

# Badanie eozynofilii we łzach w diagnostyce alergicznego zapalenia spojówek o etiologii zawodowej

## Eosinophilia in the tear fluid in diagnostics of occupational allergic conjunctivitis

ALICJA PAS-WYROŚLAK<sup>1</sup>, MARTA WISZNIEWSKA<sup>2</sup>, MONIKA KOWALCZYK<sup>2</sup>, JOLANTA WALUSIAK-SKORUPA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Przychodnia Chorób Zawodowych, Klinika Chorób Zawodowych i Toksykologii, Instytut Medycyny Pracy im. prof. J. Nofera w Łodzi

<sup>2</sup> Oddział Chorób Zawodowych, Klinika Chorób Zawodowych i Toksykologii, Instytut Medycyny Pracy im. prof. J. Nofera w Łodzi

### Streszczenie

**Wprowadzenie.** Zawodowe alergiczne zapalenie spojówek (ZAZS) jest zagadnieniem bardzo słabo poznany, co wynika w głównej mierze z niedoskonałości procedur diagnostycznych. Proces diagnostyczny chorób alergicznych o etiologii zawodowej, w tym również ZAZS, powinien obejmować wykazanie związku przyczynowo-skutkowego z alergenami obecnymi w środowisku pracy.

**Cel.** Celem pracy była ocena przydatności badania eozynofilii we łzach w diagnostyce zawodowego alergicznego zapalenia spojówek wywołanego uczuleniem na alergeny o dużej i małej masie cząsteczkowej.

**Materiał i metody.** Grupę badaną stanowiło 30 pacjentów narażonych na różne alergeny zawodowe, badanych w Oddziale Chorób Zawodowych z powodu podejrzenia ZAZS. U wszystkich pacjentów przeprowadzono: badanie kwestionariuszowe, badanie przedmiotowe ogólnolekarskie i okulistyczne; PTS z pospolitymi alergenami środowiska, oznaczenie całkowitego poziomu przeciwciał klasy IgE i swoistą próbę prowokacyjną z alergenami zawodowymi połączoną z oceną zmian cytologicznych we łzach. Wykonano także PTS z alergenami zawodowymi i oznaczenie aslgE w surowicy dla alergenów zawodowych, jeśli takie testy były dostępne.

**Wyniki.** U 12 pacjentów (40% grupy) swoisty test prowokacji wziewnej z alergenami zawodowymi wywołał wzrost odsetka eozynofili we łzach, spełniający 5% kryterium dodatniości próby prowokacyjnej. Na podstawie przeprowadzonego testu swoistej prowokacji wziewnej z oceną zmian cytologicznych we łzach u tych osób rozpoznano alergiczne zapalenie spojówek o etiologii zawodowej.

**Wnioski.** Monitorowanie składu cytologicznego łez podczas swoistej próby prowokacyjnej ułatwia ocenę odpowiedzi ze strony oka i pozwala na zróżnicowanie działania alergizującego i drażniącego.

**Słowa kluczowe:** badanie cytologiczne łez, zawodowe alergiczne zapalenie spojówek, swoista próba prowokacyjna

### Summary

**Introduction.** The occupational allergic conjunctivitis (OAC) is insufficiently recognized, which is a result of insufficient diagnostic procedures. The recognition of occupational allergic diseases, including OAC, requires demonstrating the relationship between exposure to workplace allergens and allergic inflammation.

**Aim of the study.** The aim of the study was to evaluate the usefulness of the tears eosinophilia examination in the diagnostics of occupational conjunctivitis due to allergy to high and low molecular weight allergens.

**Material and methods.** The study group comprised 30 patients suspected of occupational allergic conjunctivitis. In all subjects questionnaire study, as well as allergologic diagnostic tests like skin prick tests, the evaluation of serum total and specific IgE level (if available) were performed. Moreover, the specific inhalative challenge tests (SICT) with the evaluation of conjunctival tear fluid were performed.

**Results.** SICT with occupational allergens induced significant (5%) eosinophil influx in tear fluid in 12 patients (40%). OAC was recognized in those cases, on the basis of SICT with the evaluation of conjunctival tear fluid.

**Conclusions.** The monitoring of cytological changes in tear fluid during SICT enables objective evaluation of eye response and allows differentiating the allergic and irritant effects.

**Keywords:** tears examination, occupational allergic conjunctivitis, specific allergen challenge test

**Wykaz skrótów:**

AC – alergiczne zapalenie spojówek  
 AKC – atopowe zapalenie spojówek i rogówki  
 asIgE – antygenowo swoiste przeciwciała klasy IgE  
 PAC – całoroczne alergiczne zapalenie spojówek  
 PTS – punktowe testy skórne

SAC – sezonowe alergiczne zapalenie spojówek  
 SICT – swoista próba prowokacyjna z alergenem  
 VKC – wiosenne zapalenie spojówki i rogówki  
 ZAZS – zawodowe alergiczne zapalenie spojówek  
 ZSO – zespół suchego oka

**WSTĘP**

Zawodowe alergiczne zapalenie spojówek (ZAZS) jest procesem zapalnym toczącym się w obrębie spojówek, spowodowanym reakcją alergiczną na wprowadzenie do ustroju alergenu swoistego dla środowiska pracy. Jest to zagadnienie bardzo słabo poznane, co wynika w głównej mierze z niedoskonałości procedur diagnostycznych [1]. Podrażnienia oczu objawiające się przekrwieniem oczu i łzawieniem, obrzękiem spojówek czy powiek, bardzo często są mylnie rozpoznawane jako alergiczne zapalenie spojówek i łączone ze środowiskiem pracy [2]. Proces diagnostyczny chorób alergicznych o etiologii zawodowej, w tym również alergicznego zapalenia spojówek, powinien obejmować wykazanie związku przyczynowo-skutkowego z alergenami obecnymi w środowisku pracy. Dlatego bardzo istotna jest diagnostyka różnicowa: z odczynami alergicznymi o etiologii pozazawodowej, odczynami niealergicznymi z podrażnienia czy toksycznymi oraz z innymi chorobami oczu [3,4]. Dotychczas proces diagnostyczny zawodowego alergicznego zapalenia spojówek obejmował dane z wywiadu wskazujące na występowanie objawów ze strony oczu w miejscu pracy w połączeniu z nadwrażliwością na alergeny zawodowe. Takie rozumowanie ma jednak swoje ograniczenia. Po pierwsze, objawy zapalenia spojówek mogą być wynikiem nieswoistego działania ekspozycji zawodowej, a po drugie, punktowe testy skórne i oznaczanie alergenowo swoistych przeciwciał IgE cechują się niewystarczającą trafnością diagnostyczną, by wykryć wszystkie przypadki alergii zawodowej i wykluczyć przypadki fałszywie dodatnie [5]. Co więcej, dla wielu alergenów zawodowych nie są dostępne komercyjnie testy do badań diagnostycznych.

Celem pracy była ocena przydatności badania eozynofilii we łzach w diagnostyce zawodowego zapalenia spojówek wywołanego uczuleniem na alergeny o dużej i małej masie cząsteczkowej.

**MATERIAŁ I METODY****Grupa badana**

Grupę badaną stanowiło 30 pacjentów narażonych na różne alergeny zawodowe (pył drewna, lateks, środki odkażające, środowiska pracy fryzjera, rolnika, akrylany, związki niklu, wosk kosmetyczny, włókna kokosowe) badanych w Klinice Chorób Zawodowych z powodu podejrzenia alergicznego zapalenia spojówek o etiologii zawodowej. Kryterium włączenia do grupy stanowiły: występowanie objawów ze strony oczu związanych z pracą, ekspozycja zawodowa na czynniki o działaniu alergizującym oraz brak innych przyczyn dolegliwości ze strony oczu. Z grupy badanej wyłączono osoby z niewyrównaną wadą wzroku, przewlekłym zapaleniem brzegów powiek, przewlekłym

zapaleniem spojówek oraz z izolowanym zespołem suchego oka bez współistniejących objawów wymienionych w kryteriach włączenia.

Badanie uzyskało akceptację Regionalnej Komisji Bioetycznej przy IMP w Łodzi nr 14/2005. Pacjenci biorący udział w badaniu wyrażali pisemną zgodę na udział, podpisując formularz świadomej zgody.

U wszystkich osób przed wykonaniem testów prowokacyjnych odstawiono leki, które mogły mieć wpływ na wyniki badań diagnostycznych. Czas odstawienia leków zależny był od czasu ich działania i wynosił:

- doustne leki antyhistaminowe 7-42 dni (w zależności od leku),
- miejscowe leki p-alergiczne (krople do oczu) – 14 dni.

Kontrolę tych zaleceń stanowiło ustne oświadczenie badanych.

**Badanie kwestionariuszowe**

Kwestionariusz zawierał pytania o dane demograficzne (wiek, płeć), staż i miejsce pracy, występowanie obecnie lub w przeszłości objawów ze strony narządu wzroku, takich jak: pieczenie i zaczerwienienia spojówek, łzawienie, świąd oczu; układu oddechowego, takich jak: kaszel, napadowa duszność, wodnisty kataru; zmiany skórne. W kwestionariuszu uwzględniono także pytania o nałóg palenia tytoniu (czas rozpoczęcia i zaprzestania palenia, liczbę wypalanych papierosów oraz o bierne narażenie na dym tytoniowy), uczuleń na leki, występowania chorób alergicznych u badanego oraz w jego rodzinie, a także ekspozycję na silne alergeny środowiska domowego i komunalnego.

**Testy skórne metodą punktową**

Punktowe testy skórne (PTS) wykonywano na przyśrodkowej powierzchni przedramienia z zestawem pospolitych alergenów środowiska, takich jak: roztocze kurzu domowego (*Dermatophagoides pteronyssinus*), pyłki traw, drzew, chwastów, pleśnie, roztocze mączne (*Dermatophagoides farinae*) (Allergopharma, Niemcy). Przeprowadzono ponadto, w zależności od dostępności odpowiednich alergenów, testy z zestawami alergenów zawodowych: rolników (pył pszenicy, pył słomy, omłoty, pył siana, pył stodoły, roztocza magazynowe, sierści zwierząt hodowlanych: krowy, kozy, konia, świni, owcy, drobiu, pył zbóż), fryzjerów (parafenylenodiamina i nadsiarczan potasu) (Allergopharma, Niemcy; Stallergens, Francja). Kontrolę ujemną stanowił roztwór buforu glicerynowego do zawieszania alergenów, a kontrolę dodatnią roztwór chlorowodoru histaminy w stężeniu 1 mg/ml.

Zgodnie z zaleceniem Europejskiej Akademii Alergologii i Immunologii Klinicznej, wyniki oceniano po 15 minutach.

Dokonywano pomiaru najszerzej średnicy bąbla, za dodatni uznawano wynik o średnicy co najmniej 3 mm [6].

### Oznaczenie całkowitego poziomu immunoglobuliny E i antygenowo swoistych przeciwciał klasy IgE w surowicy

Oznaczenia całkowitego poziomu IgE w surowicy zostały wykonane przy użyciu zestawów ImmunoCap-System (Phadia, Uppsala, Sweden). Za podwyższony poziom całkowitej IgE uznawano stężenia powyżej 100 KU/l.

W zależności od rodzaju narażenia zawodowego przeprowadzono oznaczenia asIgE z wykorzystaniem następujących zestawów alergenów: naskórek krowy (e4), naskórek świni (e83), pióra: gęsi, kaczki, indyka, kurczaka (ex71), formaldehyd (k80) test EIA (Allergopharma, Niemcy), lateks (k82), chloramina (k85), tlenek etylenu, bezwodnik ftalowy, formalina, chloramina (pax6), ImmunoCap-System (Phadia, Uppsala, Sweden), henna(c613), nadsiarczan amonu (c604), chrom (c609), chlorek niklu (c628) (Hy-Tech, Biomedical, USA).

### Test Schirmera

Test Schirmera wykonywany był przed testami prowokacyjnymi w celu oceny występowania tzw. zespołu suchego oka. Po uprzednim znieczuleniu spojówki w worku spojówkowym umieszczany był standaryzowany pasek bibuły o wymiarach 5 x 35 mm w ten sposób, że zagięty koniec paska o długości 5 mm tkwił pod dolną powieką od strony skroniowej, nie dotykając rogówki. Czas trwania badania wynosił 5 min.

Interpretacja wyników:

- długość zwilżonego odcinka  $\geq 15$  mm – wynik prawidłowy
- długość zwilżonego odcinka  $< 10$  do  $15$  mm  $>$  – początkowy deficyt łez
- długość zwilżonego odcinka  $< 5$  do  $10$  mm  $>$  – zaawansowany deficyt łez
- długość zwilżonego odcinka  $\leq 5$  mm – nasilony deficyt łez

W celu wykluczenia wyników fałszywie pozytywnych, związanych z błędem pomiaru, postanowiono przyjąć, że dopiero wyniki testu poniżej 10 mm długości zwilżonego paska bibuły będą świadczyć o niedoborze części wodnej filmu łzowego, czyli o tzw. zespole suchego oka (ZSO).

### Test swoistej prowokacji wziewnej

Testy swoistej prowokacji wziewnej z alergenami zawodowymi przeprowadzono w warunkach odtwarzających środowisko pracy badanego. SICT przeprowadzany był w kabinie prowokacyjnej o temperaturze 22-25°C. Materiał pochodzący ze stanowiska pracy badanego. W zależności od stanu skupienia alergenów zawodowych (ciała stałe, płyny) pacjent przesypywał materiały lub malował powierzchnię ok. 2 m<sup>2</sup>. Próba trwała około 30 min. W dniu poprzedzającym próbę prowokacyjną przeprowadzano próbę z placebo (sól fizjologiczna, mąka ziemniaczana) w takich samych warunkach.

### Monitorowanie testu swoistej prowokacji wziewnej i interpretacja wyników. Ocena nasilenia objawów ze strony oczu w skali Abelson

Za punkt wyjścia oceny objawów subiektywnych i obiektywnych ze strony oczu uznano skalę punktową wg Abelsona [7]. Oceniano zarówno dolegliwości zgłaszane przez pacjentów, jak również objawy w badaniu przedmiotowym zauważalne gołym okiem lub w lampie szczelinowej (biomikroskop Zeiss). Ze względu na fakt, iż nie zawsze jednocześnie występowały zaczerwienienie i obrzęk spojówek oraz powiek, objawy te oceniano osobno (modyfikacja własna) (tabela I). Oceny dokonywano przed prowokacją oraz po 1, 6 i 24 godzinach po prowokacji. Według obowiązujących kryteriów za dodatni wynik uważa się wystąpienie objawów, których nota wynosi łącznie powyżej  $\geq 3$  punktów (wg Abelsona) [8].

### Badanie cytologiczne łez przed i po swoistej próbie prowokacyjnej

Łzy pobierano u pacjentów z kąta wewnętrznego powiek łzowych przed prowokacją, w godzinę, a następnie w 6 h i 24 godziny po niej, za pomocą specjalnych szklanych mikrokapilar (Bayer) na szkiełka podstawowe. Po wysuszeniu materiału nakropionego na szkiełka podstawowe, został on poddany barwieniom różnicowym: metodą May-Grunwald- Giemza oraz błękitem toluidyny na komórki metachromatyczne (w celu określenia cytologicznej zawartości łez). W badanym materiale oceniano komórki: nabłonkowe, eozynofile, bazofile, limfocyty oraz monocyty. Wynik badania cytologicznego (cytogram) podawany jest jako odsetek poszczególnych rodzajów komórek. Skład odsetkowy oceniano, zliczając 200 komórek i klasyfikując je jako komórki nabłonkowe, eozynofile, neutrofile, bazofile, limfocyty i monocyty.

### Kryterium rozpoznania alergicznego zapalenia spojówek o etiologii zawodowej

Alergiczne zapalenie spojówek o etiologii zawodowej rozpoznawano na podstawie wywiadu (obecności objawów charakterystycznych dla AZS po kontakcie z alergenem zawodowym) i dodatniego wyniku składu cytologicznego łez w przebiegu testu swoistej prowokacji wziewnej. Wynik testu uważano za dodatni, jeśli swoista prowokacja alergenem wywołała wzrost odsetka eozynofiliów w przynajmniej jednym punkcie czasowym, przy czym odsetek eozynofiliów po prowokacji był nie mniejszy niż 5% [9].

### Metody analizy statystycznej

Dane przedstawiono za pomocą średnich wartości z odchyleniami standardowymi ( $X \pm SD$ , N% grupy). Dla wykonanych analiz przyjęto poziom istotności  $p$  równy 0,05. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą pakietu statystycznego STATISTICA, a otrzymane wyniki zinterpretowano graficznie. Do oceny wartości składu komórek w badaniu cytologicznym łez po wziewnej próbie prowokacyjnej, w porównaniu z wartościami wyjściowymi, użyto testu  $t$  dla prób zależnych.

**WYNIKI**

Charakterystykę pacjentów z podejrzeniem alergicznego zapalenia spojówek o etiologii zawodowej przedstawiono w tabeli II. Najczęściej były to osoby pracujące w zawodzie rolnika. Objawy ze strony oczu zgłaszały wszystkie badane osoby, dolegliwości te występowały od średnio  $11,3 \pm 7,3$  lat i rozpoczęły się po  $34,3 \pm 17,1$  latach. W większości przypadków występowały również objawy ze strony układu oddechowego (nieżyt nosa 93,3%, duszność 90%, kaszel 86,7%).

Prawidłowy wynik testu Schirmera stwierdzono u 53,3% badanych pacjentów. Wśród wykrywanych zaburzeń przeważał początkowy zespół suchego oka.

Dodatkowo wyniki punktowych testów skórnych z pospolitymi alergenami środowiska ujawniono u 18 (60%) pacjentów, natomiast z alergenami zawodowymi – u 12 osób (40%). Podwyższony całkowity poziom IgE oraz obecność asIgE dla alergenów zawodowych stwierdzono odpowiednio u 43% i 30% grupy badanej. U 5 pacjentów

Tabela I. Zmodyfikowana skala punktowa wg Abelsona, którą posługiwano się podczas oceny stanu klinicznego badanych pacjentów

Oceniany objaw	Punktacja	Kryteria oceny
Powieki	0	brak objawów
	1	łagodne
	2	średnie
	3	ciężkie
Obrzęk	0	brak objawów
	1	łagodny
	2	średni
	3	ciężki
Spojówka	0	brak objawów
	1	łagodne – zauważalna w lampie szczelinowej
	2	średnie – widoczne gołym okiem
	3	ciężkie – spojówka balonowato rozdęta
Obrzęk	0	brak objawów
	1	łagodny – zauważalny w lampie szczelinowej
	2	średni – widoczny gołym okiem
	3	ciężki – spojówka silnie zadrażniona
Łzawienie	0	brak objawów
	1	łagodne
	2	średnie – z towarzyszącym wyciekaniem z nosa
	3	ciężkie – łzy spływają po policzkach
Swędzenie oczu	0	brak objawów
	1	łagodne – okresowe
	2	średnie – ciągłe bez tarcia oczu
	3	ciężkie – ciągłe z tarcieniem oczu
	4	bardzo ciężkie – pacjent nie może się powstrzymać od tarcia oczu

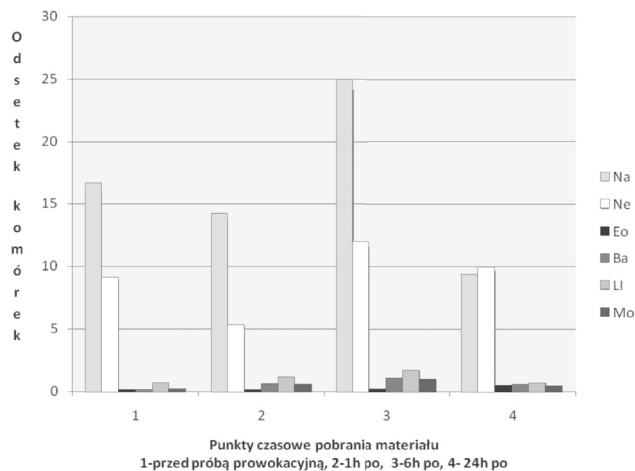
Tabela II. Charakterystyka grupy badanej – pacjentów z podejrzeniem alergicznego zapalenia spojówek o etiologii zawodowej (N=30)

Cecha [(średnia $\pm$ SD); N (%)]	Grupa pacjentów N = 30
Płeć – mężczyźni: kobiety	17: 13 (56,7%: 43,3%)
Wiek [lata] (min; max)	44,3 $\pm$ 11,2 (20; 66)
Atopowy wywiad rodzinny	11 (36,7%)
Palenie papierosów aktualnie	14 (46,7%)
Palenie papierosów w przeszłości	10 (33,3%)
Bierne palenie	17 (56,7%)
Kontakt ze zwierzętami domowymi	21 (70%)
Rodzaj alergenów zawodowych	
– środowiska pracy rolnika	8 (26,7%)
– pył drewna	4 (13,3%)
– lateks	4 (13,3%)
– środki odkażające	3 (10%)
– parafenylenodiamina, nadsiarczany, henna	4 (13,3%)
– pył tkanin	4 (13,3%)
– akrylany	2 (6,7%)
– wosk kosmetyczny	1 (3,3%)
– włókna kokosowe	1 (3,3%)
– związki niklu	1 (3,3%)

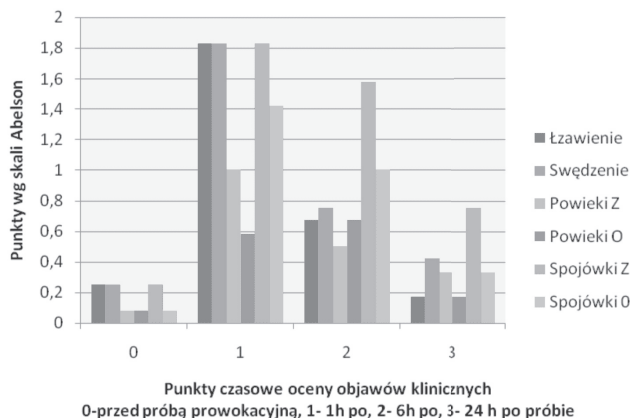


przeprowadzenie takich badań było niemożliwe ze względu na brak komercyjnych zestawów z odpowiednimi alergenami. W kolejnych 8 przypadkach wykonano testy skórne z roztworami alergenów przygotowanymi w Oddziale Chorób Zawodowych – dotyczyło to środków odkażających, związków niklu i parafenylendiaminy.

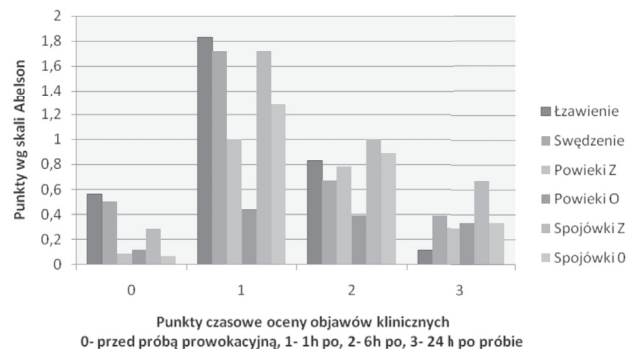
Wyniki badania cytologicznego łez przed i po próbie prowokacyjnej z placebo w grupie badanej przedstawiono na rycinie 1. Nasilenie objawów ze strony oczu w skali Abelson przed i po SICT zawarto na rycinach 2 i 3. U 12 pacjentów (40% grupy) swoisty test prowokacji wziewnej z alergenami zawodowymi wywołał wzrost odsetka eozynofiliów we



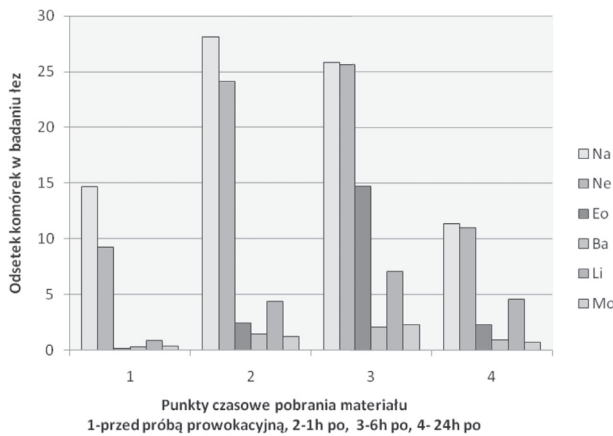
Ryc. 1. Wyniki badania cytologicznego łez przed i po próbie prowokacyjnej z placebo w grupie badanej (N=30)



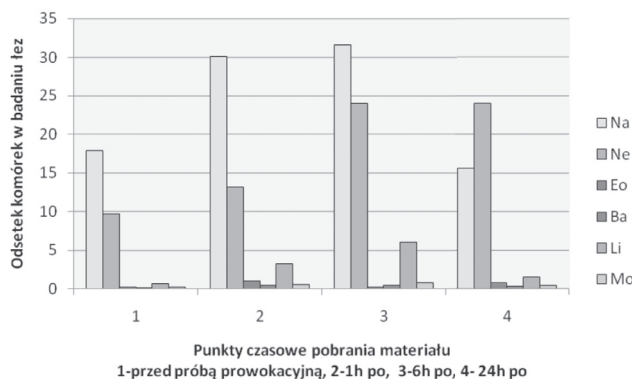
Ryc. 2. Wyniki oceny nasilenia objawów ze strony oczu w skali Abelson przed i po SICT w grupie pacjentów z ZAZS (N=12)



Ryc. 3. Wyniki oceny nasilenia objawów ze strony oczu w skali Abelson przed i po SICT w grupie pacjentów u których nie rozpoznano ZAZS (N=18)



Ryc. 4. Wyniki badania cytologicznego łez przed i po próbie prowokacyjnej w grupie pacjentów z ZAZS (N=12)



Ryc. 5. Wyniki badania cytologicznego łez przed i po próbie prowokacyjnej w grupie pacjentów, u których nie rozpoznano ZAZS (N=18)

łzach, spełniający ustalone kryterium dodatniości próby prowokacyjnej. Zestawienie zmian w odsetku eozynofilów przedstawiono na rycinach 4 i 5. U żadnego z pacjentów nie obserwowano istotnych zmian w odsetku komórek nabłonkowych, neutrofilów, limfocytów i monocytów.

Na podstawie przeprowadzonego testu swoistej prowokacji wziewnej z oceną zmian cytologicznych łez, alergiczne zapalenie spojówek o etiologii zawodowej rozpoznano u 12 osób (40% grupy). Zestawienie rozpoznanej etiologii AZS w badanej grupie przedstawiono w tabeli III. Wykonanie testu prowokacyjnego pozwoliło na rozpoznanie ZAZS, m.in. u kosmetyczki narażonej na wosk kosmetyczny [10] i pracownika produkcji narażonego na pył włókien kokosowych [11].

## DYSKUSJA

W Polsce na choroby alergiczne oczu cierpi 25% społeczeństwa [12]. W codziennej praktyce rozpoznanie alergicznego zapalenia spojówek ustala się w większości przypadków jedynie na podstawie badania podmiotowego i przedmiotowego. Najczęściej jest to wystarczające do podjęcia decyzji o wdrożeniu odpowiedniej terapii, natomiast nie gwarantuje wymaganego poziomu pewności w postępowaniu orzeczniczym. Trudności diagnostyczne w różnicowaniu zawodowego z pozazawodowym alergicznym zapaleniem spojówek, zapaleniem spojówek na tle infekcji, podrażnieniem oczu czy nawet symulowaniem objawów alergii ocznej, zwiększają zapotrzebowanie na badania i testy o wysokiej swoistości.

Celem pracy była ocena przydatności badania eozynofilii w łzach w diagnostyce zawodowego alergicznego zapalenia spojówek wywołanego uczuleniem na alergeny o dużej i małej masie cząsteczkowej. Rozpoznanie choroby alergicznej jako zawodowej wymaga udowodnienia (lub wykazania z przeważającym prawdopodobieństwem), że pierwotną jej przyczyną jest swoista nadwrażliwość na alergen specyficzny dla środowiska pracy. Jednym z elementów procesu diagnostycznego jest różnicowanie choroby alergicznej, której przebieg jedynie pogarsza się pod wpływem np. substancji drażniących od schorzenia rzeczywiście wywołanego czynnikami zawodowymi [1,2]. W Polsce następstwem rozpoznania alergii zawodowej jest odszkodowanie dla pracownika oraz orzeczenie o przeciwwskazaniach do wy-

konywania pracy na dotychczasowym stanowisku, dlatego też należy dążyć do ustalenia pewnego rozpoznania.

Diagnostyka chorób alergicznych pochodzenia zawodowego rozpoczyna się od wywiadu, badania przedmiotowego i analizy dokumentacji lekarskiej oraz oceny narażenia zawodowego pod kątem występowania w środowisku pracy czynników, które można uznać za alergeny zawodowe. Niestety, w diagnostyce chorób zawodowych wywiad uzyskany od pacjenta jest często niemiarodajny.

W niniejszym badaniu wywiad przeprowadzano za pomocą odpowiednio wystandaryzowanego kwestionariusza. Metoda ta jest narzędziem diagnostycznym o dużej czułości, stosowanym m.in. w badaniach epidemiologicznych [13]. W przypadku podejrzenia AC o etiologii zawodowej różnicowanie na etapie wywiadu należy do najtrudniejszych problemów diagnostycznych. W środowisku pracy znajduje się bowiem często wiele czynników wywierających działanie drażniące, które ze względu na bezpośredni kontakt z powierzchnią oka wywołują związane z pracą objawy ze strony oczu. W piśmiennictwie brak jest danych dotyczących trafności diagnostycznej badania kwestionariuszowego w zawodowym AC. Co więcej, podkreśla się, że nawet w niezawodowym AC, częstość tej jednostki chorobowej, wykrywana badaniem ankietowym, jest zdecydowanie niedoszacowana, gdyż pacjenci spontanicznie nie zgłaszają takich objawów w badaniach nakierowanych na choroby alergiczne dróg oddechowych [14].

W prezentowanym badaniu wszystkie badane osoby zgłaszały obecność objawów ze strony oczu i wiązały je przyczynowo z wykonywaną pracą. Ostatecznie ZAZS rozpoznano tylko u 40% badanych, dlatego obecność objawów klinicznych nie może stanowić wystarczającego kryterium do rozpoznania zawodowego alergicznego nieżyty spojówek.

Kolejnym etapem diagnostyki uczulenia zawodowego są testy immunologiczne, obejmujące oznaczanie całkowitego poziomu IgE i asIgE w surowicy oraz punktowe testy skórne z alergenami zawodowymi. Szczególnie PTS są badaniem łatwo dostępnym, będącym często badaniem „pierwszego rzutu” w przypadkach podejrzenia alergii zawodowej. Z drugiej strony nie zawsze istnieje możliwość użycia komercyjnie dostępnych testów. W niniejszym badaniu dodatnie wyniki PTS z alergenami zawodowymi stwierdzono

Tabela III. Zestawienie rozpoznanej etiologii AZS w grupie pacjentów z podejrzeniem alergicznego zapalenia spojówek o etiologii zawodowej (N=30)

Rozpoznanie	N [% grupy]
<b>Alergiczne zapalenie spojówek</b>	<b>12 (40%)</b>
– o etiologii zawodowej, wywołane:	12 (40%)
– alergenami środowiska pracy rolnika	3 (10%)
– lateks	2 (6,7%)
– środki odkażające	1 (3,3%)
– parafenylenodiamina, nadsiarczany, henna	1 (3,3%)
– pył tkanin	2 (6,7%)
– wosk kosmetyczny	1 (3,3%)
– włókna kokosowe	1 (3,3%)
– związki niklu	1 (3,3%)

u 40% osób, natomiast obecność asIgE dla alergenów zawodowych potwierdzono u 30% badanych.

Brak jest w piśmiennictwie danych o trafności diagnostycznej poszczególnych metod dla alergicznego zapalenia spojówek o etiologii zawodowej. W prezentowanym badaniu dokonanie takiej analizy nie było możliwe, gdyż grupa badana obejmowała osoby narażone na wiele różnych alergenów. Dostępne są jedynie dane nt. trafności diagnostycznej w diagnostyce niezawodowych alergicznych chorób oczu. Czułość PTS jest najwyższa w SAC (wynosi 96%) i maleje w pozostałych jednostkach chorobowych: PAC – 61%, VKC – 55%, AKC – 33% i GPC – 16% [15]. Szacuje się, że punktowe testy skórne średnio tylko w 30% potwierdzają alergiczne zapalenie spojówek.

W prezentowanym badaniu zastosowanie metody analizy cytologicznej też pozwoliło na rozpoznanie zawodowej alergii narządu wzroku, m.in. w sytuacjach, gdy nie były dostępne żadne testy do stwierdzenia nadwrażliwości (punktowe testy skórne, oznaczenie alergenowo swoistych IgE w surowicy) [5].

Złotym standardem w diagnostyce alergii zawodowej jest swoista próba prowokacyjna z alergenem (SICT). W niniejszym badaniu wszystkie testy prowokacyjne z alergenami zawodowymi przeprowadzono w warunkach odtwarzających środowisko pracy badanego. SICT są z powodzeniem stosowane w procesie diagnostyczno-orzeczniczym astmy zawodowej i alergicznego nieżytu nosa. W piśmiennictwie dotyczącym zastosowania (w diagnostyce zawodowej alergii narządu wzroku) testu swoistej prowokacji wziewnej z alergenami zawodowymi, połączonego z oceną składu komórkowego filmu łzowego, znajdują się pojedyncze doniesienia. W badaniu Wittczaka i wsp. [16] w grupie 23 piekarzy z podejrzeniem ZAZS tylko u 6 pacjentów SICT wywołał istotny napływ eozynofiliów w badaniu cytologicznym łez, a w pozostałych przypadkach obserwowano preparaty ubogokomórkowe. Brak korelacji pomiędzy wynikami badania cytologicznego łez z obecnością objawów klinicznych zapalenia spojówek autorzy łączyli z niedostateczną ilością łez pobranych do badania [16]. Opracowanie wystandaryzowanej metody do przeprowadzania swoistej prowokacji w diagnostyce ZAZS jest niezmiernie istotne, ponieważ w alergii narządu wzroku, częściej niż w innych chorobach alergicznych, nie udaje się potwierdzić swoistego uczulenia za pomocą metod laboratoryjnych (PTS, oznaczanie asIgE w surowicy).

W prezentowanym badaniu wszystkie testy prowokacyjne przeprowadzono na tle placebo. Jest to stały element w testach dotyczących układu oddechowego, jeszcze ważniejszy w przypadku narządu wzroku, który jest znacznie bardziej wrażliwy na działanie czynników drażniących. Wziewna prowokacja mąką ziemniaczaną nie wywołała jednak istotnych zmian klinicznych ani nie wpłynęła na skład komórkowy łez.

W piśmiennictwie opisywane są wyłącznie dospojówkowe próby prowokacyjne (*conjunctival allergen challenge*). Dospojówkowe próby prowokacyjne nigdy nie były wykorzystywane do diagnostyki chorób alergicznych o etiologii zawodowej. Test prowokacji dospojówkowej jest bezpiecznym, powtarzalnym testem, w którym nawet zastosowanie

wysokich stężeń alergenów nie powoduje uszkodzenia rogówki, a dyskomfort pacjenta jest niewielki i przemijający [17]. Nasuwa się więc pytanie, czy właśnie test w takiej formie nie mógłby być zastosowany w diagnostyce alergii zawodowej. Istnieją tu jednak pewne ograniczenia. Po pierwsze, w odróżnieniu od pospolitych alergenów środowiska brak jest komercyjnie dostępnych roztworów większości alergenów zawodowych, co uniemożliwia ich dospojówkowe zastosowanie. Ze względu na działania drażniące nie wszystkie alergeny zawodowe nadają się do samodzielnego (w warunkach laboratoryjnych) przygotowania roztworów do próby prowokacyjnej. Po drugie, wykonywanie prób dospojówkowych stanowiłoby odrębny etap diagnostyki alergii zawodowej, niezależny od badań układu oddechowego. Wydłużyłoby to i tak długi proces diagnostyczny, co w rutynowej diagnostyce może być trudne do zaakceptowania przez pacjenta, podczas gdy monitorowanie zmian w obrębie narządu wzroku w przebiegu wziewnej próby prowokacyjnej pozwala na ocenę stanu pacjenta w warunkach odzwierciedlających środowisko pracy, równoległe z oceną układu oddechowego.

Swoiste próby prowokacyjne przeprowadza się zwykle w połączeniu z tzw. metodami obiektywizującymi, czyli ujawniającymi zmiany typowe dla zapalenia alergicznego. W diagnostyce chorób układu oddechowego rolę tę spełnia badanie popłuczyn nosowych lub płwociny uzyskanej metodą indukcji. W prezentowanej pracy analizę zmian w obrazie morfologicznym i biochemicznym narządu wzroku monitorowano za pomocą badania płynu łzowego. Uzyskanie łez w porównaniu do innych sposobów pobrania materiału biologicznego jest najmniej inwazyjne i obciążające dla pacjenta. Inne metody (biopsja spojówki, pobranie zeskrobin spojówkowych, cytologia impresyjna) nie nadają się do monitorowania przebiegu próby prowokacyjnej, gdyż wiąże się ono z wielokrotnym pobieraniem materiału biologicznego, a powtarzany uraz oka, jakim jest pobranie zeskrobin spojówkowych, powoduje rekrutację komórek zapalnych do spojówki [18], co utrudniłoby diagnostykę.

Jednym z elementów oceny odpowiedzi badanego narządu na kontakt z alergenem jest monitorowanie późnej reakcji alergicznej. W skórze, oskrzelach czy nosie największe nasilenie fazy późnej obserwuje się pomiędzy 4. a 8. godziną po podaniu alergenu, z ustępowaniem reakcji w ciągu 24-48 godzin. Badania cytologiczne łez, przeprowadzone podczas testów dospojówkowych, pozwoliły na ustalenie, że 6. godzina po prowokacji jest optymalnym punktem czasowym dla takiej oceny – zarówno objawów klinicznych, jak i zmian zapalnych we łzach [18]. W prezentowanym badaniu, skutki prób prowokacyjnych oceniano w odstępach czasowych odpowiadających poszczególnym fazom reakcji alergicznej (po godzinie, 6 i 24 godzinach po teście prowokacyjnym). Niewielka liczba punktów czasowych, w których pozyskiwano materiał badawczy, uzasadniona była znacznym zmniejszeniem się ilości komórek w popłuczynach pobieranych w krótkich odstępach czasu.

W badaniu cytologicznym łez przed i po próbie prowokacyjnej monitorowano zmiany w odsetku poszczególnych komórek, jednak istotne zmiany obserwowano wyłącznie w przypadku eozynofiliów. W badaniach obejmujących

dospojówkową prowokację alergenem wykazano, że podanie alergenu wywołuje przedłużający się napływ komórek zapalnych do spojówki. Komórkami pojawiającymi się w pierwszej kolejności w spojówce są neutrofile. Ich napływ utrzymuje się przez wiele godzin. W przebiegu fazy późnej reakcji alergicznej utrzymuje się również wzrost liczby eozynofilów i limfocytów [18,19]. W prezentowanym badaniu u pacjentów, u których wystąpiła reakcja alergiczna w obrębie narządu wzroku, w 6 godzinie po prowokacji obserwowano maksymalny napływ eozynofilów. Z kolei w badaniu Boniniego i wsp. [18], w którym zmiany w składzie komórkowym łez oceniano co godzinę do dwunastej godziny oraz w 24 godz. po dospojówkowym podaniu alergenu, najsilniejszy wzrost odsetka eozynofilów stwierdzano w 6 i 24 godz. po prowokacji alergenowej. Autorzy stwierdzili, że punkty czasowe z maksymalnymi odsetkami dla poszczególnych komórek były różne u poszczególnych pacjentów, ale generalnie w fazie wczesnej reakcji alergicznej dominowały neutrofile, a w fazie późnej eozynofile i limfocyty.

W prezentowanym badaniu przyjęto odsetek 5% eozynofilów po prowokacji alergenem jako wystarczający do uznania związku przyczynowego objawów ze strony oczu z ekspozycją na alergen zawodowy. We wcześniejszym badaniu autorów niniejszej pracy zaproponowano przyjęcie takiego właśnie progu na podstawie badania zmian cytologicznych filmu łzowego, wywołanych wziewną ekspozycją na alergen, do diagnostyki alergicznego zapalenia spojówek wśród osób uczulonych na pyłki traw i drzew. W sezonie pylenia u wszystkich chorych odsetek eozynofilów we łzach wynosił co najmniej 5% – średnio w grupie 10,3%, a jednocześnie w badaniu kontrolnym u tych samych pacjentów, poza sezonem pylenia, u nikogo odsetek eozynofilów nie przekroczył 4%, przy czym najczęściej wahał się w granicach 0-1% i wynosił średnio 0,67% [9]. Przyjęcie eozynofilii na poziomie 5% w badaniu cytologicznym łez koresponduje z kryterium przyjmowanym w ocenie poprowokacyjnej odpowiedzi ze strony nosa. W badaniach Górskiego i wsp. zaproponowano odsetek 5% eozynofilów w popłuczynach nosowych [20], a Pignatti i wsp. [21] wskazywali na wartość 4% eozynofilów i/lub  $1,0 \times 10^4$  komórek/ml w wydzielinie z błony śluzowej nosa jako wskaźnik reakcji alergicznej ze strony nosa.

Ograniczeniem w przeprowadzaniu swoistych testów prowokacyjnych mogą być wyniki fałszywie dodatnie

i ujemne. W przypadku narządu wzroku fałszywie dodatni wynik testu swoistej prowokacji wziewnej może spowodować ekspozycja oczu na nadmierne zapylenie, wywołując objawy podrażnienia, klinicznie nieróżniące się od objawów choroby alergicznej. Zasadniczo sytuację tę powinno się wykryć w dniu kontrolnym z placebo, a monitorowanie stężenia pyłu/alergenu podczas prowokacji zwykle pozwala na uniknięcie działania drażniącego. Próg działania drażniącego pyłu na oczy wydaje się być niższy niż ten dla dróg oddechowych, co wykazały wyniki oceny nasilenia objawów przy pomocy skali wg Abelsona. Większym problemem są wyniki fałszywie ujemne. Łatwą do zidentyfikowania grupą pacjentów, u których może dojść do takiej sytuacji, są osoby przyjmujące leki antyhistaminowe czy glikokortykosteroidy.

Wdrożenie metody oceny morfologicznej łez pozwoliło na istotną poprawę jakości procesu orzeczniczego poprzez zastosowanie metody o dużej trafności diagnostycznej. Badanie cytologiczne łez jest metodą, która w prosty sposób pozwala na różnicowanie podrażnienia oczu i efektów działania alergizującego oraz ocenę nasilenia procesu zapalnego. U osób nieeksponowanych na działanie alergenów czy czynników drażniących w obrazie łez stwierdza się jedynie pojedyncze komórki nabłonka. W przypadku podrażnienia spojówek dochodzi do zwiększenia ilości komórek nabłonkowych i neutrofilów. W obrazie alergicznego zapalenia spojówek dominują eozynofile, a ponadto stwierdza się wzrost całkowitej liczby komórek oraz liczbę komórek nabłonkowych, neutrofilów czy bazofilów. Należy także podkreślić, że badanie cytologiczne łez jest metodą nieinwazyjną i mało uciążliwą dla osoby badanej, dzięki czemu można ją wielokrotnie powtarzać bez ryzyka uszkodzenia spojówki.

Zakres badań obejmujący ocenę nadwrażliwości na alergeny zawodowe i test swoistej prowokacji wziewnej z oceną objawów ze strony oczu wg skali Abelson i badaniem cytologicznym łez pozwala na pełną diagnostykę chorób alergicznych narządu wzroku o etiologii zawodowej.

## WNIOSKI

Nasze badania wskazują, że monitorowanie składu cytologicznego łez podczas swoistej próby prowokacyjnej umożliwia ocenę odpowiedzi ze strony oka i ułatwia różnicowanie działania alergizującego i drażniącego.

## Piśmiennictwo

1. Pałczyński C, Wittczak T, Pas-Wyroślak A. Zawodowe alergiczne zapalenie spojówek. *Alergia* 2011; 1: 30-32.
2. Wittczak T, Pas-Wyroślak A, Pałczyński C. Zawodowe alergiczne zapalenie spojówek. *Med Pr* 2007; 58: 125-130.
3. Abelson MB, George MA, Garofalo C. Differential diagnose of ocular allergic disorders. *Ann Allergy* 1993; 70: 95-109.
4. Misiuk-Hojło M, Stroszyńska-Lipowicz D, Hill-Bator A. Alergiczne schorzenia narządu wzroku. *Terapia* 2009; 17: 19-23.
5. Leonardi A, Battista MC, Gismondi M i wsp. Antigen sensitivity evaluated by tear - specific and serum-specific IgE, skin tests, and conjunctival and nasal provocation tests in patients with ocular allergic disease. *Eye* 1993; 7: 461-464.
6. Bousquet J, Heinzerling L, Bachert C, i wsp. Practical guide to skin-prick tests in allergy to aeroallergens. *Allergy* 2012; 67:18-24.
7. Abelson MB, Chambers WA, Smith LM. Conjunctival allergen challenge: a clinical approach to studying allergic conjunctivitis. *Arch Ophthalmol* 1990; 108: 84-88.
8. Abelson MB, Loeffler O. Conjunctival allergen challenge: Models in the Investigation of Ocular Allergy. *Curr Allergy and Asthma Rep* 2003; 3: 363-368.
9. Wiszniewska M, Pas-Wyroślak A, Pałczyński C, Walusiak-Skorupa J. Eosinophilia in conjunctival tear fluid among patients with pollen allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2011; 107: 281-282.



10. Krakowiak A, Kręcis B, Pas-Wyroślak A i wsp. Occupational contact dermatitis with rhinoconjunctivitis due to Tiliacordata and colophonium exposure in a cosmetician. *Contact Dermatitis* 2004; 51: 34.
11. Wittczak T, Pas-Wyroślak A, Pałczyński C. Occupational allergic conjunctivitis due to coconut fibre dust. *Allergy* 2005; 60: 970-971.
12. Małolepszy J, Liebhart J, Wojtyniak B i wsp. Występowanie chorób alergicznych w Polsce. *Alergia Astma Immunol* 2000; 5: 163-169.
13. Walusiak J. Alergia IgE-zależna układu oddechowego o etiologii zawodowej u narażonych na alergeny zbóż i enzymy piekarnicze. Oficyna Wydawnicza IMP Łódź 2005.
14. Palmares L, Delgado L, Cidade M i wsp. Allergic conjunctivitis; a national cross-sectional study of clinical characteristics and quality of life. *Eur J Ophthalmol* 2010; 20: 257-264.
15. Bogacka E, Górski P, Groblewska A i wsp. Polski konsensus diagnostyki i leczenia chorób alergicznych narządu wzroku. *Klin Oczna* 2008; 4-6: 219-226.
16. Wittczak T, Krakowiak A, Walusiak J i wsp. Challenge testing in the diagnosis of occupational allergic conjunctivitis. *Occup Med* 2007; 57: 532-534.
17. Mortemousque B. Conjunctival provocation test. *J FrOphtalmol* 2007; 30: 300-330.
18. Bonini S, Bonini S, Vecchione A i wsp. Inflammatory changes in conjunctival scrapings after allergen provocation in humans. *J Allergy ClinImmunol* 1990; 82: 462-469.
19. Bonini S, Tomassini M, Bonini S i wsp. The eosinophil has a pivotal role in allergic inflammation in the eye. *Int Arch Allergy Immunol* 1992; 99: 354-358.
20. Górski P, Krakowiak A, Pazdrak K i wsp. Nasal challenge test in the diagnosis of allergic respiratory diseases in subjects occupationally exposed to high molecular allergen. *Occup Med* 1998; 48: 91-97.
21. Pignatti P, Pala G, Pisati M i wsp. Nasal blown secretion evaluation in specific occupational nasal challenges. *Int Arch Occup Environ Health* 2010; 83: 217-223.