

Aleksandra Górską¹, Marta Chełmińska²¹Klinika Alergologii Akademii Medycznej w Gdańsku

Kierownik: dr hab. med. Ewa Jassem, prof. Akademii Medycznej w Gdańsku

²Katedra Pneumonologii i Alergologii Akademii Medycznej w Gdańsku

Kierownik: prof. dr hab. med. Jan M. Słomiński

Próba prowokacji spojówek standardowymi wyciągami alergenów

Conjunctival provocation test with standardised allergens extracts

Abstract

The conjunctival provocation test (CPT) is used to evaluate the ocular effects induced by allergen after topical application on the surface of the eye. This review summarizes the indications to CPT, technical aspects of the test, the criteria of inclusion and exclusion to CPT, the role of tear inflammatory mediators in the pathogenesis of the ocular allergic response. Presented are also the results of the latest clinical and experimental studies and new achievements in DNA technology.

Key words: conjunctiva, allergic conjunctivitis, conjunctival provocation test, allergens

Pneumonol. Alergol. Pol. 2007; 75: 273–277

Streszczenie

Próba prowokacji spojówek (CPT) jest badaniem, w którym ocenia się odpowiedź alergiczną narządu wzroku na dospójówkowe podanie alergenu. W pracy omówiono zastosowanie CPT, metodykę jej wykonania, ocenę objawów klinicznych, działania niepożądane, a także zmiany w składzie łez. Przedstawiono również wyniki ostatnich badań klinicznych z zastosowaniem CPT oraz kierunki rozwoju i najnowsze osiągnięcia biologii molekularnej.

Słowa kluczowe: spojówka, alergiczne zapalenie spojówek, próba prowokacji spojówek, alergeny

Pneumonol. Alergol. Pol. 2007; 75: 273–277

Wprowadzenie

Próba prowokacji spojówek (CPT, *conjunctival provocation test*) jest badaniem, w którym ocenia się nasilenie objawów ocznych po podaniu określonej substancji (najczęściej alergenu) do worka spojówkowego. W praktyce próbę tę stosuje się głównie w rozpoznawaniu chorób alergicznych oczu [1]. W przypadku próby dodatniej stwierdza się objawy podobne do występujących w alergicznym zapaleniu spojówek [2].

Wskazania do wykonania CPT

Próba prowokacji spojówek jest wskazana u osób z dodatnimi wynikami punktowych testów

skórnych (SPT, *skin prick test*), u których wywiad i objawy oczne wskazują na alergię (w celu potwierdzenia istotności klinicznej danego alergenu) oraz u pacjentów, u których występują rozbieżności pomiędzy wywiadem a wynikami SPT (w celu identyfikacji patogennego alergenu). Badanie należy przeprowadzić w okresie wolnym od dolegliwości lub w okresie remisji. Nasilenie reakcji alergicznej ze strony spojówek po CPT umożliwia ostateczne potwierdzenie rozpoznania i podjęcie decyzji o wprowadzeniu leczenia, na przykład immunoterapii [3].

Istnieją doniesienia o dodatnich wynikach CPT u osób z ujemnymi wynikami SPT, z podejrzeniem alergicznego zapalenia spojówek bez udokumentowanej choroby atopowej [1]. Spojówki są w takiej sytuacji jedynym wrażliwym na alergen

Adres do korespondencji: Aleksandra Górską, Klinika Alergologii Akademii Medycznej w Gdańsku, ul. Dębinki 7, 80–211 Gdańsk

Praca wpłynęła do Redakcji: 22.01.2007 r.

Copyright © 2007 Via Medica

ISSN 0867–7077

regionem organizmu, a we łzach zwykle stwierdza się przeciwciała typu IgE. W takich przypadkach jednak ważne jest wykluczenie innej choroby lub toksycznego działania wyciągu alergenowego przed ostatecznym rozpoznaniem alergicznego zapalenia spojówek.

Inne zastosowanie CPT

Próbę prowokacji spojówek wykorzystuje się także do oceny i porównania skuteczności leków przeciwzapalnych, przeciwhistaminowych oraz obkurczających naczynia krwionośne [4, 5]. Ocenę skuteczności działania nowych preparatów stosowanych w sezonowym zapaleniu spojówek wykonuje się w okresie aktywności choroby. Należy wówczas dokładnie określić porę roku najbardziej odpowiednią do przeprowadzenia badania [4].

Metodyka wykonania CPT

Prowokację zawsze poprzedzają badania interakcyjne i okulistyczne [6]. W ciągu jednego dnia można ocenić najwyżej 2 alergeny. Prowokacja drugim alergenem może być wykonana tylko wtedy, gdy reakcja na pierwszy alergen nie była silniejsza od reakcji na roztwór kontrolny (zazwyczaj używa się rozcieńczalnika stosowanego do wytwarzania roztworów alergenowych). Najpierw zakrapla się do dolnej części worka spojówkowego „oka kontrolnego” 50 μ l rozcieńczalnika. Jeżeli nie wystąpi reakcja, do worka spojówkowego „oka badanego” podaje się 50 μ l wyciągu alergenowego o najniższym stężeniu (1000 BE). Najczęściej odpowiedź na prowokację ocenia się na podstawie klinicznych objawów: swędzenia, obrzęku, zaczerwienienia i łzawienia. Jeżeli po 10–20 minutach wynik badania jest negatywny, prowokację powtarza się. Wykonuje się ponowną próbę z kontrolnym roztworem, a do „oka badanego” zakrapla się wyciąg alergenowy o wyższym stężeniu (10 000 BE). Jeśli nie obserwuje się objawów zapalenia spojówek, wynik CPT uważa się za ujemny [7].

Technika wykonania CPT w celu oceny i porównania skuteczności leków stosowanych do spojówkowo różni się od wyżej opisanej prowokacji spojówek służącej do ustalenia czynnika wywołującego objawy zapalenia alergicznego. W przypadku oceny skuteczności leków badanie kliniczne składa się z kolejnych wizyt, podczas których wykonuje się obuoczną CPT zgodnie z dodatnimi wynikami SPT. Obuoczna prowokacja pozwala uzyskać symetryczną reakcję zapalną, niezbędną do oceny skuteczności badanego preparatu. Podczas pierwszej wizyty, stosując coraz większe stężenia

alergenu, osiąga się progową reakcję alergiczną. Podczas drugiej wizyty, 3 dni później, wykonuje się CPT z najwyższym stężeniem alergenu, które wywołało dodatni wynik CPT, aby potwierdzić powtarzalność reakcji alergicznej i wyeliminować efekt kumulacji dawek alergenu. Podczas trzeciej wizyty, po kolejnych 3 dniach, chory otrzymuje badany lek do jednego oka, a placebo do drugiego. Po 10 minutach wykonuje się obuoczną CPT wcześniej określoną dawką alergenu. Opisaną procedurę wykonuje się z zastosowaniem metody podwójnie ślepej próby.

Występowanie objawów reakcji alergicznej ocenia się w 3., 10. i 20. minucie po prowokacji za pomocą skali Abelsona. W celu oceny czasu działania leku podanego do spojówkowo powtarza się prowokację alergenem 4 godziny później [8].

Niektórzy autorzy zalecają wydłużenie okresu pomiędzy kolejnymi wizytami, na przykład z 3 do 7 dni, aby zmniejszyć prawdopodobieństwo wystąpienia nakładania się reakcji alergicznej po CPT [1].

W przypadku CPT wykonywanego w celu rozpoznania uczulającego alergenu wyciągi alergenowe do prowokacji do spojówkowej, w postaci liofilizatu, należy rozpuścić przy użyciu dostarczonego przez producenta rozcieńczalnika bezpośrednio przed prowokacją. Do prowokacji wykorzystuje się pojedyncze alergeny. Zawartość alergenu określa się w jednostkach biologicznych, zgodnie z międzynarodowymi standardami. Dawka alergenu do prowokacji diagnostycznych jest podana przez producenta — jest ona niższa niż w wyciągach stosowanych w SPT. Natomiast do celów naukowych z reguły stosuje się wyższe dawki [1].

Ocena objawów klinicznych

Istnieje wiele metod oceny nasilenia reakcji spojówek po prowokacji alergenem, takich jak stopniowanie reakcji klinicznej, pomiar temperatury spojówek, badanie cytologiczne i pomiar stężenia mediatorów reakcji zapalnej we łzach [1].

Metoda oceny objawów klinicznych według Abelsona [8] polega na monitorowaniu następujących objawów: zaczerwienienia (0–3+), chemozy, czyli obrzęku spojówek (0–3+), łzawienia (0–3+), świądu (0–4+). Próba jest dodatnia, jeśli występuje nasilony świąd ($\geq 2+$) i zaczerwienienie ($\geq 1+$) lub łączna ocena wszystkich objawów wynosi co najmniej 3+.

Riechelmann i wsp. [7] zastosowali skalę stopniową:

- 0 brak subiektywnej reakcji i widocznych objawów;
- I swędzenie, zaczerwienienie, uczucie obecności ciała obcego;

- II stopień I oraz łzawienie, nastrzyknięcie spojówki gałki ocznej i mięska;
- III stopień II oraz nacieczenie spojówki tarczki i światłowstręt;
- IV stopień III oraz obrzękowe nacieczenie spojówki (chemoza) i obrzęk powiek.

Wynik CPT jest uważany za dodatni, jeśli objawy odpowiadają co najmniej II stopniowi według Riechelmana. Zwykle dodatnia reakcja rozwija się po 2–3 minutach. Uczucie świądu jest najczęściej pierwszym objawem odpowiedzi, ale może też być wynikiem nieswoistego podrażnienia (wynik CPT fałszywie dodatni), wówczas świąd jest odczuwany również w „oku kontrolnym” [7].

Działania niepożądane

W trakcie wykonania CPT istnieje ryzyko nasilonej reakcji miejscowej, a nawet ogólnej. Podczas badania chory powinien się znajdować pod stałą obserwacją lekarską. W razie nasilonej reakcji miejscowej należy przepłukać worek spojówkowy roztworem soli fizjologicznej, a następnie można podać krople obkurczające naczynia. Przy wystąpieniu reakcji ogólnej konieczne jest podanie adrenaliny domięśniowo.

Zmiany w składzie łez po wykonaniu CPT

Próba prowokacji spojówek umożliwia poznanie patofizjologii ocznej reakcji alergicznej, odpowiedzi komórkowej oraz uwolnienia mediatorów reakcji zapalnej.

W sezonowym zapaleniu spojówek alergen zakroplony do worka spojówkowego wywołuje IgE-zależną degranulację komórek tucznych, typową odpowiedź alergiczną typu I z obrzękiem spojówek, zaczerwienieniem, wodnistą wydzieliną i świądem. W całorocznym zapaleniu spojówek swoiste IgE przeciwko epitopom kurzu domowego wykrywa się we łzach, potwierdzając, że jest to odpowiedź natychmiastowa typu I, zwykle krótkotrwała i niekoniecznie prowadząca do przedłużonego stanu zapalnego.

Próba prowokacji alergenem może wywołać także reakcję opóźnioną, zaczynającą się 4–6 godzin po podaniu alergenu. Wiąże się to ze znacznym wzrostem nacieku eozynofili i bazofili w śluzówce, co tłumaczy występowanie objawów stanu zapalnego utrzymującego się przez dłuższy czas [2, 9].

Bezpośrednio po wykonaniu CPT można wykryć we łzach wzrost mediatorów reakcji zapalnej: histaminy, serotoniny, heparyny, tromboksanów, leukotrienów B₄, C₄, D₄, kinin, PGD₂ oraz aktywności esterazy i tryptazy [1, 6]. Badanie składu łez

jest użyteczną metodą w diagnostyce alergii oka. Podczas reakcji alergicznej we łzach występują przeciwciała IgE i wysokie stężenie tryptazy, a także interleukiny 4 (IL-4, *interleukin* 4) [10, 11].

Próba prowokacji spojówek jest idealnym modelem do badania udziału nabłonka w zapaleniu alergicznym. Przeprowadzono liczne badania reakcji opóźnionej za pomocą prowokacji spojówek alergenem i stwierdzono, że jest ona zależna od dawki. Niskie stężenia antygeny powodują wystąpienie natychmiastowej nadwrażliwości z charakterystycznymi objawami klinicznymi, obecnością neutrofili i eozynofili w zeszkrobinach spojówkowych. Ta reakcja następnie stopniowo wygasa i zanika w ciągu godziny po prowokacji. Wysoka dawka antygeny wywołuje intensywną reakcję kliniczną z wyraźnym naciekiem neutrofilowym, a objawy utrzymują się znacznie dłużej i zanikają po 24–48 godzinach [1, 2].

Wyniki badań klinicznych

Garcia Robaina i wsp. [12] zastosowali CPT i próbę prowokacji oskrzeli (BPT, *bronchial provocation test*) alergenami *Blomia tropicalis* i *Dermatophagides pteronyssinus* u chorych na alergiczne zapalenie błony śluzowej nosa i spojówek i/lub na astmę oskrzelową, uczulonych na kurz w ocenie reakcji krzyżowej pomiędzy tymi alergenami. Wykonali 64 próby prowokacji spojówek u 32 pacjentów (32 CPT z *Dermatophagides pteronyssinus* i 32 CPT z *Blomia tropicalis*) oraz 30 prób prowokacji oskrzeli u 15 chorych na astmę oskrzelową (po 15 z każdym z alergenów). Uzyskali: 79,7% dodatnich wyników CPT (51 na 64 przeprowadzonych CPT), w tym 62,5% u osób uczulonych na *Blomia tropicalis* (u 20 na 32 chorych) i 100% u osób uczulonych na *Dermatophagides pteronyssinus* (u 31 chorych); 76,6% dodatnich wyników BPT (23 na 30 przeprowadzonych BPT), w tym 81,8% u osób uczulonych na *Blomia tropicalis* (u 9 z 11 chorych) i 93,3% u uczulonych na *Dermatophagides pteronyssinus* (u 14 na 15 badanych). Chorzy uczuleni na oba alergeny wykazywali dodatnią BPT tylko na 1 z nich (u 1 osoby uzyskano dodatni wynik BPT z *Blomia tropicalis*). Stwierdzono, że pomimo istnienia alergicznego reakcji krzyżowej między badanymi alergenami *in vitro*, objawy kliniczne wywołane inhalacją antygeny są swoiste.

Brito i wsp. [13] opisali wykonanie CPT i BPT w celu identyfikacji uczulającego alergenu *Vitis vinifera* u chorego na alergiczne zapalenie błony śluzowej nosa i spojówek oraz astmę oskrzelową, uczulonego na pyłek winorośli. Po uzyskaniu dodatnich wyników SPT i sIgE przeprowadzili pró-

by prowokacji CPT i BPT, uzyskując pozytywne wyniki.

Reijula i wsp. [14] w swoim badaniu zastosowali CPT w ocenie częstości występowania alergii na grzyby, głównie *Alternaria alternata* i *Cladosporium herbarum*, u osób z jej podejrzeniem. Uzyskali dodatnie wyniki SPT z *Alternaria alternata* u 2,8% badanych, z *Cladosporium herbarum* u 2,7%. Próbę prowokacji spojówek przeprowadzono u osób z objawami alergicznego zapalenia błony śluzowej nosa i spojówek oraz dodatnimi wynikami SPT, uzyskując: dodatnią CPT u 57% (u 4 z 7 pacjentów) uczulonych na *Alternaria alternata* i u 85,7% (u 6 na 7 pacjentów) uczulonych na *Cladosporium herbarum*.

Mortemousque i wsp. [15] wykorzystali CPT do oceny skuteczności i bezpieczeństwa stosowania swoistej immunoterapii podjęzykowej u pacjentów z całorocznym zapaleniem spojówek powodowanym przez alergeny kurzu (u 26 chorych w grupie badanej oraz u 19 osób w grupie kontrolnej). Rozpoznanie potwierdzono, wykonując SPT z wyciągami alergenowymi *Dermatophagides pteronyssinus* i *Dermatophagoides farinae*, oznaczając sIgE w surowicy oraz wywołując objawy zapalenia spojówek za pomocą CPT. Próbę prowokacji spojówek wykonano u każdego pacjenta przed leczeniem oraz po 6, 12, 18 i 24 miesiącach immunoterapii. Badanie przeprowadzano z zastosowaniem alergenu *Dermatophagides pteronyssinus* w zwiększających się stężeniach, a objawy oceniano 10 minut po podaniu alergenu. Autorzy wykazali zwiększenie stężenia wyciągu alergenowego, który wywoływał dodatnią reakcję w CPT ocenianą według Abelsona na co najmniej 5 punktów, z 8,2 IR (*index of reactivity*) przed rozpoczęciem leczenia do 21,7 IR po 2 latach stosowania swoistej immunoterapii. W grupie osób otrzymujących placebo nie wykazano zmiany stężenia roztworu alergenu wywołującego dodatni wynik CPT, wynosiło ono 8,1 IR. Suma punktów w skali oceniającej nasilenie objawów zapalnych po CPT była niższa wśród pacjentów otrzymujących szczepionkę po 18 i 24 miesiącach terapii. Badanie to potwierdziło wartość CPT w ocenie skuteczności leczenia alergii.

Ciprandi i wsp. [16] zastosowali CPT w ocenie nadreaktywności na histaminę u osób z alergicznym zapaleniem spojówek, wywoływanym przez *Dermatophagides pteronyssinus* lub *Parietaria judaica*. W badaniu wzięli udział chorzy z udokumentowanym alergicznym zapaleniem spojówek, trwającym od co najmniej 2 lat (dodatnie wyniki SPT, testu radioalergosorpcji [RAST, *radioallergosorbent test*] [sIgE], CPT z odpowiednim alergenem). Podawano 10 ml chlorowodoru histaminy

do worka spojówkowego prawego oka w 10-minutowych odstępach, w stężeniach wzrastających (od 0,005 do 0,3 mg/ml), aż do osiągnięcia dawki prowokującej (takiej dawki, która wywołuje odpowiedź kliniczną wyrażoną intensywnym przekrwieniem spojówki), a roztwór albuminy (0,03%) do worka spojówkowego lewego. Autorzy wykazali nadreaktywność na histaminę tylko w grupie pacjentów uczulonych na *Dermatophagides pteronyssinus*, co powiązali z istnieniem minimalnego trwałego stanu zapalnego spojówek u tych osób.

Bacon i wsp. [2] zastosowali CPT do oceny sekcji mediatorów reakcji zapalnej odpowiedzi typu I i reakcji opóźnionej we łzach u chorych na sezonowe zapalenie spojówek. Po wykonaniu SPT podano odpowiedni alergen bądź mieszanek alergenów w kroplach o objętości 30 μ l do worka spojówkowego badanego oka, a do przeciwnego — roztwór albuminy jako substancję kontrolną. Autorzy potwierdzili, że komórki tuczne są odpowiedzialne za reakcję wczesną (wysokie stężenia histaminy i tryptazy we łzach), a bazofile są zaangażowane w reakcję opóźnioną. Podobne badanie nad obecnością mediatorów reakcji zapalnej we łzach przeprowadzili Vesaluoma i wsp. [10]. Oceniali oni wartość czynnika martwicy nowotworów α (TNF α , *tumor necrosis factor alpha*) we łzach u osób z rozpoznaną atopią przed wykonaniem CPT i po badaniu. Autorzy stwierdzili, że TNF α jest mediatorem wczesnej odpowiedzi alergicznej po przeprowadzeniu CPT.

Próbie prowokacji spojówek można stosować w ocenie skuteczności przeciwalergicznego kortykosteroidów ocznych i ustalaniu najefektywniejszego stężenia preparatu. Abelson i wsp. [4] przeprowadzili takie badanie w 2 etapach. Najpierw ocenili użyteczność CPT w ocenie skuteczności działania preparatu kortykosteroidowego, stosując go przez 28 dni do jednego oka, a placebo do oka drugiego i przeprowadzając CPT z uczulającym alergenem w 0., 7., 21. i 28. dniu. Oceniali nasilenie objawów alergicznego zapalenia spojówek występujących po prowokacji w 3., 10. i 20. minucie. Następnie zastosowali CPT do oceny skuteczności różnych stężeń kortykosteroidu, porównania ich działania i wyznaczenia najefektywniejszej dawki leku.

Kierunki rozwoju

W ostatnich latach rozwój biologii molekularnej umożliwił uzyskanie rekombinowanych cząsteczek alergenów do celów diagnostycznych i terapeutycznych. Produkuje się zestawy rekombinowanych alergenów zawierające kompleksy epitopów

odpowiadające naturalnie pozyskiwanym alergenom. Wyciągi alergenowe do prowokacji są przechowywane i przygotowywane tak samo jak tradycyjne ekstrakty alergenów. Przy prowokacji kilkoma alergenami zaleca się przeprowadzenie badania wyciągami poszczególnych rekombinowanych alergenów w 2-tygodniowych odstępach [17]. Van Hage-Hamsten i Pauli [17] wykorzystali CPT jako metodę oceniającą aktywność biologiczną nowych alergenów pyłku brzozy, izoform rBet v 1a i rBet v 1d. Przeprowadzili próby prowokacji spojówek wśród pacjentów uczulonych na pyłek brzozy obydwoma izoformami alergenu. Żaden z pacjentów nie zareagował na rBet v 1d, natomiast rBet v 1a wywołał dodatni wynik CPT u 68,75% osób (u 33 na 48 badanych) w najwyższym stężeniu (10 µg/ml); w niższych stężeniach u żadnego z pacjentów nie stwierdzono dodatniego wyniku testu. Autorzy zasugerowali, że rBet v 1d mógłby być wykorzystywany w immunoterapii swoistej u osób z alergią na pyłek brzozy [17].

Mimo że próby prowokacji spojówek od dawna są powszechnie wykorzystywane, istnieją pewne niedoskonałości w ocenie objawów spojówkowej odpowiedzi zapalnej. Stosowanie wielu metod tej oceny wskazuje, że żadna nie jest w pełni obiektywna i powtarzalna [1]. Nadal poszukuje się tak zwanego złotego standardu, który w sposób prosty, pewny i niedrogi pozwoli uzyskać obiektywne i powtarzalne wyniki tej niezbędnej w diagnostyce alergii oka próby [18].

Piśmiennictwo

- Melillo G., Bonini S., Cocco G. i wsp. EAACI provocation tests with allergens. Report prepared by the European Academy of Allergology and Clinical Immunology Subcommittee on provocation tests with allergens. *Allergy* 1997; 52: 1–35.
- Bacon A.S., Ahluwalia P., Irani A.M. i wsp. Tear and conjunctival changes during the allergen-induced early- and late-phase responses. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2000; 106: 948–954.
- Valovirta E., Jacobson L., Ljorring C. i wsp. Clinical efficacy and safety of sublingual immunotherapy with tree pollen extract in children. *Allergy* 2006; 61: 1177–1183.
- Abelson M.B., Howes J., Geprge M. The conjunctival provocation test model of ocular allergy: utility for assessment of an ocular corticosteroid, loteprednol etabonate. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 1998; 14: 533–542.
- Yoshihiro D., Tadao E., Lei Ch. i wsp. Effect of antihistamine eye drops on the conjunctival provocation test with Japanese cedar pollen allergen. *Allergology International* 2006; 55: 373–378.
- Usowska A., Rapiejko P. Alergiczne zapalenie spojówek. *Terapia* 2001; 3: 12–23.
- Riechelmann H., Eppe B., Gropper G. Comparison of conjunctival and nasal provocation test in allergic rhinitis to house dust mite. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2003; 130: 51–59.
- Abelson M.B., Chambers W.A., Smith L.M. Conjunctival allergen challenge: a clinical approach to studying allergic conjunctivitis. *Arch. Ophthalmol.* 1990; 108: 84–88.
- Abelson M.B., George M.A., Garofalo Ch. Differential diagnosis of ocular allergic disorders. *Ann. Allergy* 1993; 70: 95–109.
- Vesaluoma M., Rosenberg M.E., Teppo A.M. i wsp. Tumor necrosis factor alpha (TNFα) in tears of atopic patients after conjunctival allergen challenge. *Clin. Exp. Allergy* 1999; 29: 537–542.
- Zaleska-Żmijewska A., Szaflik J. Objawy i leczenie alergii narządu wzroku. *Alergia* 2006; 2: 10–12, 15–16.
- Garcia Robaina J.C., Sanchez Machin I., Fernandez Caldas E. i wsp. Skin tests and conjunctival and bronchial challenges with extracts of *Blomia tropicalis* and *Dermatophagoides pteronyssinus* in patients with allergic asthma and/or rhinoconjunctivitis. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2003; 131: 182–188.
- Brito F., Martinez A., Palacios R. i wsp. Rhinoconjunctivitis and asthma caused by vine pollen: a case report. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1999; 103: 262–266.
- Reijula K., Leino M., Mussalo-Rauhamaa H. i wsp. IgE-mediated allergy to fungal allergens in Finland with special reference to *Alternaria alternata* and *Cladosporium herbarum*. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2003; 91: 280–285.
- Mortemousque B., Bertel F., De Casamayor J. i wsp. House-dust mite sublingual-swallow immunotherapy in perennial conjunctivitis: a double-blind, placebo-controlled study. *Clin. Exp. Allergy* 2003; 33: 464–469.
- Ciprandi G., Buscaglia S., Pesce P. i wsp. Ocular challenge and hyperresponsiveness to histamine in patients with allergic conjunctivitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1993; 91: 1227–1230.
- Van Hage-Hamsten M., Pauli G. Provocation testing with recombinant allergens. *Methods* 2004; 32: 281–291.
- Mortemousque B., Fauquert J.L., Chiambaretta F. i wsp. Conjunctival provocation test: recommendations. *J. Fr. Ophthalmol.* 2006; 29: 837–846.