperreflectivity and a stromal defect

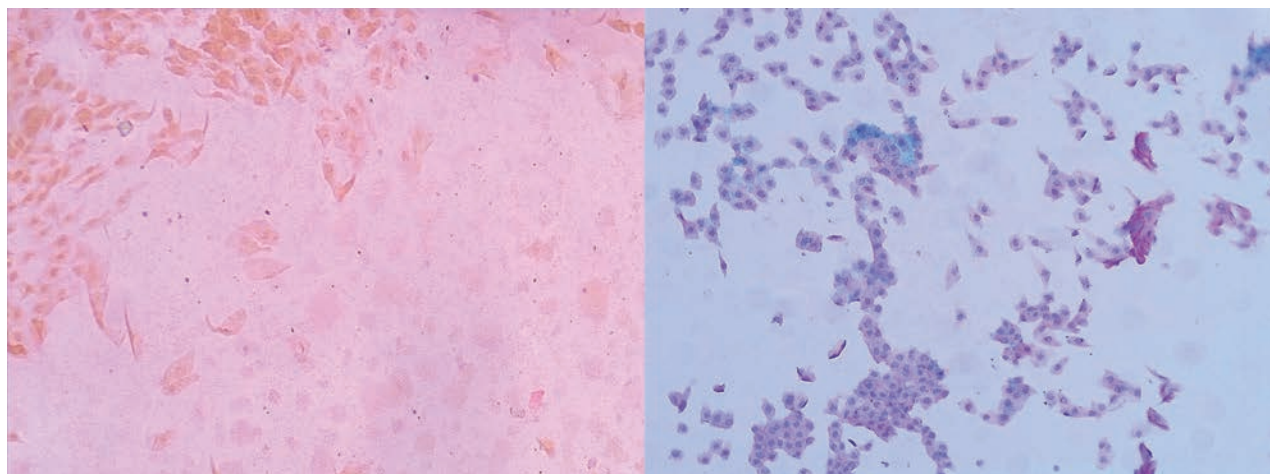


Fig. 2. A. Sample of a patient with neurotrophic keratopathy after herpes zoster processed using the method of Tseng et al., demonstrating keratinization and conjunctivalization. (PAP, PAS, x100). B. Sample from the same patient processed using cytological techniques (Cytochrome, x100)



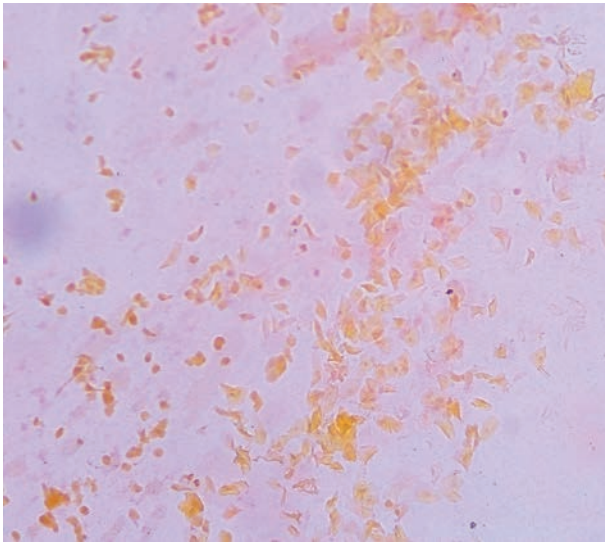


Fig. 3. Keratinization (PAP, x100)

цитология демонстрира изменено съотношение ядро-цитоплазма, множество нуклеоли, дискератоза с кластери от метаплазирани клетки. На базата на получения резултат се проведе инцизионна биопсия, която демонстрира карцинома ин ситу.

При наличие на дълбока язва с епителна нестабилност и булозна кератопатия целулозацетатният филтър бе директно натоварен с клетки от базалните слоеве, без да е необходимо прилагането на консекутивни импреси.

Недостатък на методиката, който бе установен, е краткотрайното опрозрачаване на филтърната лента след поставяне в ксилен и фиксиране в хистологичен препарат, налагащо повторно третиране с ксилен за визуализация на клетки без артефакти.

Стандартните хистологични препарати, маркирани с Цитокolor и Папенхайм демонстрираха по-често хипоцелуларитет, типична находка за многослоен плосък невроговаещ епител (Фиг. 2Б). Наблюдавани бяха единични цилиндрични клетки. В 31.25% се наблюдаваха промени, характерни за регенераторни процеси в епитела. Клетъчната морфология при възпалителна реакция позволяваше определяне на клетките като лимфоцити или неутрофили. В един от препаратите бяха наблюдавани интрацитоплазмени включвания, характерни за активна херпетична инфекция (Фиг. 4).

При изследваните здрави доброволци се наблюдава нормално разпределение на конюнктивни и роговични клетки. Морфологично роговичният епител е плосък с ниско нуклеоцитоплазмено отношение. Конюнктивният епител е цилиндричен/кубичен с наличие на PAS+ клетки, натоварени с муцин.

## ДИСКУСИЯ

Диагностиката на очната повърхност представлява интерес както с научно-теоретична насоченост, така и в приложно-клиничен аспект.

Напредъкът във възможностите за изобразяване на преден очен сегмент чрез оптична кохерентна томография дава

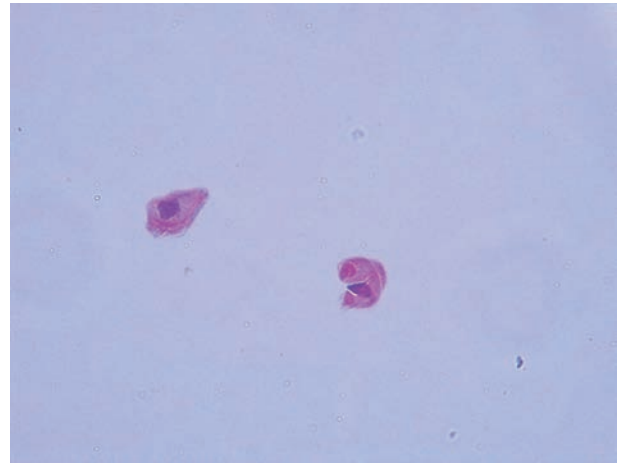


Fig. 4. Cytoplasmic inclusions typical of herpetic virus infection (Cytocolor, x200)

Advances in anterior segment imaging using optical coherence tomography create the opportunity to assess the presence of destructive, bullous or hyperplastic changes in the epithelium (15). Stromal hyperreflectivity was observed in all patients, regardless of the overlying layers' condition. This may signify keratocytes migration and inflammatory infiltration as a result of epithelial changes or as a primary focus of damage with secondary superficial impairment (16). One disadvantage of AS-OCT is lacking the resolution to visualize single cells.

Impression cytology is alternative to conventional biopsy, which even though is not diagnostically equivalent, carries information about alterations in the ocular surface and is irreplaceable as an ancillary diagnostic method.

Advantages of the classical method, described by Tseng et al. is the detection of PAS+ cells in corneal epithelium, which was often found as a marker of conjunctivalization, as well as areas of keratinization stained with Papanicolaou. Conjunctivalization was typical in LSCD, but was also present in other conditions (ocular rosacea, pterygium), which may influence therapeutic strategies.

Samples from deep ulcers with epithelial weakness and bullous keratopathy were hypercellular and mounted with cells from the deep epithelial layers, which is probably due to damaged intercellular contact with loss of hemidesmosomes as a result of excessive volume of fluid in the intercellular space (17).

Disadvantages were the inability to determine the inflammatory reaction as neutrophilic or lymphocytic, as well as the momentary transparency of the filter strip after transfer from xylene to mounting medium, which warranted repeated xylene use.

Standard cytological techniques using Cytocolor and Papanheim demonstrated better specificity as to the type of inflammatory cells. Impression cytology samples processed in this manner demonstrated frequent hypocellularity and obvious regenerative processes in the epithelium. The cytoplasmic inclusions observed in one patient pointed to active herpetic virus infection, which was etiologically treated. These standard cytological techniques using Cytocolor and Papanheim were applied successfully for the first time to impression cytology samples.

Of distinct diagnostic value was the result obtained from the patient with OSSN, based on which a successful medical treatment with cytostatic drugs was conducted.

Възможност да се оцени наличието на деструктивни, булозни или хиперпластични изменения в епителния слой (15). Визуализира се стромална хиперрефлексивност при всички изследвани пациенти, независимо от състоянието на надлежащите слоеве. Това може да се дължи на концентрация на кератоцитите и възпалителна инфилтрация като реакция на настъпилите промени в епитела или първична увреда на стромата, която води до вторично засягане на епителните клетки (16). Недостатък на методиката е невъзможността за визуализиране на отделни клетки.

Импесионната цитология е алтернативен метод на биопсията, който, макар да не е със същата диагностична стойност, дава информация за протичащите процеси в очната повърхност и е незаменим като допълнителен диагностичен метод.

Предимствата на класическата методика, описана от Ценг и сътр., е информацията за ПАС+ клетки в розовичната повърхност, което бе често установяван белег за конюнктивализация на розовичния епител, както и наличието на багрещи се по Папаниколу зони на кератинизация. Конюнктивализация се откри при всички пациенти с лимбална ственовоклетъчна инсуфициенция, но и при някои други заболявания (очна розацея, птеригиум), което може да има отношение към терапевтичното поведение.

При наличие на дълбоки язви с епителна нестабилност и булозна кератопатия пробите бяха хиперцелуларни и обхващаха базалните слоеве на епитела, което вероятно се дължи на нарушени междуклетъчни контакти с разрушаване на хемидесмосомите между епителните клетки, вследствие на екцесивното натрупване на течност в междуклетъчните пространства (17).

Недостатък на методиката е невъзможността за определяне на възпалителната инфилтрация като неутрофилна или лимфоцитна, както и нетрайното опрозрачаване на филтъра след фиксиране в хистологичен препарат, налагащо повторно третиране с киселин.

Стандартните цитологични техники с Цитоколор и Папенхайм са с по-висока чувствителност спрямо вида на възпалителните клетки. Пробите от импесионна цитология, обработени по този метод, демонстрираха по-често хипоцелуларитет и ясна визуализация на протичащи регенераторни процеси в епитела. Установените интрацитоплазматични включвания при един от случаите насочиха към активна херпес вирусна инфекция, за която бе проведена етиологична терапия. Именно стандартните цитологични техники с Цитоколор и Папенхайм за първи път се прилагат успешно върху проби от импесионна цитология.

С особена диагностична стойност бе резултатът от проведената импесионна цитология при пациент с карцинома ин ситу, на базата на който успешно бе проведена терапия с цитостатик.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Импесионната цитология е достъпен неинвазивен метод за диагностика на заболявания на очната повърхност, допринасящ за по-точно разпознаване на протичащите патологични процеси. Изборът на метод за обработване на

## CONCLUSION

Impression cytology is an accessible non-invasive method for ocular surface disease diagnosis, which contributes to more accurate knowledge of the pathological processes involved. The method of choice for processing the samples should be tailored to the investigated pathology and an individualized approach to every patient is required in order to obtain optimal diagnostic and therapeutic results.

## REFERENCES

1. Tseng SCG, Tsubota K. Important concepts for treating ocular surface and tear disorders. *Am J Ophthalmol*. 1997;124(6):825-35. doi: 10.1016/s0002-9394(14)71700-3.
2. Egbert PR, Lauber S, Maurice DM. A simple conjunctival biopsy. *Am J Ophthalmol*. 1977;84(6):798-801. doi: 10.1016/0002-9394(77)90499-8.
3. Tseng SCG. Staging of conjunctival squamous metaplasia by impression cytology. *Ophthalmology*. 1985;92(6):728-33. doi: 10.1016/s0161-6420(85)33967-2.
4. Marner K. Snake-like appearance of nuclear chromatin in conjunctival epithelial cells from patients with keratoconjunctivitis sicca. *Acta Ophthalmol (Copenh)*. 1980;58(5):849-53. doi: 10.1111/j.1755-3768.1980.tb06700.x.
5. Wittpen JR, Tseng SC, Sommer A. Detection of early xerophthalmia by impression cytology. *Arch Ophthalmol*. 1996;104(2):237-9. doi: 10.1001/archoph.1986.01050140091027.
6. Aragona P, Romeo G, Puzolo D, Micali A, Ferreri G. Impression cytology of the conjunctival epithelium in patients with vernal conjunctivitis. *Eye*. 1996;10(Pt 1):82-5. doi: 10.1038/eye.1996.12.
7. Nelson JD. Ocular surface impression using a cellulose acetate filter material. *Arch Ophthalmol*. 1982;27(1):67-9. doi: 10.1016/0039-6257(82)90115-1.
8. Tseng SH, Chen YT, Huang FC, Jin YT. Seborrhic keratosis of the conjunctiva simulating a malignant melanoma. An immunocytochemical study with impression cytology. *Ophthalmology*. 1999;106(8):1516-20. doi: 10.1016/S0161-6420(99)90446-3.
9. Nolan GR, Hirst LW, Wright RG, Bancroft BJ. Application of impression cytology to the diagnosis of conjunctival neoplasm. *Diagn Cytopathol*. 1994;11(3):246-9. doi: 10.1002/dc.2840110310.
10. Paridaens ADA, McCatney ACE, Curlin OM, Lyons CJ, Hungerford JL. Impression cytology of conjunctival melanosis. *Br J Ophthalmol*. 1992;76(4):198-201. doi: 10.1136/bjo.76.4.198.
11. Puangsricharern V, Tseng SC. Cytologic evidence of corneal diseases with limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology*. 1995;102(10):1476-85. doi: 10.1016/s0161-6420(95)30842-1.
12. Corrales RM, Calonge M, Herreras JM, Saez V, Chaves FJ. Human epithelium from conjunctival impression cytology expresses MUC7 mucin gene. *Cornea*. 2003;22(7):665-71. doi: 10.1097/00003226-200310000-00010.
13. Sawada Y, Yuan C, Huang AJ. Impression cytology in the diagnosis of acanthamoeba keratitis with surface involvement. *Am J Ophthalmol*. 2004;137(2):328-8. doi: 10.1016/j.ajo.2003.09.019.
14. Thiel MA, Bossart W, Bernauer W. Improved impression cytology techniques for the immunopathological diagnosis of superficial viral infections. *Br J Ophthalmol*. 1997;81(11):984-8. doi: 10.1136/bjo.81.11.984.
15. Shousha MA, Karp CL, Canto AP, Hodson K, Oellers P, Kao AA, et al. Diagnosis of ocular surface lesions using ultra-high-resolution

пробите трябва да бъде съобразен с изследваната патология, като е необходим индивидуализиран подход към всеки пациент за оптимални диагностични и терапевтични резултати.

---

- optical coherence tomography. *Ophthalmol.* 2013; 120(5):883-91. doi: 10.1016/j.ophtha.2012.10.025.
16. Venkateswaran N, Galor A, Wang J, Karp CL. Optical coherence tomography for ocular surface and corneal diseases: a review. *Eye Vis (Lond)*. 2018;5:13. doi: 10.1186/s40662-018-0107-0.
17. Uchino Y, Goto E, Takano Y, Dogru M, Shinozaki N, Shimmura S, et al. Long-standing bullous keratopathy is associated with peripheral conjunctivalization and limbal deficiency. *Ophthalmology*. 2006;113(7):1098-101. doi: 10.1016/j.ophtha.2006.01.034.