

## Il laboratorio nella diagnosi delle congiuntiviti allergiche

Andrea Leonardi

Dipartimento di Neuroscienze, Clinica oculistica, Università di Padova

### ABSTRACT

#### Laboratory tests in the diagnosis of allergic conjunctivitis

The diagnosis of allergic conjunctivitis is usually clinical, however, allergic tests are indicated for a more specific diagnosis and patient management. While chronic and severe ocular allergic conditions have clear diagnostic signs and symptoms, the most common diseases, seasonal and perennial allergic conjunctivitis, have no identifying pathognomonic signs. Skin tests and measurement of serum specific IgE are usually sufficient for an allergic diagnosis, however, often the results of these tests are negative in the presence of a typical clinical history. In these cases, the conjunctival provocation test and the measurement of tear mediators may provide more locally specific information. In the active form of the disease, cytological tests are indicated; the presence of tear eosinophils in particular is indicative of an allergic reaction. The specific conjunctival provocation test, performed in the non-active phase of the disease, may show local sensitivities to allergens. Low tear volume limits the potential in vitro diagnosis. The measurement of tear specific IgE is not practical. A simple local test, involves the measurement of total IgE by paper strips, however, this test is not highly specific. The measurement of ECP, tryptase, IL-4, IL-5 and eotaxin tear levels may also be useful for the diagnosis of ocular allergy.

### RIASSUNTO

La diagnosi di congiuntivite allergica è di solito clinica, ma richiederebbe l'esecuzione di test allergologici per l'esatto inquadramento del paziente e per gli indirizzi terapeutici più appropriati. Mentre le forme croniche gravi di allergia oculare presentano dei segni clinici tipici, e forme più frequenti, la congiuntivite allergica stagionale e quella perenne, non presentano segni patognomonic. I test cutanei ed il dosaggio delle IgE specifiche siccome sono il più delle volte sufficienti per la conferma del sospetto diagnostico anche se non sono rari i casi in cui tali test risultano negativi pur in presenza di una sintomatologia congiuntivale suggestiva. Soprattutto in questi casi si possono eseguire dei test di stimolazione congiuntivale ed il dosaggio di marcatori e mediatori a livello lacrimale. In fase attiva, è utile eseguire un test citologico per il riscontro di eosinofili nel secreto lacrimale, la cui presenza è altamente significativa di forma allergica. Il test di provocazione congiuntivale specifico va eseguito in fase di quiescenza e può rilevare delle positività congiuntivali altrimenti non evidenziabili. Il basso volume di lacrime che può essere prelevato limita notevolmente la diagnostica in vitro. Il dosaggio delle IgE specifiche sarebbe auspicabile ma di difficile attuazione. Un esempio di test facilmente eseguibile è quello del dosaggio delle IgE totali su strips applicate direttamente al fornice congiuntivale comunque non altamente specifico. Il dosaggio lacrimale di ECP, triptasi, IL-4, IL-5 ed eotaxina potrebbero rivelarsi utili per la diagnostica di allergia oculare.

### INTRODUZIONE

La congiuntivite allergica rappresenta una localizzazione della sindrome allergica, frequentemente associata alla rinite, ma che spesso si manifesta come unica o prevalente manifestazione di allergia. Si tratta di una patologia frequente e di quotidiano riscontro ambulatoriale con la cui diagnostica e gestione si deve confrontare non solo lo specialista oculista ma anche il medico di medicina generale, il pediatra, l'allergologo ed il farmacista. Infatti, dati ottenuti esaminando il numero e la provenienza delle prescrizioni per medicinali antiallergici in collirio, evidenziano che solamente il 36% di queste provengono dallo specialista oculista, mentre la maggior parte provengono dal medico di medicina generale (52%) e dal pediatra (10%)(1). Effettivamente il paziente affetto da congiuntivite si reca dallo specialista solo nel 30%, dal medico di medicina generale nel 60% dei casi, dal pediatra nel 9%

e da altri nel 1% dei casi. Considerando le diverse aree geografiche, il numero di visite per congiuntivite è sovrapponibile nel Nord e Sud Italia, e lievemente inferiore nel Centro con una prevalenza di numero di visite nel periodo primaverile (44%) rispetto all'estate (25%), l'inverno (18%) e l'autunno (13%). Pertanto, non si tratta solamente di una patologia legata ai pollini primaverili e, quindi, stagionale, ma di patologie ricorrenti o perenni.

Si stima che la percentuale di soggetti affetti da malattia allergica sia circa il 15-20% della popolazione mondiale (2). La sintomatologia oculare/congiuntivale nei soggetti allergici è presente nel 40-60% dei pazienti a seconda degli studi. Vale a dire che circa il 10% della popolazione generale presenta o ha sofferto di una forma di allergia oculare.

La congiuntiva è dotata di un sistema immunocompetente aspecifico e specifico capace di riconoscere, processare ed eliminare antigeni estranei. Questo sistema, de-

nominato *conjunctival associated lymphoid tissue* (CALT) e' paragonabile al sistema linfatico associato alle altre mucose. E' capace, pertanto, di dare origine a risposte infiammatorie ed immuni d'organo senza altri segni o coinvolgimenti di altri organi. Si ritiene che una sensibilizzazione allergica si possa instaurare direttamente ed esclusivamente a livello della superficie oculare. Nel caso delle malattie allergiche, nonostante le intercomunicazioni fra organi ed apparati attraverso linfociti circolanti, linfocine, neuromediatori ed ormoni, non ben conosciuti meccanismi di *homing* determinerebbero la particolare suscettibilita', in diversi individui o, nello stesso individuo, in periodi diversi, di un particolare organo nello sviluppo di una reazione infiammatoria verso allergeni ambientali a cui ci si espone con le stesse modalita'. Pertanto, non e' raro riscontrare soggetti affetti da malattia allergica con unicamente o prevalentemente sintomatologia oculare.

La diagnosi di 'occhio rosso' e' piuttosto complessa e dovrebbe essere riservata allo specialista oculista. Infatti, la presenza di un 'occhio rosso' non e' sinonimo di congiuntivite e tanto meno di allergia. Dovendo pero' trattare la diagnostica delle congiuntiviti allergiche, ci si limitera' a riportare la classificazione delle allergie oculari, i criteri clinici distinti per le singole forme cliniche, e i criteri per la diagnostica di laboratorio.

## CLASSIFICAZIONE E CARATTERISTICHE CLINICHE DELLE ALLERGIE OCULARI

Quando si parla di allergia oculare si deve far riferimento a piu' forme cliniche, ciascuna con caratteristiche cliniche specifiche. La classificazione comprende le seguenti forme cliniche, contraddistinte da sigle derivate dalla denominazione internazionale (3):

- Congiuntivite allergica stagionale (SAC) e perenne (PAC)
- Cheratocongiuntivite primaverile (VKC)
- Cheratocongiuntivite atopica (AKC)
- Congiuntivite gigantopapillare (GPC)

A queste va aggiunta la Biefarcongiuntivite da contatto, che interessa soprattutto la cute palpebrale.

La congiuntivite allergica piu' comune e' senz'altro la forma stagionale (SAC) legata alla sensibilizzazione ed esposizione ad allergeni ambientali, soprattutto pollini. La forma perenne (PAC) si verifica in pazienti sensibili agli acari della polvere o plurisensibilizzati. Entrambe le forme sono caratteristiche dell'eta' giovane-adulta e presentano una sintomatologia caratterizzata dal prurito oculare, iperemia congiuntivale piu' o meno accentuata, edema palpebrale e congiuntivale di grado variabile, modesta secrezione sierosa o siero-mucosa, lieve ipertrofia papillare o follicolare della congiuntiva. La sintomatologia acquista le caratteristiche di cronicita' nella PAC. L'obbiettivita' clinica e', comunque, piuttosto aspecifica in quanto nessuno dei segni e sintomi riportati sono specifici o patognomoni di congiuntivite allergica. L'unico elemento indicativo e' il prurito, tanto che si puo' affermare che se il paziente non lamenta prurito congiuntivale o perioculare, quasi sicuramente non si tratta di congiuntivite allergica. Fra i segni,

l'edema palpebrale e la ipertrofia papillare sono quelli meno aspecifici.

La cheratocongiuntivite primaverile o *vernal keratoconjunctivitis* (VKC) secondo la terminologia anglosassone, e' una grave malattia allergica oculare che interessa soprattutto soggetti in eta' pediatrica (4). Da una recente revisione della nostra casistica (piu' di 350 pazienti) e dalla letteratura internazionale, la malattia si manifesta a 7±5 anni, con un rapporto maschi femmine di 3:1, una durata della malattia e' di 6±4 anni e quindi una risoluzione spontanea in eta' puberale. Il tasso di incidenza di malattia nella provincia di Padova e' stato calcolato essere 6/100.000 in pazienti di eta' fino ai 15 anni, e di 0.1/100.000 sopra ai 16 anni. Pertanto, l'insorgenza della malattia, nelle sue tre forme cliniche, tarsale, limbare e mista, e' relativamente rara nei bambini ma eccezionale negli adulti. La VKC e' caratterizzata da una sintomatologia oculare intensa che insorge nella prima primavera e che perdura fino all'autunno, costituita da prurito, fotofobia, sensazione di corpo estraneo, iperemia congiuntivale, secrezione mucosa. E' tipicamente accompagnata dalla presenza di papille giganti alla congiuntiva tarsale superiore, nella forma tarsale, o dalla presenza di infiltrati o noduli limbari, nella forma limbare, o entrambi i segni nella forma mista. L'interessamento corneale e' frequente, sotto forma di cheratite puntata o di ulcere corneali sterili, risultato dell'effetto epiteliotossico delle proteine ed enzimi rilasciati dagli eosinofili attivati. Si tratta di una tipica malattia IgE e Th2-mediata in cui, comunque, solo il 50% degli affetti presenta una chiara sensibilizzazione allergica.

La cheratocongiuntivite atopica (AKC) e' tipica di soggetti atopici in eta' adulta anche se puo' insorgere anche in bambini affetti da dermatite atopica. Oltre all'interessamento cutaneo, si puo' associare a rinite, rinocongiuntivite stagionale ed asma, quindi a patogenesi IgE-mediata e Th2 -mediata. La AKC puo' essere una malattia grave per le sue caratteristiche di cronicita' a cui si sovrappongono esacerbazioni piu' frequenti nei periodi invernali. Frequente e' l'interessamento corneale sotto forma di epitelopatia superficiale diffusa ed formazione di ulcere dalla cui cicatrizzazione puo' residuare un astigmatismo irregolare o un panno corneale che compromette la funzione visiva. Non eccezionale e' l'associazione con cheratocono. Fra le complicanze piu' frequenti notiamo la cataratta (presente comunque nel 10% dei soggetti affetti da dermatite atopica) ed il glaucoma indotti dall'uso frequente o dall'abuso di cortisonici, e la cheratite erpetica.

La congiuntivite gigantopapillare (GPC) e' una infiammazione non IgE-mediata indotta piu' frequentemente dall'uso di lenti a contatto. Tutti i tipi di lenti corneali possono generare una GPC, come anche l'uso di protesi oculari, la presenza di punti di sutura corneo-congiuntivali o cerchiaggi e piombaggi sclerali protrudenti. Si tratta di una reazione a livello della congiuntiva tarsale superiore indotta dal microtrauma ripetuto generato dall' corpo estraneo' congiuntivale a cui si sovrappone una reazione immuno verso proteine o residui proteici depositati sulla lente. La infiammazione che ne consegue e' simile a cio' che si verifica nella congiuntivite primaverile dal punto di

vista morfologico (formazione di papille tarsali), istopatologico e di espressione di citochine e mediatori dell'infiammazione. La sospensione dell'uso delle lenti a contatto determina la regressione della malattia.

La blefarite o blefarocongiuntivite da contatto e' una affezione irritativa o immunomediata indotta dal contatto ripetuto con agenti irritanti, nel primo caso, o apteni, nel secondo, in grado di indurre una reazione cellulo-mediata. Metalli, profumi, conservanti, farmaci e cosmetici possono causare una blefarite eczematosa o una blefarocongiuntivite cronica o recidivante risolvibile solamente se si riesce ad identificare l'agente scatenante.

Ciascuna delle entita' cliniche brevemente illustrate necessita di una diagnosi differenziale che molto spesso e di tipo clinico ma che deve essere supportata da dati obbiettivi e indagini di laboratorio. Sebbene le caratteristiche cliniche, piuttosto tipiche per ciascuna entita', consentirebbero una diagnosi abbastanza sicura di SAC, VKC, AKC e GPC da parte dello specialista, le forme meno conclamate o iniziali sono di piu' difficile interpretazione clinica. Infatti, risulta a volte difficile distinguere le congiuntiviti allergiche da quelle pseudoallergiche. Le congiuntiviti allergiche sono manifestazioni infiammatorie che si sviluppano in risposta a stimoli specifici, secondo meccanismi patogenetici ben conosciuti. Le forme pseudoallergiche, invece, comprendono una serie di manifestazioni clinicamente simili alle forme allergiche, ma in rapporto con una patogenesi non allergica e non univoca.

Di fronte ad una infiammazione oculare di sospetta natura allergica bisognerà innanzitutto accertarsi che si tratti effettivamente di una patologia da sensibilizzazione IgE-mediata verso allergeni o antigeni di varia natura, e non di una forma aspecifica. In secondo luogo, in base alle conoscenze sulle caratteristiche cliniche e patologiche di ciascuna entità, bisognerà distinguere fra loro le diverse forme di patologia allergica della superficie oculare e degli annessi.

La patogenesi delle congiuntiviti allergiche stagionali e perenni si configura seconda una classica reazione IgE-mediata nella quale l'attivazione specifica dei mastociti determina la liberazione dell'istamina e degli altri mediatori neoformati e preformati ed alla quale segue una reazione infiammatoria cosiddetta tardiva legata alla espressione di chemochine, citochine e molecole di adesione che inducono l'infiltrazione nel tessuto di cellule infiammatorie.

Per l'impostazione di una corretta terapia e' necessario non solo definire che si tratta effettivamente di un problema allergico IgE mediato, ma anche determinare le cause di sensibilizzazione e le cause o i fattori scatenanti. L'inquadramento del paziente necessita, pertanto, di un processo diagnostico che prevede le seguenti tappe: anamnesi; esame clinico generale; esame clinico oculare; test *in vivo* e di laboratorio allergologici; test *in vivo* e di laboratorio allergologici locali.

## DIAGNOSTICA DELLE CONGIUNTIVITI ALLERGICHE

### Anamnesi

Con un'anamnesi accurata si possono ottenere molte informazioni riguardanti il tipo di infiammazione oculare e le relazioni tra l'inizio della sintomatologia e la possibile esposizione ad allergeni ambientali o alimentari. L'età del paziente e l'età di insorgenza della malattia permettono già un primo orientamento, considerando che le congiuntiviti e rinocongiuntiviti allergiche insorgono in età giovanile, fra i 10 e i 30 anni; la congiuntivite primaverile inizia precocemente, anche nei primi anni di vita; la cheratocongiuntivite atopica esordisce dopo i 20 anni nella forma classica, oppure nei primi anni di vita nella forma infantile; le blefarocongiuntiviti da contatto e le congiuntiviti gigantomapillari si manifestano in età giovane-adulta. L'insorgenza di una infiammazione congiuntivale dopo i 60 anni dovrà far dubitare sulla reale patogenesi allergica, mentre farà piuttosto pensare ad una alterazione della secrezione lacrimale, ad una irritazione da farmaci, o ad altre forme immunologiche non allergiche.

Nella storia allergologica si dovrà prestare una particolare attenzione alla durata dei sintomi, al luogo di insorgenza della sintomatologia, alla relazione fra allergeni conosciuti o sospetti e sintomatologia, o condizioni climatiche e variazioni ambientali, presenza di manifestazioni atopiche in altri membri della famiglia. Il paziente molto spesso ha già formulato un'ipotesi sulle cause del suo disturbo che necessitano di una conferma scientifica. La compilazione di questionari prestabiliti e mirati potrebbe facilitare la raccolta dell'anamnesi concentrandosi sulla raccolta dei dati più utili per la diagnosi di allergia.

### Esame clinico generale e oculare

Anche se non di pertinenza dello specialista d'organo, può essere di aiuto valutare la presenza e l'entità di manifestazioni cutanee, il tipo di respirazione del paziente, o la presenza di linfadenopatia preauricolare o laterocervicale per una diagnosi differenziale con forme infettive.

I pazienti che evidenzino una patologia infiammatoria del solo segmento esterno dovrebbero sempre essere sottoposti ad un esame oftalmologico completo anche se si presentano dal medico di famiglia, dal pediatra, dall'allergologo o da altro specialista.

Non deve essere dimenticato che alcuni vizi refrattivi, specie di lieve entità, possono creare, se non corretti o mal corretti, una sintomatologia pseudoallergica.

La cute palpebrale è valutabile meglio alla luce solare più che alla lampada a fessura, dove invece si dovrà fare attenzione alle caratteristiche del bordo palpebrale, delle ciglia, della congiuntiva nella sua totalità, e della cornea. L'oculista utilizza la lampada a fessura per l'esame accurato della superficie oculare.

### I test cutanei

Nel sospetto di una manifestazione allergica verrà richiesto al paziente di eseguire in primo luogo i test cutanei, seguiti dal dosaggio delle IgE specifiche e totali

sieriche, l'emocromo con conta degli eosinofili. Le modalità e le indicazioni per l'esecuzione dei test cutanei sono equivalenti a quelle adottate per le altre manifestazioni allergiche.

I test cutanei vengono eseguiti secondo metodiche diverse: prick test, scratch test ed intradermoreazione, quest'ultima ormai utilizzata soprattutto in casi dubbi o per allergeni particolari. Permettono di saggiare contemporaneamente la reattività cutanea verso gli allergeni ambientali ed alimentari (quando necessario), la reattività al controllo positivo rappresentato dall'istamina e al controllo negativo rappresentato da una soluzione fisiologica.

Nel sospetto di sensibilizzazioni da contatto, pertanto nelle forme di blefarite eczematosa o di blefarocongiuntivite, è necessario eseguire il patch test, che consiste nell'applicare sulla cute del dorso una serie di dischetti di cellulosa contenenti gli apteni, e che vengono rimossi dopo 48 ore. La reazione eritematosa/eczematosa che eventualmente si ottiene deve essere letta dopo 48 e 72 ore dalla applicazione, e graduata secondo una scala standardizzata. Nella serie standard costituita da 24 apteni, e' bene inserire sempre il benzalconio cloruro e il timerosal (conservanti presenti nella maggior parte dei colliri e soluzioni per lenti corneali). A questa serie, a seconda della attività lavorativa del paziente o al sospetto clinico di sensibilizzazione a particolari apteni, possono essere eseguiti test epicutanei più specifici e mirati. Nel caso di sospetta reazione blefarocongiuntivale a farmaci topici, e possibile eseguire test epicutanei personalizzati utilizzando gli stessi colliri verso i quali si sospetta una reazione da contatto. Questo può accadere in seguito all'uso di farmaci antiglaucomatosi, come beta-bloccanti, inibitori dell'anidrasi carbonica, alfa-agonisti, prostaglandine e prostanoidi. Abbastanza frequente e' la reazione 'allergica' oculare in seguito all'instillazione di midriatici topici per uso diagnostico, solitamente dovuta alla fenilefrina. Altri alfa-agonisti sono comunemente utilizzati perché presenti nei diversi colliri cosiddetti decongestionanti. Antibiotici topici, ad esempio la neomicina, ma anche colliri a base di estratti di erbe possono dare delle reazioni allergiche da contatto. E' comunque da ricordare che la cute palpebrale e' notevolmente diversa dalla cute del dorso, su cui comunemente vengono eseguiti i test epicutanei, non solo per lo spessore dell'epitelio e del derma, ma anche per il numero di mastociti presenti e, soprattutto, per la diversa esposizione all'ambiente esterno. E' possibile, ad esempio, che l'esposizione ai raggi solari favorisca una iperreattività sia specifica che aspecifica solamente della cute palpebrale. In caso di blefarite da contatto, alcuni autori consiglierebbero di eseguire i test epicutanei dopo aver eseguito uno 'stripping' della cute del dorso per meglio simulare lo stato cutaneo palpebrale.

In alcune forme di patologia congiuntivale da sospetta iperreattività a derivati batterici, come le congiuntiviti filitenuari, le episcleriti o la rosacea oculare, può essere utile la esecuzione di intradermoreazioni con antigeni microbici quali la tubercolina, la candidina, l'istoplasmina, estratti di stafilococco, streptococco, trichophyton e proteus verso cui si possono osservare reazioni ritardate evidenziabili dopo

24, 48 e 72 ore.

### **Il dosaggio delle IgE totali e specifiche nel siero**

Il dosaggio sierico delle IgE specifiche dovrebbe essere eseguito con un certo criterio clinico, basandosi sul sospetto di particolari sensibilizzazioni non necessariamente solo dopo l'esecuzione dei test cutanei. Poiché sia le indicazioni che le tecniche di esecuzione sono le stesse utilizzate nella diagnostica allergologica, si rimanda ai capitoli specifici per la loro trattazione più completa.

Nei bambini affetti da cheratocongiuntivite primaverile o atopica si predilige l'esecuzione direttamente del dosaggio delle IgE specifiche sieriche per diverse ragioni: la giovane età dei pazienti e la relativa scarsa collaborazione, la presenza di iperreattività cutanea, la possibile presenza di eczema, l'uso prolungato di farmaci sia topici che sistemici, la possibilità di quantificare contemporaneamente sensibilizzazioni verso diversi antigeni, e la possibilità di confrontare nel tempo valori numerici di dosaggio.

D'altronde bisogna anche ricordare che proprio in queste due patologie croniche oculari, VKC e AKC, non sempre i risultati delle IgE specifiche correlano con il quadro clinico. Soprattutto nella VKC, riscontriamo delle sensibilizzazioni IgE solamente in circa la metà dei giovani pazienti nonostante la malattia sia sostanzialmente sovrapponibile nei soggetti IgE positivi rispetto a quelli IgE negativi (4). Il risultato delle IgE specifiche (FEIA, CAP SYSTEM, Pharmacia, Uppsala, Sweden) eseguito in 224 pazienti affetti da VKC ha dimostrato una positività nel 55% dei pazienti mentre con il prick test solo il 46% di essi presentava una positività per almeno un allergene. Tra le IgE specifiche riscontrate più frequentemente aumentate in questi pazienti, troviamo quelle per graminacee (64% dei positivi), per acari (48%), parietarie (30%), alberi (25%), alternaria (20%), epiteli animali (18%) ma anche positività per allergeni alimentari nel 22% dei pazienti positivi. Da questi risultati eseguiti appunto su un gruppo numeroso di pazienti VKC (352, di cui 224 hanno eseguito il dosaggio delle IgE specifiche), considerata la relativa rarità della malattia, si può desumere innanzitutto che la VKC non è esclusivamente IgE mediata, e che nonostante sia una malattia associata ad esacerbazioni stagionali in primavera-estate, i pazienti presentano una frequente sensibilizzazione ad allergeni indoor, quali gli acari e gli epiteli animali.

Il dosaggio delle IgE totali sieriche, non è più considerato indispensabile per una diagnosi, in quanto valori normali di IgE totali non escludono la diagnosi di malattia allergica e, d'altra parte, valori elevati di IgE, oltre che nello stato di atopia, si possono riscontrare in numerose altre patologie non allergiche, quali le parassitosi, la mononucleosi, la cirrosi, la nefrite interstiziale, il mieloma, alcune immunodeficienze primarie e secondarie (compreso l'AIDS), e la rara sindrome da iper-IgE.

### **Conta degli eosinofili circolanti e proteine di attivazione eosinofila**

La presenza di una eosinofilia, seppure indicativa, non è patognomonica per una malattia allergica. Generalmen-

te la congiuntivite allergica stagionale e perenne, le forme da contatto, e le GPC non si accompagnano ad un aumento del numero degli eosinofili circolanti mentre nella VKC e la AKC questi risultano spesso aumentati. Quello che risulta aumentato significativamente e' il livello sierico della proteina cationica degli eosinofili (ECP) indice di attivazione degli eosinofili in fase di attivita' di malattia. Se l'ECP risulta aumentato anche in una manifestazione d'organo quale la congiuntivite, si consiglia di attuare una terapia sistemica anche per forme a prevalente localizzazione topica. In un nostro studio recente (5), l'ECP sierico e' risultato aumentato rispetto ai controlli ( $8 \pm 2 \mu\text{g/L}$ ) nella SAC ( $30 \pm 27 \mu\text{g/L}$ ;  $p < 0.05$ ), nella VKC ( $18 \pm 14 \mu\text{g/L}$ ,  $p < 0.05$ ), nella AKC ( $28 \pm 10 \mu\text{g/L}$ ,  $p < 0.01$ ) ma non nella GPC ( $9 \pm 3 \mu\text{g/L}$ ), nella blefarocongiuntivite da contatto ( $9 \pm 4 \mu\text{g/L}$ ) e nelle congiuntiviti di origine batterica ( $8 \pm 3 \mu\text{g/L}$ ). I dosaggi sierici della neurotossina eosinofila (EPX) sono risultati, nel medesimo studio, paragonabili a quelli dell'ECP.

In una piu' ampia casistica di VKC, l'ECP e' risultato ancora piu' elevato ( $27.8 \pm 24.2 \mu\text{g/L}$ , range: 0.3-144  $\mu\text{g/L}$ ) rispetto ai valori normali (4). Da notare che nei giovani pazienti affetti da VKC senza alcun'altra manifestazione allergica al di fuori della congiuntivite, l'ECP puo' risultare spesso l'unico parametro di laboratorio alterato. Questo ad indicare che una attivazione sistemica degli eosinofili si accompagna a queste forme gravi di allergia oculare anche in assenza di una chiara sensibilizzazione IgE.

E' chiaro che l'ECP e' solamente un marcatore di attivazione il cui dosaggio sierico puo' risultare comunque utile per l'iquadrimento dei pazienti affetti da una sospetta forma di allergia oculare e nel monitoraggio della malattia o della terapia.

### Il test di provocazione congiuntivale

La stimolazione congiuntivale con un estratto allergenico in concentrazione nota costituisce il test di provocazione congiuntivale specifica (CPT). Il CPT consente di valutare direttamente ed in maniera standardizzata la risposta dell'organo bersaglio allo stimolo allergico (6). Si esegue in fase di quiete, cioe' in assenza di sintomatologia congiuntivale e di terapia topica o sistemica, generalmente al di fuori della stagione polinica. Consiste nell'instillazione nel sacco congiuntivale di una goccia di soluzione dell'allergene, a partire da concentrazioni minime ed aumentando le dosi ogni 15 minuti, fino ad ottenere una risposta significativa, rappresentata dall'insorgenza di prurito e iperemia (7). Il controllo negativo si esegue somministrando nell'occhio controlaterale una goccia della soluzione utilizzata per sospendere l'allergene.

Il CPT puo' confermare l'effettiva reattiva' congiuntivale verso gli allergeni risultati positivi con i test cutanei ma, soprattutto, puo' evidenziare reattiva' della sola congiuntiva verso allergeni risultati negativi a livello cutaneo o sierico, oppure evidenziare una maggior risposta della congiuntiva verso un particolare allergene in caso di sensibilizzazioni multiple (8-9). E', quindi, particolarmente utile:

a) nel caso di una storia clinica compatibile per manifestazione IgE mediata, in cui si abbia una risposta

negativa o dubbia ai test sistemici;

- b) nel caso di storia dubbia per allergia e test cutanei sia positivi che negativi, per confermare o eliminare il sospetto di reattiva' IgE-mediata;
- c) per la valutazione della scelta dell'allergene per l'attuazione di una immunoterapia specifica in caso di plurisensibilizzazioni;
- d) per il monitoraggio di una immunoterapia specifica;
- e) per valutare l'efficacia di terapie antiallergiche;
- f) per la valutazione dell'efficacia di nuovi farmaci anti-allergici topici;
- g) per lo studio della fisiopatologia della reazione allergica congiuntivale.

Il CPT si e' dimostrato un test utile per la diagnostica in vivo del paziente con sospetta congiuntivite allergica, sia nelle forme stagionali che in quelle perenni. Risulta particolarmente utile per eliminare il sospetto di reattiva' allergica in quei soggetti affetti da congiuntivite di natura non determinata, con test cutanei negativi o dubbi (9). Infatti dalla casistica personale, risulta che la maggior parte dei pazienti che ritengono la propria congiuntivite di natura allergica, sono in realta' affetti da diverse forme di infiammazione congiuntivale. Fra queste le forme piu' frequenti sono le alterazioni qualitative del film lacrimale, le blefariti non allergiche, le forme infettive e le iperreattiva' aspecifiche della mucosa congiuntivale.

Anche nei pazienti affetti da VKC, il CPT puo' essere utile ad evidenziare positività altrimenti non dimostrabili con il test cutaneo o il dosaggio delle IgE specifiche sieriche. Infatti su 99 pazienti testati, il CPT e' risultato positivo nel 59% di essi rispetto al 55% di pazienti positivi alle IgE e, soprattutto al 46% di positività con il prick test.

Il CPT con allergene specifico determina in soggetti allergici a quell'allergene, una reazione congiuntivale IgE-mediata acuta, autolimitante, simmetrica in entrambi gli occhi, riproducibile, indipendente nelle sue caratteristiche cliniche dall'allergene sensibilizzante e sovrapponibile alla reazione congiuntivale che il paziente presenta in fase di esposizione naturale all'allergene. Alla reazione immediata puo' seguire una reazione tardiva clinicamente evidente anche se cio'accade solamente quando si utilizzano elevate dosi di allergene (10). Infatti la reazione "late" congiuntivale indotta dal CPT e' dose dipendente e perlopiu' asintomatica, oppure caratterizzata da un modesto edema palpebrale, iperemia congiuntivale persistente ed una esacerbazione lieve della sintomatologia o la persistenza dei sintomi della reazione immediata, anche se attenuati, per diverse ore.

Si possono eseguire test di provocazione congiuntivale aspecifica utilizzando amine o peptidi vasoattivi (per esempio con l'istamina), metaboliti dell'acido arachidonico e soluzioni saline ipertoniche allo scopo di valutare una eventuale iperreattiva' congiuntivale aspecifica (11).

Una stimolazione con soluzione fisiologica fredda in corso di reazione allergica tardiva induce nell'uomo reazioni non univoche, mentre soggetti con congiuntivite primaverile evidenziano una marcata iperreattiva' alla provocazione congiuntivale con istamina.

I limiti del test di provocazione specifico sono essenzialmente legati alla disponibilità degli allergeni in soluzione acquosa. Infatti il fenolo, usato nella preparazione degli allergeni per scopo diagnostico, è irritativo per la superficie oculare. Devono essere utilizzati allergeni idrosolubili e senza conservanti. Gli allergeni disponibili commercialmente non sono numerosi e comunque costosi. Il numero di test eseguibili durante ciascuna visita rappresenta un secondo limite, in quanto l'instillazione di diversi allergeni e diverse concentrazioni dovrebbero essere distanziati di 15 minuti l'uno dall'altro. Gli effetti collaterali sono lievi, solitamente legati ad una eccessiva stimolazione congiuntivale con associata una reazione rinitica fastidiosa. Crisi asmatiche o reazioni generalizzate sono rare.

I test di eliminazione sono rappresentati dalla sospensione dell'esposizione del paziente ad un allergene sospeso. Se per l'allergologo le classiche prove di eliminazione sono rappresentate dalle diete, l'oculista dovrà eliminare innanzitutto eventuali terapie locali in atto, e valutare possibili variazioni della sintomatologia. Ugualmente può essere utile controllare il risultato di un allontanamento degli animali, della sospensione dell'attività lavorativa, o di un cambiamento di condizioni ambientali domestiche.

### Test del rilascio dell'istamina

Questo test non ha ancora incontrato le simpatie dei laboratori di diagnostica in vitro. Recentemente i risultati del "histamine release test (HRT)" su microfibre di vetro è stato messo in relazione con il risultato del test di provocazione congiuntivale (CPT) e quello delle IgE specifiche sieriche in pazienti affetti da congiuntiviti allergiche (12). Con questo test viene misurata l'istamina rilasciata dai basofili del sangue periferico in risposta alla presenza in vitro di un pannello di allergeni. Il nuovo test, necessita di 25 microlitri di sangue periferico eparinizzato in micropiastre da 96-pozzetti. Gli autori hanno riscontrato una maggior concordanza fra HRT e CPT (0.89) rispetto quella fra HRT e IgE specifiche (0.69) concludendo che il dosaggio delle IgE specifiche è indicato come test di screening mentre l'HRT può essere usato come test di conferma della risposta clinica agli allergeni.

### il dosaggio delle IgE specifiche lacrimali

Nel sospetto di reazioni congiuntivali IgE mediate, con negatività dei test sistemici può essere utile il dosaggio lacrimale delle IgE specifiche (13-14). Sono state suggerite diverse formule per calcolare la produzione locale di IgE specifiche. Con una metodica FAST abbiamo in passato riscontrato una scarsa correlazione sia fra il dosaggio delle IgE lacrimali e sieriche, che fra il dosaggio delle IgE lacrimali e il risultato dei test cutanei, per la presenza di un 30% di positività riscontrabili solo con il test locale in pazienti affetti da congiuntiviti allergiche stagionali o perenni, e di un 50% di positività solo con il test lacrimale in pazienti affetti da congiuntivite primaverile (9). Il dosaggio delle IgE lacrimali è invece risultato ben correlato con la risposta ai CPT.

Per ciascun dosaggio occorrono almeno 50 microlitri di liquido lacrimale, per cui non sempre è possibile ottene-

re quantità di lacrime sufficienti per eseguire un dosaggio. Considerata la maggior sensibilità delle nuove tecniche di diagnostica in vitro, si preferisce comunque eseguire il dosaggio sierico delle IgE specifiche e riservare il dosaggio lacrimale in casi selezionati. Il dosaggio è identico a quello eseguito nel siero, anche se non esistono, per mancanza di sufficiente casistica, parametri di riferimento standardizzati. Comunque, nel soggetto non allergico, non sono dosabili livelli lacrimali di IgE specifiche. La difficoltà del prelievo lacrimale, la possibilità di indurre una lacrimazione riflessa e quindi non normale, e, soprattutto, i limiti quantitativi del campione, ci hanno indotto a preferire l'esecuzione dei test di provocazione specifici in quanto meglio evidenziano clinicamente il grado di risposta della congiuntiva.

### il dosaggio delle IgE totali lacrimali

Può ancora essere considerato di qualche utilità per la diagnosi differenziale fra forme IgE mediate e non, o qualora non sia possibile raccogliere quantità di lacrime sufficienti per eseguire il dosaggio delle IgE specifiche. Questo dosaggio è tornato recentemente di moda in seguito alla commercializzazione di un semplice e rapido test diagnostico per il dosaggio semi-quantitativo delle IgE totali lacrimali, il Lacrytest (Adiatec).

I valori normali delle IgE presenti nelle lacrime sono inferiori a 2,5 kU/l (3 ng/ml) e sono solitamente molto bassi, a causa della barriera emato-lacrimale. Infatti, i campioni lacrimali provenienti da individui sani o affetti da congiuntiviti non allergiche, danno risultati negativi. La messa in evidenza di un aumento di IgE lacrimali indicherebbe una produzione locale di questi anticorpi e aiuterebbe nella diagnosi di congiuntivite allergica.

Sarebbe preferibile sottoporre al test entrambi gli occhi nel corso della stessa seduta in quanto numerosi casi di congiuntivite allergica mostrano una predominanza unilaterale e, in caso di una positività debole, ciò incrementerebbe la possibilità di avere un risultato positivo in uno dei due occhi.

Il test utilizza delle strisce di carta bibula che vengono applicate direttamente alla congiuntiva del fornice inferiore in modo simile a quello del test di Schirmer. All'interno della striscia e' sono presenti degli anticorpi anti-IgE e, con un sistema di rivelazione colorimetrico, si possono valutare, in pochi minuti, i valori di IgE totali: l'assenza della linea rossa, in corrispondenza della zona reattiva alle IgE è indice di un risultato negativo; l'apparizione di due linee rosse, di cui una nella zona di controllo di buon funzionamento del test, indica un risultato positivo. A seconda della intensità del colore è possibile dare un risposta semi-quantitativa.

Questo test immunologico è interessante non solo per il significato diagnostico delle IgE totali ma, soprattutto, per le possibili sue applicazioni future. Viste le scarse quantità di liquido lacrimale, la frequente scarsa correlazione fra sintomatologia oculare e risultato dei test allergologici e la rapidità e semplicità di esecuzione del test, sarebbe auspicabile avere a disposizione dello specialista oculista o allergologo, ma anche del medico di medicina generale,

un simile test rivolto verso un 'marcatore' di malattia allergica, che, comunque, attualmente ancora non esiste.

### La citodiagnostica congiuntivale

E' particolarmente utile, in fase di attività di malattia, eseguire un test citologico per la individuazione qualitativa dell'infiammazione congiuntivale. Un test citologico può essere eseguito sotto forma di citologia lacrimale, raschiato congiuntivale, citologia ad impressione o di biopsia congiuntivale. La citologia lacrimale è di facile e rapida esecuzione. Bastano pochi microlitri di liquido lacrimale raccolti al canto esterno con un capillare in vetro, che vengono subito depositati su un vetrino. Si possono utilizzare vetrini precolorati con May Grunwald-Giemsa, oppure si possono usare colorazioni rapide ottenendo in entrambi i casi risposte in pochi minuti. La presenza di un solo eosinofilo è altamente indicativa per una patologia allergica, mentre un loro mancato riscontro non consente di escluderla.

Il raschiato congiuntivale, eseguito con una spatola, consente di raccogliere un maggior numero di cellule rispetto alla citologia lacrimale. Con questa metodica si possono anche valutare la presenza di corpi inclusi intracitoplasmatici per la ricerca delle clamidie, o si possono eseguire test per la ricerca di virus (in immunofluorescenza).

La citologia ad impressione è di maggior utilità nella patologia del film lacrimale, in quanto consente di valutare in modo atraumatico la morfologia dello strato superficiale dell'epitelio congiuntivale. La biopsia congiuntivale viene richiesta per l'esecuzione di esami istologici e immunocistochimici nel sospetto di patologia neoplastica o per la diagnosi di malattie autoimmuni quali il pemfigoide.

La valutazione della espressione citochine intracitoplasmatiche con citofluorimetria a flusso fornisce dati non solo sul fenotipo delle cellule infiammatorie coinvolte ma anche sul loro stato di attivazione. Con questa tecnica abbiamo dimostrato la presenza di linfociti Th2 nel liquido lacrimale di pazienti affetti da congiuntiviti allergiche (15).

### DOSAGGI DI MEDIATORI CHIMICI LACRIMALI

Nel liquido lacrimale possono essere eseguiti dosaggi di diversi mediatori dell'infiammazione a scopo diagnostico/prognostico o sperimentale Tabella 1. Il prelievo lacrimale e' praticamente indolore e atraumatico con il limite insormontabile della quantità del campione ottenibile.

#### Istamina

Il dosaggio dell'istamina lacrimale, eseguito con metodica RIA o ELISA, è di esecuzione relativamente semplice essendo a disposizione dei kit specifici.

L'istamina è rapidamente degradata dagli enzimi istaminasici, per cui valori elevati si riscontrano o in caso di massiva degranolazione dei mastociti (ad esempio, dopo test di provocazione congiuntivale) o, come da noi dimostrato recentemente, in caso di un deficit delle istaminasi caratteristico delle congiuntiviti primaverili (16). Più' che per scopo diagnostico, il dosaggio dell'istamina lacrimale

e' indicato per provare l'effetto inibitorio sulla attivazione dei mastociti da parte di farmaci topici.

#### Triptasi

La triptasi lacrimale è un indice di attivazione dei mastociti congiuntivali ed il suo dosaggio potrebbe essere utile nella diagnosi delle allergopatie (17). E' anche vero che in diverse forme di congiuntivite non-allergica, e' possibile una attivazione non specifica dei mastociti. La triptasi lacrimale puo' essere dosata con metodica UNICAP. Il problema resta quello della quantità di liquido lacrimale ottenibile. Il dosaggio e' indicato nello studio dell'attività inibitoria sull'attivazione dei mastociti congiuntivali da parte di farmaci antiallergici topici.

#### ECP

Abbiamo sottolineato l'utilità del dosaggio della proteina cationica eosinofila (ECP) come "marker" di attivazione eosinofila correlato con lo stato clinico della malattia. L'ECP risulta notevolmente aumentato a livello lacrimale nel corso di tutte le forme di congiuntivite allergica, soprattutto nella VKC anche in quei pazienti che risultano negativi al dosaggio delle IgE totali e specifiche (18-20). L'ECP e' risultato correlato anche con il grado di compromissione corneale in fase di malattia a testimonianza dell'azione delle proteine rilasciate dagli eosinofili attivati nella patogenesi del danno epiteliale corneale nel corso dell'infiammazione allergica oculare.

#### Citochine

Il dosaggio lacrimale di mediatori, citochine, chemochine o l'evidenziazione dell'espressione di molecole di adesione non sono ancora eseguiti come test di utilizzo diagnostico ma solamente per lo studio della fisiopatologia della reazione allergica oculare o per la valutazione dell'efficacia di nuove terapie topiche antiallergiche. La determinazione di citochine lacrimali attualmente viene eseguita

Tabella 1

Marcatore	Origine	Tipo di Congiuntivite	Specificita'
IgE totali		Allergica	media
Istamina	Mast cell, basofili	Allergica, Pseudoallergica	bassa
Triptasi	Mast cell	Allergica	alta
ECP/EPX	eosinofili	Allergica	alta
MPO	neutrofili	Infettiva	bassa
SIL-2R	Linfociti attivati	Allergica, Infettiva, Immune	bassa
IL-4	Linfociti Th2, mast cell	Allergica, Immune	media
IL-5	Linfociti Th2 Eosinofili	Allergica, Immune	media
Eotassina	Fibroblasti	Allergica	alta

**Tabella 2**

	IL2	IL4	IL5	IL10	IL12	IL13	IFN $\gamma$	IL1 $\beta$	IL6	TNF $\alpha$	IL8	MCP1	RAN	EOT
SAC	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	↑	NS	NS	NS	NS	NS	NS
AKC	↑	↑	↑	↑	NS	NS	↑	↑	↑	↑	↑	↑	NS	NS
GPC	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	↑	NS	NS	NS
VKC	NS	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	NS	↑	NS	↑

NS = non aumentato significativamente rispetto ai controlli non allergici; (↑) = aumentato significativamente rispetto ai controlli non allergici (26-27)

con tecniche ELISA e, comunque, piu' per ricerca che a scopo diagnostico (21-24). Lo svantaggio e' sempre rappresentato dalla possibilita' di eseguire solo un numero limitato di dosaggi nel singolo campione senza che nessuna citochina risulti un sicuro marcatore di patologia. Potrebbero risultare interessanti per il futuro, delle nuove applicazioni della citofluorimetria a flusso per il dosaggio, anche nel liquido lacrimale, di 'pattern' di citochine. Questa tecnica conosciuta come "multiplexed bead based flow cytometry" ha favorito il rilancio della ricerca in quest' area e si propone come possibile applicazione diagnostica. La tecnica combina i principi del "sandwich ELISA" con le potenzialita' della citofluorimetria a flusso e consente di misurare simultaneamente diversi mediatori in un campione di 10-20 microlitri di liquido lacrimale (25). Piu' che la singola citochina, sara' possibile evidenziare dei rapporti fra citochine o gruppi di citochine con funzioni opposte o complementari.

Recentemente abbiamo potuto dosare in un unico campione lacrimale, 14 diversi citochine e chemochine in gruppi di pazienti affetti da SAC, VKC, AKC, GPC in fase attiva ed in soggetti normali (Tabella 2). Le citochine di tipo Th2, IL-4, IL-5, IL-13 sono risultate significativamente aumentate rispetto al controllo in tutte le forme allergiche ma soprattutto nella VKC rispetto agli altri gruppi di pazienti. L'IFN $\gamma$ , tipica citochina Th1, e' comunque risultata aumentata nelle forme piu' severe di VKC e AKC. L' IL-8 e' risultata particolarmente aumentata nella GPC dove il microtrauma indotto dal bordo della lente a contatto sarebbe all'origine della reazione infiammatoria. Anche citochine proinfiammatorie quali IL-1, IL-6 e TNF $\alpha$  risultano aumentate nel liquido lacrimale. Fra le chemochine, l'eotassina risulta particolarmente elevata nella VKC, e risulta correlata con i livelli di IL-5 e IL-4. In uno studio precedente abbiamo riscontrato livelli particolarmente aumentati sia di eotassina-1 che di eotassina-2 (26). Mentre la eotassina-1 viene prodotta da fibroblasti congiuntivali, ma non dalle cellule epiteliali congiuntivali, stimolati con IL-4 e TNF, la eotassina-2 verrebbe prodotta principalmente da monociti e macrofagi.

Chemochine e citochine vengono espresse e prodotte localmente non solo da linfociti o da cellule infiammatorie ma anche da cellule epiteliali e connettivali della superficie oculare ed e' quindi impossibile al momento individuare direttamente sul paziente l'origine e lo stato di attivazione

delle diverse componenti flogistiche.

E' difficile pensare di poter individuare un unico marcatore che consenta di fare diagnosi di malattia allergica oculare e tantomeno di singola entita' allergica congiuntivale. Ancora oggi la clinica deve guidare verso l'esecuzione di esami clinici e di laboratorio che possano confermare il sospetto diagnostico o indirizzarci verso ipotesi alternative.

**BIBLIOGRAFIA**

1. Corsico R. Rinocongiuntivite allergica. BIMS 2001; N. 100, IMS Health S.p.A., Milano.
2. Beary GJ, Hedquist B. Ocular allergic disorders and dry eye disease: associations, diagnostic dilemmas, and management. *Acta Ophthalmol Scand* 2000;78:32-37.
3. McGill JI, Holgate ST, Church MK, Anderson DF, Bacon A. Allergic eye disease mechanisms. *Br J Ophthalmol* 1998;82:1203-1214.
4. Leonardi A. Vernal keratoconjunctivitis: pathogenesis and treatment. *Prog Ret Eye Res* 2002;21:319-339.
5. Leonardi A, Borghesan F, Faggian D, dePaoli M, Secchi AG, Plebani M. Tear and serum soluble leukocyte activation markers in conjunctival allergic diseases. *Am J Ophthalmol* 2000;129:151-58.
6. Moeller C, Bjorksten B, Nilsson G, Dreborg S. The precision of the conjunctival provocation test. *Allergy* 1984;39: 37-41.
7. Abelson MB, Chambers WA, Smith LM. Conjunctival allergen challenge. A clinical approach to studying allergic conjunctivitis. *Arch Ophthalmol* 1990;108: 84-88.
8. Leonardi A, Fregona IA, Gismondi M, Daniotti E, Carniel G, Secchi AG. Correlation between conjunctival provocation test (CPT) and systemic allergometric tests in allergic conjunctivitis. *Eye* 1990;4:760-764.
9. Leonardi A, Battista MC, Gismondi M, Fregona IA, Secchi AG. Antigen sensitivity evaluated by tear-specific and serum-specific IgE, skin tests, and conjunctival and nasal provocation tests in patients with ocular allergic diseases. *Eye* 1993;7:461-464.
10. Bonini S, Bonini S, Vecchione A, Naim DM, Allansmith MR, Balsano F. Inflammatory changes in conjunctival scrapings after allergen challenge in humans. *J Allergy Clin Immunol* 1988;82:462-466.
11. Bonini S, Bonini S, Todini V, Schiavone M, Centofanti M, Allansmith MR, Bucci MG. Conjunctival hyperresponsiveness to ocular histamine challenge in patients with vernal conjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol* 1992;89:103-107.
12. Uchio E, Matsuura N, Matsumoto S, Kadonosono K, Ohno S. Histamine release test and measurement of antigen-specific IgE antibody in the diagnosis of allergic conjunctival diseases. *J Clin Lab Anal* 2001;15:71-75.

13. Ballou M, Mendelson L, Donshik P, Rooklin A, Rapacz P. Pollen specific IgE antibodies in tears of patients with allergic-like conjunctivitis. *J Allergy Clin Immunol* 1984;73: 376-380.
14. Sompolinsky D, Samara Z, Zavaro A, Barishak Y. Allergen-specific immunoglobulin E antibodies in tears and serum of vernal conjunctivitis patients. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1984;75:317-321.
15. Leonardi A, DeFranchis G, Zancanaro F, Crivellari G, DePaoli M, Plebani M, Secchi AG. Identification of local Th2 and Th0 lymphocytes in vernal conjunctivitis by cytokine flow cytometry. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:3036-3040.
16. Abelson MB, Leonardi A, Smith LM, Fregona IA, George MA, Secchi AG: Histaminase activity in patients vernal keratoconjunctivitis. *Ophthalmology* 1995;102:1958-1963.
17. Butrus SI, Ochsner KI, Abelson MB, Schwartz LB. The level of triptase in human tears. *Ophthalmology* 1990;97:1678-1683.
18. Leonardi A, Borghesan F, Faggian D, Secchi AG, Plebani M. Eosinophil cationic protein in tears of normal subjects and patients affected by vernal keratoconjunctivitis. *Allergy* 1995; 50:610-613.
19. Montan PG, Hage-Hamsten M. Eosinophil cationic protein in tears in allergic conjunctivitis. *Br J Ophthalmol* 1996;80:556-560.
20. Pucci N, Novembre E, Lombardi E, Cianferoni A, Bernardini R, Massai C, et al. Atopy and serum eosinophil cationic protein in 110 white children with vernal keratoconjunctivitis: differences between tarsal and limbal forms. *Clin Exp Allergy* 2003;33:325-30.
21. Nakamura Y, Sotozono C, Kinoshita S. Inflammatory cytokines in normal human tears. *Curr Eye Res* 1998;17:673.
22. Leonardi A, Borghesan F, DePaoli M, Plebani M, Secchi AG. Procollagens and inflammatory cytokine concentrations in tarsal and limbal vernal keratoconjunctivitis. *Exp Eye Res.* 1998;67:105-12.
23. Calder VL, Jolly G, Hingorani M, Adamson P, Leonardi A, Secchi AG, Buckley R, Lightman S. Cytokine production and mRNA expression by conjunctival T cell lines in chronic allergic eye diseases. *Clin Exp Allergy* 1999;29:1214-1222.
24. Uchio E, Ono SY, Ikezawa Z, Ohno S. Tear levels of interferon-gamma, interleukin (IL) -2, IL-4 and IL-5 in patients with vernal keratoconjunctivitis, atopic keratoconjunctivitis and allergic conjunctivitis. *Clin Exp Allergy.* 2000;30:103-9.
25. Cook EB, Stahl JL, Lowe L, Chen R, Morgan E, Wilson J, Varro R, Graziano FM, Barney NP. Simultaneous measurement of multiple cytokines in a single sample of human tears using microparticle-based flow cytometry. *J Immunol Methods* 2001; 254:109-118.
26. Nivenius E, Montan PG, Chryssanthou E, Jung K, van Hage-Hamsten M, van der Ploeg I. No apparent association between periocular and ocular microcolonization and the degree of inflammation in patients with atopic keratoconjunctivitis. *Clin Exp Allergy* 2004;34:725-730.
27. Leonardi AA, Curnow JS, Calder VL. Multiple cytokine evaluation in tears of allergic conjunctivitis patients by multi-cytokine bead assay. *Invest Ophthalmol Vis Sc.* 2004;45: E-Abstract 625.
28. Leonardi A, Jose PJ, Zhan H, Calder VL. Tear and mucus eotaxin-1 and eotaxin-2 in allergic keratoconjunctivitis. *Ophthalmology* 2003;110:487-92.