

## A CURA DI SOPTI SOCIETÀ OPTOMETRICA ITALIANA

# BREAK UP TIME E OSMOLARITÀ LACRIMALE NELL'OCCHIO SECCO IPER-EVAPORATIVO

PIETRO GHELLER, FABRIZIO FONTANA, LORENZO MAFFEZZONI, ALBERTO SPELTA

### ABSTRACT

**Scopo.** Il Break Up Time (BUT) con fluoresceina è uno dei più diffusi test eseguiti in Italia, mentre lo studio sull'osmolarità è stato definito l'esame oggi più preciso per evidenziare un quadro iniziale di occhio secco marginale. Il nostro obiettivo è stato quello di provare a relazione il BUT con l'esame di osmolarità.

**Metodo.** Sono stati reclutati 64 studenti di età compresa tra i 22 e i 30 anni.

L'applicazione dei criteri di inclusione ed esclusione ha portato alla selezione di un campione complessivamente formato da 54 persone (29 maschi e 25 femmine), per un totale di 108 occhi (tutti non portatori di LAC).

La popolazione campione è stata sottoposta al questionario di McMonnies per evidenziare una condizione di occhio secco marginale.

Tutti sono stati esaminati in due fasce di orario (8-9 h. del mattino e ancora dalle 11-12 h), nello stesso ambiente e dagli stessi esaminatori. Sono stati eseguiti in seguito: Tearlab, BUT, Verde di Lissamina, solo prima fascia oraria (8-9 h), mentre nella seconda (11-12 h), solo BUT e Verde di Lissamina. Quindi i dati sono stati valutati statisticamente, correlando tra loro osmolarità con BUT, BUT (8-9) con BUT (11-12) ed infine osmolarità con il Verde di Lissamina.

Le correlazioni sono state eseguite nei due gruppi differenziati dagli esiti del questionario di McMonnies: sintomatici/non sintomatici.

**Risultati.** Nonostante la difficoltà di standardizzare l'esecuzione del BUT, abbiamo trovato una buona correlazione tra BUT (8-9/11-12); Pearson 0,790 (occhi sintomatici) e Pearson 0,629 (occhi non sintomatici). Gli estremi dei valori medi misurati di BUT negli occhi non sintomatici sono 7,81 s (max) e 5,27 s (min), mentre negli occhi sintomatici di 7,00 s (max) e 4,40 s (min). La correlazione evidenziata tra BUT e osmolarità ha dimostrato che al diminuire del primo c'è un'aumento della seconda (Pearson: 0.646). Non è risultata una evidente relazione tra osmolarità e risultati al questionario di McMonnies: le curve di frequenza normalizzata tendono a sovrapporsi. Verde di Lissamina e osmolarità non sembrerebbero presentare correlazione: solo in condizioni di evidenti colorazioni allo staining vitale, i valori di osmolarità sono molto alterati.

**Conclusioni.** Di sicuro il test dell'osmolarità è un test di riferimento sia come precisione di dati che per facilità di esecuzione. Rispetto alle norme definite da Norn, come evidenziato nelle recenti pubblicazioni, il BUT sembrerebbe identificare una condizione normale con tempi molto più bassi. Il Verde di Lissamina non sembrerebbe essere un test ben correlabile al sintomo di occhio secco e il questionario di McMonnies appare più uno strumento di screening che non uno di diagnosi.

**Keywords.** Break Up Time, osmolarità, Verde di Lissamina, questionario di McMonnies

## INTRODUZIONE

L'abbandono dell'uso delle lenti a contatto da parte dei portatori è sicuramente "un'emorragia" di dimensioni rilevanti nel mercato contattologico. La consapevolezza del fenomeno è cresciuta solo negli ultimi anni<sup>1-2</sup>, anche perché il flusso in crescita (ovvero il Drop Out) viene nascosto dalle nuove applicazioni che mantengono pressoché fermo il numero totale di portatori di lenti a contatto nel mondo (l'entità del fenomeno oscilla comunque a seconda del paese considerato). Diversi studi hanno analizzato le cause dell'abbandono delle lenti a contatto da parte dei portatori<sup>3</sup>, evidenziando che il motivo più importante è la perdita di comfort. Altri motivi sembrano essere la secchezza oculare (Dry Eye), le problematiche gestionali, la scarsa visione per lontano e/o vicino, l'arrossamento oculare e la sostenibilità dei costi. Diversi fattori possono inoltre intervenire negativamente, concorrendo a determinare il fenomeno del Drop Out. Comprendere le cause e i fattori d'influenza alla base dell'abbandono delle lenti a contatto è una sfida che impegna clinici e ricercatori nel tentativo di arginare il fenomeno. Il Dry Eye (in italiano occhio secco) è una comune e complessa condizione che può ridurre il comfort oculare e le performance visive<sup>4</sup>. Nel 2006 un pool di esperti di occhio secco usò il cosiddetto metodo "Delphi" per stabilire le diagnosi e le linee guida nel trattamento dell'occhio secco. Questo approccio venne usato (con successo) al fine di standardizzare diagnosi e trattamenti nelle malattie cardiovascolari<sup>5</sup>. Vennero abbozzati quattro livelli di gravità del disagio e in aggiunta raccomandazioni per pazienti con problemi al margine palpebrale e nella distribuzione della lacrima. Queste linee guida in origine si concentrarono su segni e sintomi dei pazienti e furono accompagnate dal fatto che il termine "sindrome da disfunzione lacrimale", potesse sostituire il termine "disagio da occhio secco"<sup>6</sup>. Il "Dry Eye Workshop" (DEWS) non adottò il termine "sindrome da disfunzione lacrimale", ma ridefinì l'occhio secco come "un disagio multifattoriale delle lacrime e della superficie oculare che si presenta con sintomi come il discomfort, disturbi visivi e instabilità del film lacrimale con un potenziale danneggiamento della superficie oculare, accompagnato da un aumento dell'osmolarità lacrimale e da infiammazione della superficie oculare"<sup>7</sup>. Le due principali classi di occhio secco riconosciute dal report del DEWS furono "occhio secco da mancanza d'acqua" e "occhio secco evaporativo". Nell'occhio secco iperevaporativo si è osservato che il primo valore che si segnala è la tendenza iperosmolare. L'iperosmolarità lacrimale potrebbe essere il risultato dell'aumento di evaporazione o della ridotta secrezione di acqua. L'incremento della concentrazione di proteine ed elettroliti causa una riduzione del volume di lacrima che

inizialmente irrita la superficie oculare, ma poi genera infiammazione, e il successivo danneggiamento (nell'occhio secco evaporativo) porta alla riduzione dello strato lipidico che incrementa di conseguenza l'evaporazione<sup>8,9</sup>.

### Valutazione Soggettiva

L'esame di un paziente con occhio secco parte inevitabilmente con la sua storia clinica e con i suoi sintomi; c'è comunque spesso una correlazione tra la gravità dei sintomi e i segni che presenta un occhio secco<sup>10,11,12,13,14</sup>. La ridotta sensibilità della superficie oculare è stata documentata come un normale cambiamento legato all'età che avanza<sup>15</sup> e come una conseguenza del porto di Lac<sup>16</sup>. La sintomatologia è molto ampia e include secchezza, sensazione di presenza di granelli di sabbia, rossore, bruciore, fotofobia, affaticamento oculare; la variabilità della sintomatologia riportata può essere semplificata grazie ad una lista di domande che ha l'obiettivo di "differenziare" i diversi soggetti affetti da occhio secco.

I questionari omologati sono disponibili per assicurare una corretta valutazione della sintomatologia. Sono costituiti da una serie di domande e un punteggio numerico viene attribuito ad ogni risposta in accordo con il sintomo manifestato dal paziente. Grazie ad essi il paziente può essere "monitorato" semplicemente comparando i vari punteggi. I più utilizzati sono il McMonnies Dry Eye Index e il The Ocular Surface Disease Index (OSDI)<sup>17,18</sup>.

Il McMonnies è un test di screening che utilizza risposte sì/no e considera fattori di rischio epidemiologici, frequenza dei sintomi e sensibilità agli stimoli ambientali<sup>19</sup>.

### Valutazione Oggettiva

Tra i test oggettivi che più usualmente vengono adoperati e che possono facilitare il contattologo a ricercare le cause del Dry Eye marginale o iperevaporativo ci sono:

- a) Break Up Time:** il test del Tear Break - Up Time, spesso ritrovato in letteratura abbreviato come BUT o TBUT, è un test qualitativo ideato da Norn nel 1969<sup>21</sup>, atto a verificare la stabilità del film lacrimale. Venne introdotto per supportare alcuni dati presenti in un'altra ricerca di Norn<sup>22</sup>, dove vengono ipotizzati dei valori di BUT (intesi senza fluoresceina instillata) con variazioni che vanno da 3 s a 132 s con una media di 27 s. Dalla sua introduzione fino ad arrivare ai giorni nostri, il BUT rimane il principale test di riferimento citato nella letteratura scientifica mondiale e probabilmente anche il mezzo più diffuso per verificare la stabilità del film lacrimale. Secondo Norn, con la fluoresceina instillata, un valore inferiore ai 10s di tempo alla prima rottura del film lacrimale, presenta un occhio con problemi di lacrimazione significativi, con conseguente

presenza di occhio secco. Partendo dal presupposto che si conoscano le variabili generali in grado di alterare il film lacrimale, il test ha comunque sempre presentato alcune difficoltà nella sua standardizzazione e per giungere alla sua versione moderna, nel corso degli anni ha subito diverse modifiche. Nel 1985 Mengher<sup>23</sup> stabilì che valori al di sotto dei 5 s dovevano essere considerati come esplicativi per la presenza di un occhio secco patologico, mentre valori compresi fra 5 s e 10 s evidenziavano la presenza di un occhio secco marginale. Maruardt nel 1986<sup>24</sup> standardizza la quantità di fluoresceina da utilizzare nel test portando il valore a 1 µl di soluzione con una concentrazione di fluoresceina al 2%, specificando che l'utilizzo di valori superiori a 6 - 7 µl di soluzione possono interferire pesantemente con la stabilità del film lacrimale e quindi anche con il risultato del test. Cho e Douthwaite<sup>25</sup> nel 1995 per standardizzare e facilitare la misurazione, consigliarono l'utilizzo di un filtro giallo Wratten 12 posizionato sul biomicroscopio. Per quanto riguarda la ripetibilità di questo test, possiamo dire che gli studi hanno portato sia pareri positivi, sia pareri negativi. Alcuni studi di Lee e Kee<sup>26</sup> nel 1988 evidenziano la scarsa riproducibilità del test su pazienti che presentano un occhio sano, attestando una percentuale di riproducibilità del 65% su occhi normali e del 95% su occhi secchi patologici. Studi di Cho<sup>27</sup> nel 1991, attestano che su più misurazioni effettuate, si ottengono risultati differenti e si raccomanda di effettuare una media su più misurazioni. Nello specifico, su tre misurazioni effettuate in un lasso di tempo ravvicinato, il primo valore si stacca nettamente dal secondo, mentre il terzo sembra rassomigliare più al secondo che al primo. Korb nel 2001<sup>28</sup> mostra in una ricerca come l'utilizzo di strip di fluoresceina contenenti 5 volte meno fluo di normali strip migliorasse la ripetibilità del test, consigliando di utilizzare meno colorante quando è possibile. Nichols<sup>29</sup>, nel 2004 riporta dai suoi studi una ripetibilità alta (95%) usando lo stesso operatore in più misurazioni su pazienti affetti da occhio secco patologico, tesi portata avanti anche da Sullivan<sup>30</sup> nel 2012, che dopo aver effettuato il BUT su 52 pazienti monitorandoli per tre mesi più volte al giorno, trova un riscontro nei risultati che risulta essere in media con quanto affermato da Nichols. Anche Lemp<sup>31</sup> nel 2011 ha evidenziato una ripetibilità alta nei soggetti che manifestano occhio secco patologico, ma ha sottolineato una difficoltà maggiore nel differenziare soggetti normali da soggetti con occhio secco marginale (moderate), evidenziando anche come per questi ultimi occorra rinforzare i protocolli di standardizzazione per avere dati confrontabili con altri. È Cebreiro<sup>32</sup> infatti, ancora nel

2012, a sottolineare il fatto che per avere un risultato medio costante, l'esecutore deve essere allenato e esperto, altrimenti si rischia di avere risultati discordanti.

- **b) Test di Schirmer:** lo Schirmer test presenta una alta predittività nella diagnosi dell'occhio secco iposecretivo, mentre si presenta molto instabile nella valutazione dell'occhio secco iperevaporativo, anche perché di fatto la quantità lacrimale di questo tipo di occhio è normale. Non useremo quindi questo tipo di test per la nostra indagine.
- **c) Valutazione del gradiente di osmolarità:** la tonicità di una lacrima "normale" è per lo più definita dal suo contenuto di cationi (sodio, potassio, calcio, magnesio, ferro e rame) e anioni (cloruri, bicarbonati e fosfati). I metodi per la misurazione della tonicità e la loro precisione hanno subito cambiamenti nel corso di quest'ultimo secolo e mezzo. Conseguentemente i termini per esprimere il gradiente osmotico cambiarono durante questo periodo e in particolare: quantità di residui solidi (inclusi sali e sostanze organiche), quantità di sali e quantità di NaCl (cloruro di sodio, il maggior soluto). Questi termini descrivono approssimativamente, ma non esattamente, la tonicità. Le prime misurazioni non rilevavano direttamente la tonicità, ma esprimevano solamente il contenuto di sali e macromolecole. Quindi Frerichs<sup>33</sup>, nel 1841, riportò che la lacrima presentava dallo 0,94 all'1,30 per mille di solidi, inclusi sali, albumina, muco, grassi e cellule epiteliali desquamate. Negli ultimi decenni, la maggior parte degli autori espressero l'osmolarità in funzione della quantità di osmoli per litro di soluzione. Altri autori descrivono l'osmolarità in osmoli per chilogrammo. Altre varianti cliniche irrilevanti possono essere introdotte dalla temperatura e dalla pressione. In questo studio è stata utilizzata l'espressione in mOsm/L<sup>34</sup>. È stato provato che l'osmolarità lacrimale è il metodo più accurato per la diagnosi e per i successivi disagi dei pazienti con occhio secco; la sfida è stata quella di riuscire ad eseguire il test nel modo più rapido ed efficiente possibile<sup>35,36</sup>. Dalla ricerca in letteratura, è possibile apprendere che sia il test di Schirmer che lo staining corneale abbiano una stima predittiva positiva ("positive predictive values", PPV) del 31% mentre il test del Break Up Time (BUT) del 25%. Il test con la maggiore PPV, sempre stando ai dati forniti dal DEWS, è quello dell'osmolarità lacrimale (tear lab). Nella sua analisi sull'osmolarità lacrimale Tomlinson<sup>20</sup> trovò infatti che il test dell'osmolarità forniva una PPV pari all'87%. Fino a poco fa, il test veniva effettuato solitamente in un laboratorio clinico e richiedeva un ampio

“campionario” di lacrime; eseguirlo su pazienti con occhio secco significativo era quindi spesso una sfida. In ogni caso queste difficoltà diminuirono quando nel 2008 il TearLab (sistema per misurare l’osmolarità lacrimale) divenne disponibile commercialmente in Europa. Questo sistema è stato progettato per poter essere usato in qualsiasi studio di contattologia, ha una grande semplicità d’utilizzo e richiede un volume di lacrime molto limitato: 50 nL. Il report del DEWS ha concluso che la misurazione dell’osmolarità lacrimale è molto probabilmente il più importante test oggettivo nella diagnosi dell’occhio secco. Infatti l’iperosmolarità lacrimale può ragionevolmente rappresentare il marchio peculiare che caratterizza la condizione di secchezza della superficie oculare. Basandosi sulla classificazione della sindrome da occhio secco proposta dal report del DEWS, sulla meta-analisi e sulla misurazione dell’osmolarità lacrimale su occhi “normali” e “secchi” condotta da Tomlinson, possono essere prese decisioni molto buone sui trattamenti clinici da eseguire. È infine molto importante ricordare che 316 mOsm/L rappresenta la soglia, validata da molti autori (in particolare da Tomlinson), oltre la quale molto probabilmente il paziente sarà affetto da occhio secco. L’osmolarità del film lacrimale varia infatti, in condizioni di normalità, tra i 290 e i 320 mOsm/L; la pressione osmotica è dipendente principalmente dagli ioni presenti nello strato acquoso (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> e HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), ma anche dalle proteine. La corretta osmolarità del film lacrimale regola il flusso di acqua tra il film lacrimale e le cellule superficiali di cornea e congiuntiva; le lacrime a palpebre aperte devono essere leggermente ipertoniche (uguali o maggiori alla concentrazione di 1% NaCl) favorendo un flusso di acqua dalla camera anteriore attraverso la cornea, nel film lacrimale. La chiusura palpebrale riduce la pressione osmotica a causa della riduzione di concentrazione a 0,9% NaCl, a causa della riduzione dell’evaporazione (edema corneale al risveglio)<sup>37</sup>.

- **d) Coloranti vitali:** i coloranti vitali sono nella pratica clinica un ulteriore strumento utilizzato dai professionisti e certificato dal DEWS per descrivere e definire il Dry Eye; i coloranti vitali mostrano, o meglio descrivono, il disfacimento epiteliale e altri cambiamenti fisiopatologici che si possono osservare bene solamente utilizzando colorazioni topiche, note appunto come “coloranti fondamentali”<sup>38</sup>. I coloranti fondamentali consentono di visualizzare i tessuti nelle loro attività vitali<sup>39</sup>. Pflüger descrisse per primo la fluoresceina nel 1882, utilizzandola per la colorazione della cornea e della congiuntiva nei conigli<sup>40</sup>. Henrik

Sjögren introdusse il rosa di bengala nel 1933 e da allora la fluoresceina fu il colorante primario nella stadiazione della congiuntiva<sup>41</sup>. Nel 1973, Morgens Norn segnò l’avvento del Verde di Lissamina come colorante fondamentale; esso aveva caratteristiche coloranti molto simili al rosa di bengala<sup>42</sup>. Il Verde di Lissamina, un colorante acido, organico e prodotto artificialmente, è stato utilizzato nel corso della storia nei prodotti alimentari<sup>43</sup>. Fin dalla sua comparsa, le relazioni cliniche l’hanno indicato come colorante per diagnosticare i disagi della superficie oculare.

Il Verde di Lissamina colora esclusivamente le cellule epiteliali in sofferenza<sup>44</sup>. La letteratura non contiene relazioni di tossicità riguardo questo colorante che all’1% di concentrazione non viene associato a dolore o discomfort. Studi ed esperimenti clinici a riguardo hanno dimostrato che il Verde di Lissamina e il rosa di bengala forniscono un “profilo” dello staining simile; in ogni caso il verde è maggiormente tollerato dai pazienti. Il verde è solitamente il colorante preferito se si deve evidenziare la congiuntiva bulbare. In aggiunta questo colorante può essere usato per accertare la presenza di occhio secco nelle sue fasi iniziali data la sua buona sensibilità<sup>45</sup>.

## MATERIALI E METODO

### Materiali

Nel lavoro di ricerca sono stati utilizzati i seguenti materiali e/o strumenti: soluzione salina, fluoresceina, Verde di Lissamina, la lampada a fessura e biomicroscopio, tearlab.

- Soluzione salina “Salisin Comnfort”, soluzione monodose, 10 ml, Schalcon (Clear Vision). 40 microlitri a goccia.
- Fluoresceina “Bio Glo Fluorescein Sodium”, 1 strip=1 mg, Hub Pharmaceuticals, LLC.
- Verde di Lissamina “Salisin Comfort”, Lissamine green sterile strips, 1 strip=1,5 mg, distributed by Rose Stone Enterprises, 9622 Baseline Road Alta Loma CA 91701.
- Lampada a fessura CSO, HR Mega Digital Vision; modello led slit lamp SL 990 5X-D lampadina alogena 6V 20W PG22, illuminazione led, altezza fascio 12 mm, larghezza fessura 0,2 mm, angolo lampada a fessura 30°, ingrandimenti 10X, luminosità fascio massima, filtro diffusore tolto, luce blu con filtro giallo.
- Tearlab: fabbricato da TearLab Corporation, 12707 High Bluff Drive, Suite 200 San Diego, CA 92130. Tel: 1-858-455-6006. Website: www.tearlab.com. Potrebbero applicarsi uno o più sei seguenti brevetti: USA 7,017,394; 7,051,569; 7,111,502; 7,129,717; 7,204,122. 930036REV A. ©2009 TearLab Corporation. Rivenditore

autorizzato per l'Europa: Cavendish Scott Ltd. PO Box 107, SG5 1FW, England.

- Per l'analisi statistica si è usato il pacchetto Microcal Origin della OriginLab versione 8 (che è un pacchetto completo per le analisi statistiche licenziato in versione 8.9724 (copy right 212) sito web [www.originlab.co](http://www.originlab.co) One roundhouse Plaza – Northampton MA 01060 USA (0543-586-2013).

## Metodo

Lo studio osservazionale analitico di tipo caso-controllo, intende verificare se esiste una relazione tra il valore di BUT e il valore di osmolarità nelle persone che segnalano sintomi di occhio secco marginale e fra coloro che non lo segnalano. Tutti i pz sono stati informati delle finalità dello studio e il loro consenso è stato ottenuto secondo la dichiarazione di Helsinki. Nello studio si vuol anche associare il questionario di McMonnies e la colorazione vitale con il Verde di Lissamina per avvalorare la diagnosi attraverso due test di sostegno clinico, uno prettamente soggettivo e uno oggettivo di evidente sofferenza di superficie congiuntivale. Sono stati selezionati dopo somministrazione di un questionario di inclusione/esclusione 54 persone, 29 maschi e 25 femmine per un totale di 108 occhi. I soggetti dovevano avere un'età compresa fra i 19 e i 35 anni e dovevano essere in sane condizioni fisiche e oculari. Non dovevano portare lenti a contatto, non doveva essere stata diagnosticata loro recentemente (negli ultimi tre mesi) una o più patologie/problematiche oculari, non dovevano aver assunto nell'ultimo mese in modo importante, continuativo e/o terapeutico uno dei seguenti tipi di farmaci: antidolorifici, antinfiammatori, psicofarmaci, diuretici, betabloccanti, decongestionanti, farmaci per ipertensione arteriosa, cortisonici e regolatori ormonali e non dovevano essersi sottoposti a interventi di chirurgia refrattiva. Una volta selezionati, i soggetti passavano alla seconda fase del test: il questionario McMonnies, per definire la presenza o meno dell'occhio secco sintomatico. Il test in letteratura viene presentato come attendibile, ponendo una serie di 12 domande a risposta multipla dove ogni risposta colleziona un punteggio. Se alla fine del test si sono collezionati un numero di punti inclusi fra 0 e 10 possiamo affermare che il soggetto si trovi in una condizione di normalità. Un punteggio compreso fra 10 e 20 indica una situazione di occhio secco marginale, mentre, superiore ai 20 indica la presenza di un occhio secco patologico. Da questo test abbiamo diviso i pazienti fra sintomatici e non sintomatici. Nella conduzione del test del Break up time abbiamo cercato di ridurre al minimo le variabili che questo test presenta tramite vari accorgimenti. Per effettuare questo test è necessario utilizzare uno strip sterile di fluoresceina già venduto in commercio (noi

abbiamo usato la versione da 1 mg) e bagnarlo con una goccia di soluzione salina, che noi abbiamo quantificato grazie ad un dosatore in grado di definire 40 µl a goccia. Dopo aver applicato la goccia sullo strip, abbiamo utilizzato (per facilitare la ripetibilità del test) un metodo che abbiamo definito come tre-trenta-trenta. Questo metodo consiste nell'effettuare, dopo aver bagnato lo strip, tre scrollate energiche, dopodiché si aspettano trenta secondi e si applica la fluoresceina sull'occhio del paziente (prima nell'occhio destro, poi nel sinistro eseguendo un esame per volta), attendendo dopo l'inserimento altri trenta secondi prima di effettuare la misurazione, assicurandosi che il paziente ammicchi in modo lento e completo, scandendo gli ammiccamenti con la media di uno al secondo. Dopo tutto ciò si effettua la misurazione del BUT in lampada a fessura, con un fascio verticale alto 12 mm, di ampiezza 0,2 mm, alla massima intensità luminosa, senza filtro diffusore, chiaramente in luce blu con filtro giallo. Ogni dato è stato definito dalla media di tre misurazioni. Per quanto riguarda invece l'esecuzione del test del Verde di Lissamina, abbiamo utilizzato per ogni occhio esaminato uno strip corrispondente a 1,5 mg. Allo strip è stata aggiunta una goccia di soluzione salina e successivamente esso è stato "applicato" sulla congiuntiva superiore con un tocco deciso. Si è fatto ammiccare il paziente per un paio di volte e con l'ausilio della lampada a fessura, si è visualizzato lo stato di sofferenza delle cellule epiteliali, acquisendo alcune foto per ogni occhio. Il supporto offerto dalle immagini, ha facilitato la stadiazione dei vari soggetti. Il test del verde lissamina è stato condotto solamente su quei soggetti che alla classificazione del questionario risultavano come "occhio secco marginale" o "occhio secco patologico", escludendo di fatto coloro che si trovavano in una situazione di "normalità". La stadiazione è stata valutata numericamente con un punteggio minimo di 1 e uno massimo di 5. Al punteggio, è stato attribuito:

1. **valore 1** per quegli occhi che presentavano una minima presenza di cellule evidenziate (e quindi in sofferenza);
2. **valore 2** per quegli occhi che evidenziavano cellule sofferenti sia nasalmente che temporalmente;
3. **valore 3** in caso di sofferenza cellulare sia nasale che tempiale significativa;
4. **valore 4** per chi presentava colorazione nasalmente, temporalmente, superiormente ed inferiormente;
5. **valore 5** in caso di sofferenza diffusa (nasale, temporale, superiore ed inferiore) significativa. Quelle nasali, temporali, superiori ed inferiori le abbiamo intese come "aree" tutte appartenenti alla congiuntiva.

Infine il test che abbiamo convenuto essere (grazie all'ausilio dei dati statistici rilevati e presenti in letteratura) il più oggettivo: la valutazione dell'osmolarità, attraverso



il Tearlab. Questo strumento elettronico va collegato e attivato almeno mezz'ora prima dall'inizio delle rilevazioni per consentirne la taratura. Una volta tarato, si applica allo strumento una testina monouso, ci si avvicina all'occhio del soggetto e lo si appoggia delicatamente tra la congiuntiva inferiore e il margine palpebrale inferiore. È necessario che il soggetto esaminato sia rilassato: in questo caso il paziente non sentirà dolore alcuno: se invece il soggetto è in tensione si consiglia di aspettare, al fine di evitare inconvenienti, poiché la testina è a diretto contatto con l'occhio. Lo strumento rileva in pochi secondi il valore di osmolarità oculare campionando una porzione di lacrima del soggetto esaminato. Dopo esserci documentati e confrontati con molti articoli presenti in letteratura scientifica, abbiamo stabilito i seguenti parametri: valori di normalità sono quelli relativi ad un'osmolarità compresa tra 290 e 329 mOsm/L (con situazione ottimale se compresi tra 310 e 320), mentre al di sotto di 290 mOsm/L la lacrima è stata considerata come ipotonica e al di sopra di 329 mOsm/L come ipertonica: in entrambi i casi si considera tale situazione come un disequilibrio osmolare.

**RISULTATI**

Dalla somministrazione del questionario di Mc Monnies su 108 occhi totali, abbiamo suddiviso i pazienti fra soggetti sintomatici, quindi potenzialmente affetti dalla sindrome da occhio secco, e soggetti asintomatici, che almeno da quanto dichiarato non lamentavano sintomi riconducibili al Dry-Eye. Solo 20 occhi sono risultati essere sintomatici, i restanti 88 no: di questi 20 sintomatici, 12 risultano essere occhi femminili e solo 8 maschili, mentre degli 88 asintomatici, 50 risultano essere occhi maschili e 38 occhi femminili.

Dai dati statistici che abbiamo a disposizione, abbiamo riscontrato che il BUT ha una bassa possibilità al retest. Come possibile vedere dai grafici e dai dati di correlazione la possibilità che un valore rilevato in una persona si possa ripetere è bassa. Tutti i soggetti presi in esame sono stati sottoposti a due misurazioni, una alle 9,00 e la seconda dopo 3 ore, cioè alle h. 12,00, nessuno aveva nel frattempo né mangiato né frequentato ambienti diversi (erano tutti studenti del corso di ottica che frequentavano lo stesso istituto).

Come già riportato in letteratura la bassa correlazione del BUT rilevato in tempi diversi è un aspetto che ne dimostra la fragilità: questa è individuata probabilmente dal fatto che la sua misurazione è unitaria (per sec) su di una scala molto breve. La sua fragilità è evidente nella valutazione dell'occhio "sano" non sintomatico (bassa correlazione), mentre si dimostra più attendibile nei bassi valori di BUT, come già riportato in letteratura nel caso di occhi secchi<sup>31</sup> (nel nostro caso sintomatici).

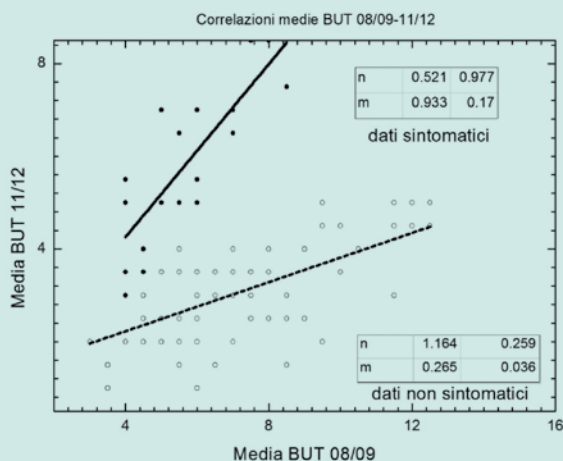


Grafico 1: correlazione tra le medie dei valori di BUT rilevati alle h. 8-9 e alle h 11-12 nel gruppo dei pazienti sintomatici e nel gruppo dei pazienti asintomatici.

Tipo di CORRELAZIONE	Sintomatici	Asintomatici
Pearson	0,790	0,629
Spearman	0,776	0,549
Kendall	0,636	0,428

Tabella 1: valori calcolati di correlazione sulle medie del BUT tra le rilevazioni nelle fasce 8-9 h e 11-12 h.

Come è possibile dedurre dal grafico 1 e dalla tabella 1, l'analisi statistica dei dati rilevati è concorde con quanto riportato in letteratura: le correlazioni fra i dati ottenuti nella prima misurazione (8-9 h) e la seconda (11-12 h) è maggiore nella popolazione risultata sintomatica nel questionario. L'intervallo che comprende tutte le misurazioni di BUT effettuate è ampio 3,41 s (con estremi 4,40 s a 7,81 s, evidenziati sulla tabella 2). Sulla base dei valori di osmolarità si interpreta l'occhio sano in un dato di BUT di circa 5,35 s - 6,82 s, anche se un valore preciso non è possibile data la difficoltà a mantenere una grande precisione di esecuzione del BUT (variabili e condizioni di contorno non completamente controllabili). In tabella 2 sono stati raccolti gli asintomatici in 6 classi di osmolarità, mentre i sintomatici in 5 classi di osmolarità, tutte ampie circa 10 mOsmM/L in funzione al numero di misurazioni disponibili.

non sintomatici				sintomatici			
Osmolarità media 08-09 [mOsm/L]	Deviazione Standard [mOsm/L]	BUT medio 08-09 [s]	Deviazione Standard [s]	Osmolarità media 08-09 [mOsm/L]	Deviazione Standard [mOsm/L]	BUT medio 08-09 [s]	Deviazione Standard [s]
288.29	+/-1.38	6.69	+/-0.96				
295.43	+/-2.38	7.81	+/-3.83	297.33	+/-3.79	6.67	+/-1.15
305.07	+/-3.17	6.82	+/-1.53	306.60	+/-2.30	7.00	+/-1.13
316.81	+/-3.85	6.31	+/-1.66	317.25	+/-2.06	5.56	+/-1.30
325.38	+/-3.70	5.35	+/-1.68	324.33	+/-2.52	4.40	+/-1.03
335.67	+/-4.04	5.27	+/-1.62	337.00	+/-3.16	4.71	+/-0.41

Tabella 2: relazione tra valori medi di osmolarità per valori medi di BUT distinguendo tra occhi di pz sintomatici dai non sintomatici (McMonnies)

Per quanto riguarda l'aspetto gradiente di osmolarità (misurato solo nella fascia 8-9 h), in relazione ai BUT (effettuati nelle due fasce 8-9 h e 11-12 h), è stato possibile riscontrare un'elevata correlazione (inversamente proporzionale) in entrambi i casi. Vista la similarità delle due correlazioni, vengono di seguito riportati nel grafico 2 solo i valori relativi alle correlazioni osmolarità e BUT nella fascia h 8-9.

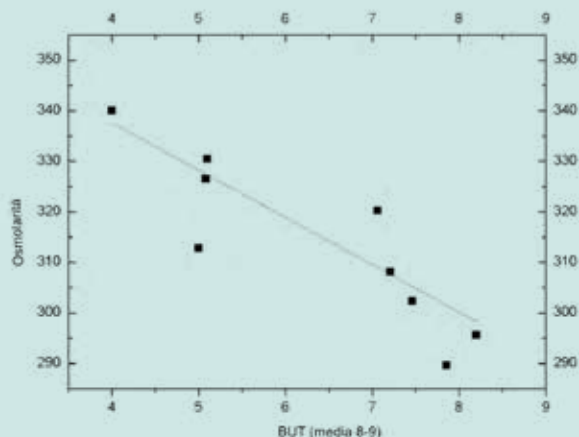


Grafico 2: valori di correlazione tra BUT e osmolarità eseguiti dalle 8-9 del mattino. Correlazioni: Pearson: -0.646; Spearman: -0.578; Kendall: -0.404.

Una valutazione interessante sulla relazione tra osmolarità e pazienti sensibili al questionario di McMonnies è ben rappresentato invece dal grafico 3. Attraverso esso è possibile osservare la frequenza relativa di misure riscontrate (ordinate) in funzione dei valori di osmolarità misurati (ascisse). Come si vede, le tracce in verde (pz. sintomatici) e quelle in rosso (non sintomatici), di fatto non si discostano tra loro in maniera netta, entrambi trovano nei 312 mOsm/L un punto di cut-off per poi dimostrare una tendenza simile fino ai 355 mOsm/L. Questa osservazione, diversa da quanto atteso (cioè una tendenza marcata alla differenziazione, con maggior frequenza di misurazioni di osmolarità elevate nei soggetti sintomatici), potrebbe essere spiegata dal fatto che il questionario di McMonnies si presenta come questionario di screening e non di diagnosi.

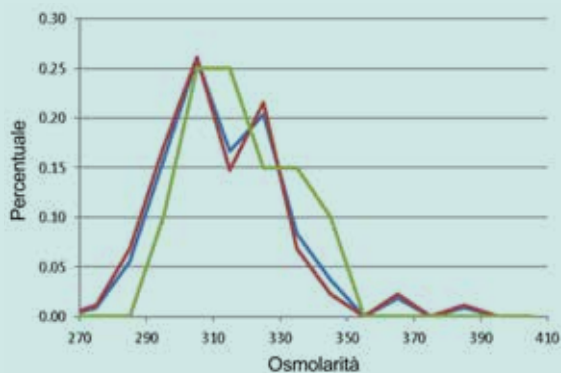


Grafico 3: Presenza di pazienti sintomatici al questionario di McMonnies in relazione ai valori di osmolarità. Blu tutti i pz analizzati dati; Rosso tutti i pazienti definiti "non sintomatici"; Verde tutti i pazienti definiti "sintomatici".

Un altro confronto è stato fatto tra valore di osmolarità e colorazione al Verde di Lissamina (Tab. 3), cioè tra cambiamento di osmolarità di superficie ed eventuale cambiamento di salute della congiuntiva bulbare nei 20 occhi definiti sintomatici.

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
		319			
				327	
	333				
	324				
	300				
		319			
		310			
		336			
		315			
			340		
					299
					293
		322			
			341		
		305			
	316				
	307				
	339				
	304				
	307				
<b>Media</b>	<b>316.25</b>	<b>318.00</b>	<b>340.50</b>	<b>327.00</b>	<b>296.00</b>
<b>Varianza</b>	<b>14.36</b>	<b>9.87</b>	<b>0.71</b>	<b>/</b>	<b>4.24</b>

Tabella 3: Riscontro individuale di media e varianza, relative all'osmolarità nei 5 stadi di colorazione al Verde di Lissamina:

- punteggio 1: colorazione isolata, leggera e non collocata specificamente;
- punteggio 2 intensa solo nasale;
- punteggio 3 intensa nasale e tempiale;
- punteggio 4 intensa nasale, tempiale, inferiore;
- punteggio 5 intensa e distribuita in tutti e 4 le aree bulbari.

L'intervallo di variazione di osmolarità media, per cui il test dà risultato 1 è compreso fra 316 mOsm/L e 318mOsm/L. Al disopra di quest'ultimo valore medio è stato possibile riscontrare come risultato 2, mentre è stato possibile dedurre che valori di osmolarità media superiori a 340 mOsm/L hanno dato come riscontro al test Verde di

Lissamina un risultato di 3. Per i livelli di colorazione 4 e 5, i risultati dello studio sono in netto conflitto con le aspettative. I valori di osmolarità relativi ai soggetti positivi a questi livelli di colorazione alla lissamina, sono addirittura inferiori a quello medio calcolato per il primo livello. Probabilmente la scarsa quantità della popolazione campione, ha contribuito a rendere questi ultimi risultati piuttosto dubbi. In ultima analisi non esistono differenze statisticamente osservabili sia nello studio del BUT che in quello dell'osmolarità in relazione tra sintomatologia e colorazione al Verde di Lissamina che faccia pensare ad una differenza di genere (maschi/femmine) o ad una differenziazione in riferimento all'età del nostro campione (19-35). Ovviamente, data la bassa età della popolazione esaminata in questo studio, non si intende certo screditare altri riscontri, dove significative differenze siano invece significative in classi di età superiori.

## DISCUSSIONE

Secondo i risultati ottenuti in questo lavoro, Il BUT risulta essere, come già riscontrato da Cebreiro<sup>32</sup> un test che deve essere ripetuto più volte ed eseguito dallo stesso esaminatore per riscontrare una ripetibilità accettabile. Ci troviamo inoltre d'accordo con Lemp<sup>31</sup>, sottolineando che risulta essere un test significativo su soggetti che presentano una condizione di occhio secco patologico, ma che si attesta problematico nel differenziare situazioni fisiologiche dall'occhio secco marginale. Abbiamo infatti modificato parte delle procedure finora descritte introducendo nel test una fonte luminosa a fascia stretta anziché ampia per ridurre l'abbagliamento (non ci siamo interessati a differenziare tra zone di comparsa, ma solo della manifestazione del primo Dry Spot) e abbiamo introdotto un certo rigore nella gestione del test, per aiutarci a scandire il tempo prima di inserire lo strip e quanto tempo attendere dopo aver inserito la fluoresceina prima di effettuare la misurazione. Per quanto riguarda le misure, la nostra esperienza ha portato all'acquisizione di dati che mettono in discussione il valore di occhio sano presentato da Norn, poiché la media eseguita su 88 occhi risultati asintomatici al questionario di McMonnies, sembra imporsi su un BUT compreso approssimativamente fra 6 e 8 s. Tale riscontro potrebbe essere spiegato con il cambiamento degli stili di vita moderni, prime cause di influenza (in un occhio sano) dell'instabilità del film lacrimale. Ovviamente questa osservazione e dichiarazione si basa su dati instabili, nonostante noi si sia cercato di standardizzare il più possibile la metodologia d'esecuzione: evidentemente il test del BUT mediante l'utilizzo della fluoresceina risente altresì di variabili che noi non siamo riusciti ad isolare o riproporre in modo controllato. Parlando di sofferenza cellulare congiuntivale,

e quindi del test del Verde di Lissamina, abbiamo potuto constatare che non sempre il sintomo di occhio secco si correla facilmente a una sofferenza cellulare, infatti non tutti i soggetti sintomatici presentavano colorazione (e quindi appunto segni di sofferenza cellulare) al test, ciò conferma i pochi dati presenti in letteratura dove il coefficiente di specificità del test si attesta solo al 7,24%<sup>45</sup>. Per trovare occhi negativi al test verde bisogna scendere a una osmolarità inferiore a 310 mOsm/L: al di sopra di questi valori la probabilità di un occhio positivo al test verde supera il 60-70 %. Utilizzando il questionario McMonnies abbiamo riscontrato un'incoerenza con i dati rilevati dal Tearlab, poiché quasi tutti i soggetti risultati sintomatici al McMonnies mostravano valori di osmolarità nell'intervallo che permette di identificare una situazione normale (media 317 mOsm/L). Invece, fra i 108 occhi asintomatici risultavano esserci 19 occhi con lacrimazione da considerarsi ipertonica, con valori riscontrati al di sopra dei 320 mOsm/L. Questi esiti, ottenuti relazionando la risposta dei soggetti al test di McMonnies con i valori di osmolarità, sembrerebbero indicare che il questionario, se pur validato dagli studi riportati dalla letteratura può e dovrebbe sempre essere adoperato come test di screening e non di diagnosi. A conferma di ciò anche i valori medi di BUT rilevati nei soggetti sintomatici e non sintomatici non sono tra loro distanti. Per quanto riguarda il Tearlab e la rilevazione dell'osmolarità del film lacrimale, abbiamo evidenziato la correlazione con i valori tendenziali del BUT e accettandone la sua ripetibilità in relazione agli studi di Tomlison e di Sallivan. Possiamo quindi confermare anche in questo studio che il test dell'osmolarità è per ora il test con la maggior attendibilità nella diagnosi di occhio secco marginale.

## CONCLUSIONI

Possiamo concludere affermando che la migliore correlazione rilevata sembra essere quella fra osmolarità e BUT (correlazione inversamente proporzionale): questo rende il test del BUT sì impreciso e poco attendibile, ma utile per avere un'idea sulla situazione generale del film. Probabilmente una miglior relazione si potrebbe trovare valutando la condizione di BUT non invasivo con l'osmolarità.

## BIBLIOGRAFIA

1. Pritchard N, Fonn D, Brazeau D. Discussion of contact lens wear. *Int Contact Lens Clin* 1999;26:157-61
2. Young G. Why one million contact lens wearers dropped out. *Cont Lens Anterior Eye* 2004;27:83-5
3. Weed KH, Fonn D, Potvin R. Discontinuation of contact lens wear. *Optom Vis Sci* 1993;70(12s):140
4. Schiffman RM, Walt JG, Jacobsen G, et al. Utility



- assessment among patients with dry eye disease. *Ophthalmology* 2003;110:1412-19
5. Normand SLT, McNeil BJ, Peterson LE, et al. Eliciting expert opinion using the Delphi technique; identifying performance indicators for cardiovascular disease. *Int J Qual Health Care* 1998;10:247-60
  6. Behrens A, Doyle JJ, Stern L, et al. Dysfunctional tear syndrome: a Delphi approach to treatment recommendations. *Cornea* 2006;25:900-07
  7. Lemp MA. The definition and classification of dry eye disease: report of the Definition and Classification Subcommittee of the International Dry Eye Workshop. *Ocul Surf* 2007;5:75-92
  8. Bron A, Tiffany J, Nokoi N, et al. Using osmolarity to diagnose dry eye: a compartmental hypothesis and review of our assumptions. *Adv Exp Med Biol* 2002;506(Pt B):1087-95
  9. Foulks G.N. The correlation between the tear film lipid layer and dry eye disease. *Surv Ophthalmol* 2007;52:369-74
  10. Begley CG, Charmers RL, Abetz L, et al. The relationship between habitual patient-reported symptoms and clinical signs among patients with dry eye of varying severity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:4753-61
  11. Hay EM, Thomas E, Pal B, et al. Weak association between subjective symptoms of and objective testing for dry eyes and dry mouth: result from a population based study. *BMJ* 1998;57:20-4
  12. Johnson ME. The association between symptoms of discomfort and signs in dry eye. *Ocul Surf* 2009;7:199-211
  13. Nichols KK, Nichols JJ, Mitchell GL. The lack of association between signs and symptoms in patients with dry eye disease. *Cornea* 2004;23:762-70
  14. Vitale S, Goodman LA, Reed GF, et al. Comparison of the NEI-VFQ and OSDI questionnaires in patients with Sjogren's syndrome-related dry eye. *Health Qual Life Outcomes* 2004;2:44-55
  15. Roszkowska AM, Colosi P, Ferreri FMB, et al. Age-related modifications of corneal sensitivity. *Ophthalmologica*. 2004;218:350-55
  16. Polse K. Etiology of corneal sensitivity changes accompanying contact lens wear. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1978;17:1202-06
  17. Nichols KK, Nichols JJ, Mitchell GL. The reliability and validity of McMonnies dry eye index. *Cornea* 2004;23:365-71
  18. Schiffman RM, Christianson MD, Jacobsen G, et al. Reliability and validity of the ocular surface disease index. *Arch Ophthalmol* 2000;118:615-21
  19. McMonnies C. Key questions in a dry eye history. *J Am Optom Assoc* 1986;57:512-17
  20. Tomlinson A, Khanal S, Ramaesh K, Diaper C, McFadyen A. Tear film osmolarity: determination of a referent for dry eye diagnosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:4309-15
  21. Norn MS. Desiccation of the precorneal film. *Acta Ophthalmol* 1969;47:865-80
  22. Norn MS. Dead, degenerate and living cells in conjunctival fluid and mucous thread. *Acta Ophthalmol* 1969;47:1102-15
  23. Mengher LS, Bron AJ, Tonge SR, Gilbert DJ. Effect of fluorescein instillation on the pre – corneal tear film stability. *Curr Eye Res* 1985;4:9-12
  24. Marquardt R, Stodmeister R, Christ T. 1986, modification of tear film break –up time test for increased reliability. In: *The precorneal tear film in health*
  25. Cho P, Douthwaite W. The relation between invasive and noninvasive tear break-up time, *Optom. Vis Sci* 1995;72:17-22
  26. Lee JH, Kee CW. The significance of tear film break – up time in the diagnosis of dry eye syndrome. *Korean J Ophthalmol* 1988;2:69-71
  27. Cho P. Stability of the precorneal tear film: a review. *Clin Exp Optom* 1991;74:19-25
  28. Korb DR, Greiner JV, Herman J. Comparison of fluorescein break- up time measurement reproducibility using standard fluorescein strips versus the dry eye test (DET) method. *Cornea* 2001;20:811-15
  29. Nichols KK, Mitchell GL, Zadnik K. The repeatability of clinical measurements of dry eye. *Cornea* 2004;23:272-85
  30. Sullivan BD, Crews LA, Sonmez B, de la Paz MF, Comert E, Charoenrook V, de Araujo AL, Pepose JS, Berg MS, Kosheleff VP, Lemp MA. Clinical utility of objective tests for dry eye disease: variability over time and implications for clinical trials and disease management. *Cornea* 2012;31:1000-08
  31. Lemp MA, Bron AJ, Badonin C, Benitez del Casillo JM, Geffen D, Tauber J, Foulks GN, Pepose JS, Sullivan BD. Tear osmolarity in the diagnosis and management of dry eye disease. *Am J Ophthalmol* 2011;151:797-98
  32. Cebreiro E, Ramos L, Mosquera A, Barreira N, Penedo MFG. 2012. Automation of the tear film break-up time test. *Eur J Ophthalmol* 2012;22(7):S17-S23
  33. Frerichs FT. In Wagner R: *Handwörterbuch der Physiologie*, Vol 3, 1846, p 617 (German)
  34. Giardini A, Roberts JR. Concentration of glucose and total chloride in tears. *Br J Ophthalmol* 1950;34:737-43
  35. Liu H, Begley C, Chen M, Bradley A, Bonanno J, McNamara NA, et al. A link between tear instability and hyperosmolarity in dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:3671-79

36. Yildiz EH, Fan VC, Banday H, Ramanathan LV, Bitra RK, et al. Evaluation of a new tear osmometer for repeatability and accuracy, using 0.5-microL (500-nanoliter) samples. *Cornea* 2009;28:667-80
37. Rossetti A, Gheller P. *Manuale di optometria e contattologia (seconda edizione)*. Zanichelli 2003;51:1-13
38. Efron N. *Contact Lens Complications (2nd ed.)*, London, United Kingdom: Butterworth-Heinemann; 2004
39. Ehrlic P. Ueber die Methylenblaureaction der lebenden Nervensubstanz. *Biol Centralbl* 1886;87(6):214-24
40. Pflüger. Zur Erahrung der Cornea. *Klin Monatsbl Augenhellkd* 1882;20:69-81
41. Sjögren H. Zur Kenntnis der Keratoconjunctivis sicca (Keratitis filiformis bei Hypofunktion der Tranendrusen). *Acta Ophthalmol Suppl* 1933 Mar;13(1-2):40-45
42. Norn M. Lissamine green. Vital staining of the cornea and conjunctiva. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1973;51(4):483-91
43. Norn M. Diagnosis of Dry Eye. In: Lemp M, Marquardt R. *The Dry Eye. A Comprehensive Guide*. Berlin, Germany: Springer-Verlag; 1992:167
44. Kim J, Foulks G. Evaluation of the effect of lissamine green and rose bengal on human corneal epithelial cells. *Cornea* 1999 May;18(3):328-32
45. Rege A, Kulkarni V, Puthran N, Khandgave T. A Clinical Study of Subtype-based Prevalence of Dry Eye. *J Clin Diagn Res* 2013 Oct;7(10):2207-10

## AUTORI

### Prof. Pietro Gheller

- Optometrista Psicologo FIACLE SOPTI IBZ department of Vision Science (Ist. Zaccagnini Bologna),
- prof a c. corso di laurea in ottica e optometria Università di Padova, Senior Visiting Lecture Aston University (Birmingham UK)

### Prof. Fabrizio Fontana Fisico

- ex coordinatore corso di Laurea in Ottica e Optometria Molise e docente corso di Laurea in Ottica e Optometria Università di Roma 3

### Lorenzo Maffezzoni, Alberto Spelta

- dipl Ita Optometria IBZ department of Vision Science (Ist. Zaccagnini Bologna)

## EDITOR E REVISORE

### Paolo Facchin

Optometrista, docente DDS di "tecniche fisiche per l'optometria I" presso UNIPD e docente di "esercitazioni di contattologia" presso Istituto Buonarroti di Verona.