

# *Efficacia clinica di un nuovo trattamento iposensibilizzante EPD (Enzyme Potentiated Desensitization) nella terapia della pollinosi*

G. LONGO, F. POLI e G. BERTOLI

**Clinic efficacy on new hyposensitizing treatment, EPD (Enzyme Potentiated Desensitization) in the therapy of pollinosis.**

The authors tested the clinical efficacy and tolerability of a new immunotherapy methodology, called EPD, used in the therapy of pollinosis. This methodology needs only one intradermic administration of very low doses of allergen and of an enzyme, called  $\beta$ -glucuronidase. It is necessary to carry out this treatment from 3 to 7 weeks before the pollen season. In double blind condition, versus placebo, 21 patients were tested by symptomatology and pharmacological score. The results show a good clinical efficacy and an excellent tolerability with a favourable cost/benefit ratio. The authors suggest the execution of research with an investigation of immunological parameters for a better assessment of this new methodology.

Key words: Pollinosis.

**I**primi studi riguardanti la capacità della ialuronidasi e della  $\beta$ -glicoronidasi di potenziare la desensibilizzazione in pazienti allergici, trattati con basse dosi di antigene specifico, furono

*Università degli studi di Trieste  
Clinica Pediatrica  
Ospedale Infantile Burlo Garofolo  
Direttore: F. Panizon*

pubblicati in letteratura nel 1967 dal gruppo di McEwen, del Dipartimento di Farmacologia del St. Mary's Hospital di Londra<sup>1</sup>.

Ventinueve pazienti con rinite stagionale da graminacee vennero trattati, in uno studio controllato doppio cieco contro placebo, con una miscela di ialuronidasi,  $\beta$ -glicoronidasi e antigene specifico in basse dosi, applicata tramite una coppetta di plastica ad una finestra cutanea sul braccio del paziente. Dopo 3 settimane dal trattamento venne eseguito un test di provocazione nasale specifico (TPNS) con estratto acquoso di graminacee, che evidenziò una minore intensità dei sintomi nel gruppo trattato con attivo rispetto al gruppo trattato con placebo ( $p < 0,02$ ). In un successivo lavoro<sup>2</sup> McEwen dimostrò che la  $\beta$ -glicoronidasi era capace di potenziare la iposensibilizzazione dovuta all'iniezione nella cavia, precedentemente sensibilizzata, di piccole dosi di allergene, questa capacità aumenta ulteriormente in presenza di ialuronidasi. L'A. segnalava però una notevole variabilità dell'effetto potenziante, a seconda del lotto utilizzato. Una possibile spiegazione di ciò fu successivamente proposta nel 1973 dallo stesso McEwen<sup>3</sup> il quale

Indirizzo per la richiesta di estratti: G. Longo - Clinica Pediatrica dell'Università, Ospedale Infantile Burlo Garofolo - 34100 Trieste.

notò che l'attività potenziante della  $\beta$ -glicoronidasi diminuiva in presenza di gelatina e con l'invecchiamento del campione, ma veniva ripristinata con l'aggiunta di glucosio, anche in piccole quantità.

Nello stesso anno il gruppo di ricerca del St. Mary's Hospital<sup>4</sup> dimostrò che l'attività immunologica della  $\beta$ -glicoronidasi poteva essere controllata in presenza di concentrazioni diverse di sostanze contenenti nella loro struttura un gruppo 1,3-diolico. Concentrazioni crescenti di 1,3-cicloesandiolo conferivano all'enzima un effetto potenziante o riducente l'anafilassi indotta da piccole dosi di antigene specifico in cavie presensibilizzate, mostrando una curva dose-risposta bifasica. Il fenomeno veniva interpretato come un aumento progressivo dello stimolo enzima-antigene su certe cellule bersaglio, correlato alla concentrazione dei gruppi diolici.

Nello stesso studio un gruppo di pazienti con rinite da graminacee fu trattato in doppio cieco versus placebo per 24 ore mediante finestra cutanea con una miscela enzima-allergene incubata per 10 settimane con dosi crescenti di 1,3-cicloesandiolo e sottoposto dopo 3 settimane a TPNS: nessuna differenza significativa fu notata tra i 2 gruppi sebbene i pazienti trattati con attivo (EPD) mostrassero un punteggio sintomatologico più basso.

In un lavoro successivo<sup>5</sup> gli stessi ricercatori notarono che anche la protamina esercitava una funzione di controllo sul complesso enzima-antigene. Una popolazione di pazienti con rinite da graminacee fu trattata in doppio cieco (attivo EPD versus placebo) e successivamente sottoposta a TPNS secondo il noto schema; gli A. notarono una riduzione significativa dei sintomi solo nel gruppo trattato con il complesso enzima-antigene incubato con 1,3-cicloesandiolo e protamina in certe concentrazioni.

La letteratura riporta infine uno studio di Fell e Brostoff del 1990<sup>6</sup> sull'efficacia dell'EPD (Enzyme Potentiated Desensitization) nella rinite allergica da graminacee. Gli A. hanno selezionato 44 pazienti

con rinite da graminacee trattandoli, in doppio cieco, con EPD oppure placebo e rilevando i valori di 3 parametri: consumo di farmaci, punteggio sintomatologico in stagione, preferenza dei pazienti tra EPD e trattamento dell'anno precedente.

Da sottolineare che la via di somministrazione è stata intradermica (quindi non più con finestra cutanea) di 0,125 ml di soluzione contenente 2,5 Noon Units di estratto convenzionale e 0,5 BU di estratto purificato di graminacee, con 100 Fishman units di  $\beta$ -glicoronidasi purificata. I risultati hanno evidenziato:

- 1) differenza non ancora significativa tra i 2 gruppi nel punteggio sintomatologico in stagione;
- 2) consumo di farmaci significativamente ridotto nel gruppo trattato con attivo, sia per i corticosteroidi in aerosol ( $p < 0,02$ ) che per la terfenadina ( $< 0,05$ );
- 3) preferenza per l'EPD rispetto al trattamento dell'anno precedente (ITS), statisticamente maggiore nel gruppo trattato con attivo ( $p < 0,01$ ).

Lo scopo del presente lavoro è di verificare l'efficacia di EPD con somministrazione intradermica mediante un protocollo controllato, in doppio cieco contro placebo, in una popolazione selezionata di pazienti pollinosici.

## Materiali e metodi

### Pazienti

Sono stati selezionati 20 pazienti (8 maschi, 12 femmine) di età compresa tra 12 e 46 anni (età media 27,1 anni) affetti da rinoconguntivite da graminacee e/o parietaria (Tab. 1) diagnosticata in base alla storia clinica ed alla positività del Prick test. Per quest'ultimo sono state considerate soltanto le classi di positività maggiore (3-4 secondo lo standard proposto dalla Società Italiana di Allergologia e Immunologia Clinica, utilizzando diagnostici Benkard).

Undici pazienti erano allergici alle graminacee, 5 alla parietaria, 4 ad entrambi gli allergeni.

Tabella 1. Caratteristiche dei pazienti.

Paziente	Sesso	Sensibilità
<i>Gruppo Placebo</i>		
B.A.	F	Parietaria
B.R.	M	Graminacee
B.E.	M	Graminacee
C.E.	F	Graminacee
C.A.	F	Graminacee
B.P.	F	Graminacee
V.S.	F	Parietaria
<i>Gruppo attivo</i>		
B.L.	M	Graminacee
B.I.	F	Parietaria
S.M.	F	Gram. + Par.
B.E.	F	Gram. + Par.
B.R.	M	Parietaria
G.A.	F	Graminacee
P.S.	M	Gram. + Par.
B.A.	M	Gram. + Par.

I soggetti arruolati sono stati suddivisi in maniera casuale nel gruppo attivo o in quello placebo, entrambi di 10 elementi.

#### Trattamento

La dose di prodotto attivo (EPD) somministrata (0,05 ml) conteneva 40 unità Fishman di  $\beta$ -glicoronidasi purificata mediante cromatografia su colonna e 0,02 BU di estratto allergenico purificato di graminacee e parietaria, e di altri pneumoallergeni stagionali.

Il placebo conteneva soluzione di NaCl tampone. I due preparati erano indistinguibili all'ispezione.

Il protocollo di somministrazione prevedeva che ad ogni paziente venisse praticata una singola iniezione intradermica di 0,05 ml di soluzione (attivo oppure placebo) nella cute volare dell'avambraccio, alla metà di aprile 1991. Dopo la somministrazione i pazienti venivano tenuti in osservazione per 30 minuti, per valutare eventuali reazioni immediate.

#### Valutazione dei pazienti e punteggio sintomatologico

Ad ogni paziente era consegnata una carta-diario dove registrare quotidianamente rinorrea, starnuti e ostruzione secondo una scala di gravità a 4 punti:

0= nessun sintomo; 1= lieve; 2= medio; 3= grave.

Il paziente doveva inoltre registrare il consumo di farmaci espresso in numero di compresse di antistaminico al giorno. A tutti i pazienti era stata prescritta la terfenadina.

Il periodo totale di osservazione di 60 giorni è stato arbitrariamente suddiviso in 3 periodi di 20 giorni ognuno; successivamente i punteggi sintomatologici totali di ogni paziente nei due gruppi studiati sono stati sommati per ciascuno dei 3 periodi.

È stato inoltre utilizzato come parametro di valutazione il numero di giornate libere da sintomi e che non hanno richiesto assunzione di antistaminici o altri farmaci antiallergici.

#### Monitoraggio immunologico

A tutti i pazienti è stato eseguito un prelievo ematico prima del trattamento e al termine del follow-up (60° giorno), e cioè successivamente alla maggiore stimolazione allergenica ambientale, al fine di dosare tramite RAST le IgE specifiche per graminacee e parietaria.

#### Calendario pollinico

Nell'atmosfera di Trieste è stata valutata la presenza dei pollini di graminacee e parietaria tramite campionatore volumetrico Burkard con rilevamenti settimanali dall'inizio di aprile alla fine di giugno del 1991, cioè da prima del trattamento e per tutto il periodo di follow-up.

#### Analisi statistica

Il confronto tra i punteggi sintomatologici totali è stato valutato con il test non parametrico di Mann Whitney.

Le differenze nel numero di giornate libere da sintomi e nel consumo di farmaci sono state valutate con il test del  $\chi^2$  con la correzione di Yates e test esatto di Fisher.

Il livello di significatività adottato è stato del 50%.



## Risultati

Diciassette pazienti hanno completato lo studio: 2 pazienti del gruppo placebo e 1 paziente del gruppo trattato con attivo sono stati esclusi dallo studio poiché non hanno completato in maniera esauriente la registrazione dei sintomi per tutto il periodo di osservazione. Ciononostante i gruppi sono risultati egualmente omogenei per età, sesso e sensibilizzazione.

In nessun caso si sono verificate reazioni locali particolari, né tantomeno sistemiche pronte e/o ritardate.

I risultati riguardanti la rinorrea, la starnutazione e l'ostruzione nasale indicano punteggi sintomatologici inferiori nel gruppo trattato con attivo rispetto al gruppo-placebo, con significatività statistica particolarmente elevata nella terza ventina del follow-up (Fig. 1, 2, 3).

Le medie delle somme dei punteggi sintomatologici totali per i 2 gruppi studiati sono riportate in figura 4. In tutti e tre i periodi, di 20 giorni ciascuno, si nota una riduzione statisticamente significativa del punteggio totale nel gruppo trattato con attivo rispetto a quello trattato con placebo. In particola-

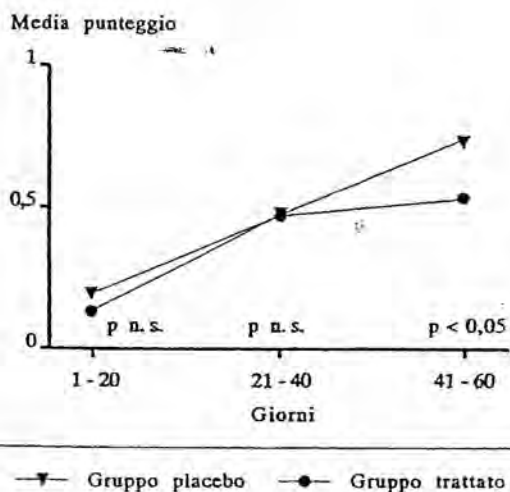


Fig. 1. Punteggio sintomatologico relativo alla rinorrea durante 2 mesi primaverili (maggio-giugno 1991). I valori riportati rappresentano la media dei punteggi registrati nei 3 periodi di 20 giorni ciascuno nel quale è stato diviso arbitrariamente il periodo di osservazione.

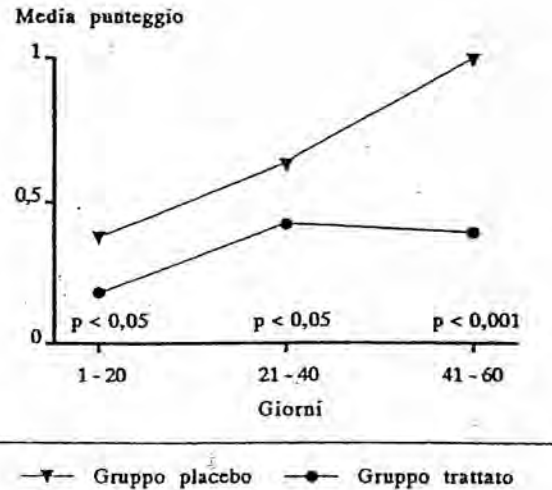


Fig. 2. Punteggio sintomatologico relativo al sintomo starnuti rilevato come in figura 1.

re, nella terza ventina si è ottenuto un risultato altamente significativo ( $p < 0,001$ ).

In relazione al rilevamento pollinico che mostra una tardiva pollinazione per le graminacee, dalla seconda metà di maggio fino alla metà di giugno contemporaneamente ad una seconda pollinazione della parietaria, proprio in questo periodo di maggiore stimolazione allergica, corrispondente alla terza ventina di

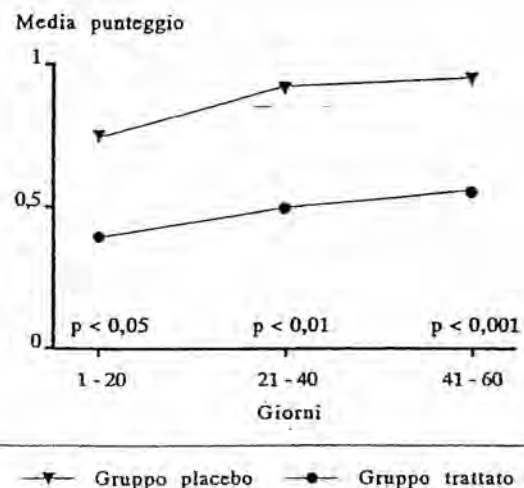


Fig. 3. Punteggio sintomatologico relativo al sintomo ostruzione nasale rilevato come in figura 1.

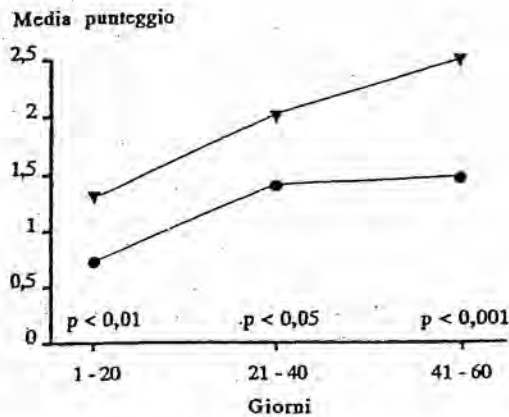


Fig. 4. Punteggio sintomatologico totale rilevato come in figura 1.

follow-up, si sono ottenuti i migliori risultati sintomatologici.

Il numero dei giorni liberi da sintomi, espresso in valori percentuali, è riportato nella figura 5. Si osserva una differenza altamente significativa ( $p < 0,001$ ) a favore del gruppo trattato con attivo.

Il consumo di antistaminici, espresso in percentuale di giornate di terapia, è riportato nella figura 6. Non si notano differenze significative tra di due gruppi ( $p = 0,2$ ) nonostante si evidenzi una tendenza ad un minore consumo di farmaci nel gruppo trattato con attivo.

Il monitoraggio immunologico non ha dimostrato differenze nell'incremento post-stagionale delle IgE specifiche nei due gruppi di pazienti.

### Discussione

Dalla revisione dei dati riportati in letteratura emerge la dimostrazione di una effettiva desensibilizzazione in due studi<sup>1,5</sup> controllati in doppio cieco, EPD versus placebo, su pazienti con rinite da graminacee. I lavori, entrambi dell'équipe di McEwen, riportano come criterio di valutazione il TPNS e come via di somministrazione una finestra cutanea. L'ultimo studio<sup>6</sup> valuta il punteggio sintomatologico ed il consumo di farma-

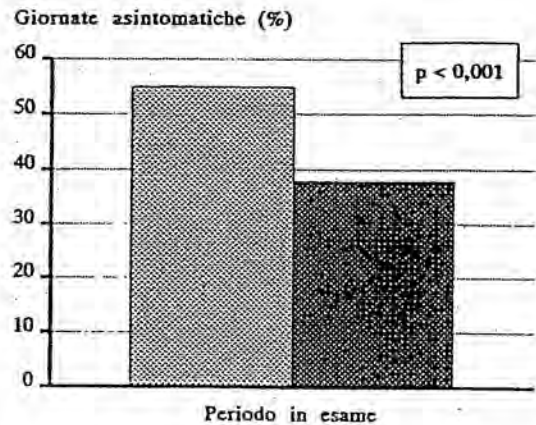


Fig. 5. Percentuale di giornate trascorse senza sintomatologia clinica nei 2 gruppi di pazienti.

ci con la via di somministrazione intradermica: i risultati sono contrastanti in quanto dimostrano una differenza significativa, a favore del gruppo trattato con attivo, per il consumo di farmaci ma non ancora significativa per i sintomi. La ragione della minore efficacia osservata da Fell e Brostoff potrebbe essere dovuta, secondo gli stessi A., alla selezione di pazienti poliallergici che ha determinato

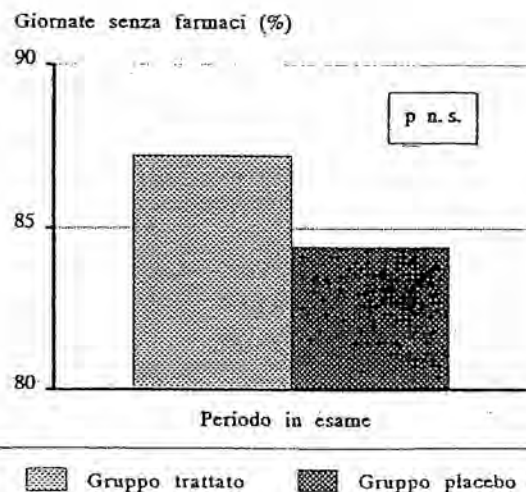


Fig. 6. Percentuale di giornate trascorse senza bisogno di assumere farmaci antistaminici nei 2 gruppi a confronto.

alti punteggi sintomatologici già nel periodo pre stagionale. Un'altra ipotesi che giustificerebbe la scarsa efficacia del trattamento sui sintomi rinitici potrebbe essere la differente via di somministrazione.

I risultati del presente studio, che ha usato anch'esso la via intradermica a dosaggi più bassi (secondo le direttive del gruppo di ricerca di McEwen) dimostrano innanzitutto che il trattamento EPD è sicuro: le reazioni locali sono limitate e non si sono verificate reazioni sistemiche, immediate o ritardate, in nessun caso.

Per quanto riguarda i sintomi sia come punteggio totale che come numero di giornate asintomatiche, è stata osservata una riduzione nettamente significativa a favore del gruppo trattato con EPD, nonostante i bassi punteggi medi, dovuti probabilmente ad una bassa concentrazione di polline nell'aria durante la stagione. Al contrario, il consumo di farmaci non è stato molto diverso nei due gruppi, sebbene i pazienti trattati con EPD abbiano una minore percentuale di giornate di terapia. La ragione di ciò è probabilmente da ricercare in una primavera eccezionalmente piovosa che ha comportato, oltre ad una sintomatologia ridotta, anche un minor ricorso alla terapia farmacologica.

In conclusione il presente studio dimostra che EPD per via intradermica può essere somministrato senza rischi, ed è efficace nel ridurre la sintomatologia in pazienti affetti da rinite da graminacee e/o da parietaria.

È auspicabile che i risultati clinici, anche se preliminari e su non grande casistica, che il nostro lavoro evidenzia stimolino i ricercatori ad una valutazione clinica ulteriore e più prolungata nel tempo, e ad una indagine immunologica più esauriente su questa metodica di trattamento iposensibilizzante.

## Riassunto

Gli Autori hanno voluto verificare l'efficacia clinica e tollerabilità di una nuova metodica di immunoterapia, denominata EPD, nella terapia della pollinosi. Tale metodica comporta una sola somministrazione da effettuarsi da 3 a 7 settimane prima del picco pollinico. In doppio cieco, contro placebo, 21 pazienti sono stati valutati tramite score sintomatologico e uso di farmaci. Tali risultati indicano buona efficacia clinica e ottima tollerabilità con un ottimo rapporto costo/beneficio. Gli Autori suggeriscono l'esecuzione di lavori con valutazione anche dei parametri immunologici per valutare meglio questa nuova metodica.

Parole chiave: Pollinosi.

## Bibliografia

1. McEwen IM, Granderton MA, Wilson CWM, Black JHD. Hyaluronidase in the treatment of allergy. *Br Med J* 1967; n: 507-8.
2. McEwen IM, Starr MS. Enzyme potentiated hyposensitization. 1. The effect of pretreatment with  $\beta$ -glucuronidase, hyaluronidase and antigen on anaphylactic sensitivity of Guinea pig, rats and mice. *Int Arch Allergy* 1972; 42: 152-8.
3. McEwen IM. Enzyme potentiated hyposensitization. 2. Effects of glucose, glucosamine, N-acetylamino sugars and gelatine on the ability of  $\beta$ -glucuronidase to block the anamnestic response to antigen in mice. *Ann Allergy* 1973; 31: 79-83.
4. McEwen IM, Nicholson M, Kitchen I, White S. Enzyme potentiated hyposensitization. 3. Control by sugars and diols of the immunological effect of  $\beta$ -glucuronidase in mice and in patients with hay fever. *Allergy* 1973; 31: 543-9.
5. McEwen LM, Nicholson M, Kitchen I, O'Gorman J, White S. Enzyme potentiated hyposensitization. 4. Effect of protamine on the immunological behavior of  $\beta$ -glucuronidase in mice and patients with hay fever. *Ann Allergy* 1975; 34: 290-5.
6. Fell P, Brostoff J. A single dose desensitization for summer hay fever: results of a double blind study-1988. *Eur J Clin Pharmacol* 1990; 38: 77-9.