

Предсезонная иммунотерапия аллергоидами детей страдающих аллергией на пыльцу трав: двойное, слепое, плацебо-контролируемое, рандомизированное исследование.

К. Каффарелли, Педиатрическое отделение, Парма

Л.Г. Сенси, Ф. Маркусси, Педиатрическое отделение, Перуджа

Г. Каванни, Педиатрическое отделение Модена Сюд, Сассуоло, Италия

Общие сведения: Мы оценивали эффективность предсезонной локальной иммунотерапии аллергоидами группы детей с астмой и/или ринитом и/или риноконъюнктивитом, вызванными пылью трав.

Методы: Было рандомизировано 24 ребенка с аллергией на пыльцу трав для проведения 3-х месячной локальной иммунотерапии аллергоидами до сезона цветения и 24 ребенка с аналогичными заболеваниями для контроля (плацебо). Иммунотерапия проводилась таблетками мономерных аллергоидов на пыльцу трав, которые необходимо было рассасывать во рту до их полного растворения, после чего слюну следовало проглотить. Исследование было двойное слепое. Во время лечения величина симптомов и потребность в медикаментах оценивались в баллах и фиксировались в дневнике. С помощью моноклональных антител EG1 и EG2 проводились измерения уровня назального эозинофильного катионного белка до сезона цветения, а также при самом низком и высоком уровне концентрации пыли в течение сезона.

Результаты: По сравнению с группой плацебо активная группа имела статистически значимое уменьшение общих симптомов ($p < 0,05$), особенно бронхиальных ($p < 0,05$). Иммунотерапия хорошо переносилась и правильно соблюдалась. В течение сезона цветения значительно повышался уровень назальных EG1 и EG2, но разницы между группами не наблюдалось. Соотношение EG2/EG1 значительно увеличилось только в плацебо группе в период воздействия природного аллергена ($p < 0,01$).

Выводы: Наши результаты свидетельствуют об эффективности иммунотерапии при лечении астмы у детей, вызванной пылью трав.

Специфическая иммунотерапия, проводимая путем подкожных инъекций, считается эффективной для лечения аллергических заболеваний (1). Вместе с тем, инъекции неудобны и, в редких случаях, могут быть причиной тяжелых системных реакций (1). С целью улучшения безопасности и переносимости лечения, возобновился интерес к аллергоэкстрактам, например, для орального или сублингвального применения. Всемирная организация здравоохранения, а также совместная Рабочая группа по локальной иммунотерапии при Европейском обществе педиатрической аллергологии и клинической иммунологии (EAACI- ESPACI) (3) заявили, что имеются доказательства эффективности сублингвальной иммунотерапии с проглатыванием слюны после рассасывания таблетки (4-13), но не оральной или сублингвальной иммунотерапии с последующим сплевыванием слюны. СЛИТ и инъекционная иммунотерапия были одинаково эффективны у взрослых с аллергией на пыльцу трав (14). В совместном Меморандуме EAACI-ESPACI (3) не рекомендовано применение в обычной клинической практике СЛИТ детей, в связи с небольшим количеством контрольных клинических исследований проведенных для оценки эффективности и безопасности СЛИТ детей. Тем не менее, согласно недавнему постмаркетинговому мониторинговому исследованию, СЛИТ безопасны для детей (15).

У детей не всегда получается держать таблетку точно под языком. Отсутствуют данные, что сублингвальные слизистые оболочки могут абсорбировать молекулы

аллергенов лучше других слизистых (дорсальной поверхности языка, половых губ, щек и мягкого неба). В настоящем исследовании, показано, что при проведении СЛИТ мономерными алергоидами пыльцы трав, таблетку следует держать во рту под языком до полного рассасывания, после чего слюну следует проглотить (оромукозная с проглатыванием иммуноотерапия (ОПИ)) (16).

Провокационные тесты показали, что по прошествии 1 года с момента начала СЛИТ наблюдалось снижение клеточной инфильтрации и экспрессии молекул межклеточной адгезии (ICAM-1) в конъюнктиве (9). Назальные провокационные тесты с аллергенами постенницы также продемонстрировали снижение числа нейтрофилов, эозинофилов и экспрессии ICAM-1 после предсезонной СЛИТ (17).

В течение сезона цветения происходит активация эозинофилов. Обнаружено, что у пациентов с аллергией на пыльцу трав под воздействием природных аллергенов значительно увеличивается уровень назального эозинофильного катионного белка (ЭКБ) (18,19). Мокбель с соавт. (Mogbel et al.) обнаружил, что анти-ЭКБ моноклональные антитела EG2 распознают только активированные эозинофилы, в то время как анти-ЭКБ моноклональные антитела EG1 распознают и активированные и не активированные эозинофилы (20). Поэтому соотношение EG2/EG1 считается наиболее надежным показателем для идентификации активированных эозинофилов.

У нас нет данных о проведении исследований оральной иммуноотерапии детей с аллергией на пыльцу трав. Поэтому мы выполнили рандомизированное, плацебо-контролируемое исследование детей с аллергией на пыльцу трав, чтобы оценить клиническую эффективность и безопасность локальной иммуноотерапии алергоидами. Также мы определили уровни назального ЭКБ с помощью антител (EG1 и EG2) вне сезона цветения и во время него для того, чтобы оценить степень аллергического воспаления.

Материалы и методы

Пациенты

В исследование было включено 48 детей (21 мальчик и 27 девочек) в возрасте от 4 до 14 лет (средний возраст 8,4 года), амбулаторных пациентов педиатрических отделений поликлиник в городах Парма, Перуджа и Брешиа (Италия). У детей были риниты и/или конъюнктивиты и/или бронхиальная астма вызванные пылью трав, подтвержденные наличием сывороточных специфических IgE антител к пыльце трав, а также положительными результаты кожных прик-тестов на пыльцу трав, в том числе на пыльцу, содержащуюся в экстрактах для иммуноотерапии. Сорок три ребенка имели астму, 34 – ринит и 27 – конъюнктивит (см. Таб. 1). На основе клинических симптомов и по результатам кожных прик-тестов были отобраны такие пациенты, у которых сенсibilизация к другим аллергенам (клещи, постенница, перхоть кошек и собак, береза, полынь, *Alternaria* и *Aspergillus*) отсутствовала.

Таблица 1 – Характеристики пациентов в начале исследования

	Иммуноотерапия кол-во - 24 чел.	Плацебо кол-во – 20 чел.	P-значение
Пол (м/ж)	12/12	13/7	не значительное
Средний возраст (лет)	8,7(3,3)	8,1(2,7)	не значительное
Астма	7	3	не значительное
Ринит	1	-	не значительное
Астма и ринит	3	3	не значительное
Астма, ринит и конъюнктивит	13	14	не значительное

Пациенты с круглогодичной астмой и/или ринитом, получавшие специфическую иммунотерапию в течение 3-х лет, предшествовавших началу настоящего исследования и пациенты, принимающие системные стероиды были исключены из исследования. Другим критерием отбора были противопоказания для иммунотерапии сформулированные ЕААСИ (1).

Согласно сгенерированных компьютером списков, группы детей были рандомизированы, либо для лечения аллергоидами пыльцы трав, в виде растворимых во рту таблеток, либо для получения плацебо. Ни исследователи, ни пациенты не были осведомлены о том, кому назначено лечение. Все пациенты были проинформированы и подписали соглашение.

Кожные прик-тесты и специфические IgE на пыльцу трав

Кожные прик-тесты были выполнены с использованием коммерческих экстрактов (Лофарма С.п.А., Италия). Экстракты для кожных прик-тестов были не из тех серий аллергенов, которые предназначены для иммунотерапии. В качестве отрицательного контроля использовался растворитель. Гистамин 10 мг/мл использовался для положительного контроля. Реакция считалась положительной, если разница диаметра волдыря и диаметра отрицательного контроля составляла, по крайней мере, 3 мм. Циркуляция специфического IgE к пыльце трав оценивалась с помощью системы CAP (Pharmacia, Uppsala, Sweden) и считалась положительной, если определялся, по меньшей мере, класс 2.

Иммунотерапия

Иммунотерапия проводилась коммерчески доступными таблетками (ЛАЙС, Лофарма С.п.А., Милан, Италия), действующим веществом которых является смесь мономерных аллергоидов пыльцы травы (33% *Holcus Lanatus*, 33% *Pleum pretense* и 33% *Poa pratensis*). Процедура химической модификации и иммунологические особенности конечного продукта описывались Мистрелло и соавт. (Mistrrello et.al) (21). Вкратце, аллерген вступает в реакцию с цианатом калия (KCNO) при основном pH, в результате чего происходит частичное замещение аминокрупп и существенная потеря способности аллергена вступать в реакции с IgE антителами, что подтверждено методом RAST ингибирования (22). SDS-PAGE показал, что молекулярные размеры карбамиллированного аллергена соотносимы с размерами природного аллергена. Препараты ЛАЙС титрованы в аллергенных единицы (АЕ) и стандартизованы RAST ингибированием в сравнении с эталонным препаратом (ИНР). Аллергенные единицы – это биологические единицы изначально установленные для титрования продукции, предназначенной для интраназальной иммунотерапии, и определяются как 1/40 средней дозы специфического провокационного назального теста значительного числа страдающих аллергией добровольцев (23). Таблетки изготавливаются в следующих дозах: 25, 100, 300 и 1000 АЕ. Модифицированные KCNO аллергены имеют низкую аллергенную активность, но полностью сохраняют иммуногенные свойства (21). При этом они сохраняют размеры природных мономеров, что делает их особенно подходящими для трансмукозального способа введения. Большие молекулярные размеры полимеризованных аллергоидов (напр. с помощью глутаральдегида), предположительно, делают их не способными проникать через биологические мембраны.

Таблетки плацебо неотличимы от таблеток, содержащих лечебное вещество.

Иммунотерапия проводилась на основании предсезонного графика, с января до 15 апреля. Дети принимали таблетки с активным веществом или плацебо по утрам, на пустой желудок и держали их во рту до полного рассасывания (1-2 мин.). В начале лечения подбиралась доза, т.е. дети принимали активный экстракт с увеличением дозы

аллергена: 25, 50, 100, 200, 300, 600 и 1000 АЕ. Таблетки выдавались в каждый последующий день (трижды в неделю) до достижения максимальной дозы 1000 АЕ. Эту дозу назначали повторно три раза в неделю до начала сезона цветения, затем иммунотерапия была прекращена. Суммарная доза составила 37 250 АЕ.

Оценка симптомов и их лечение

Родители получили инструкции как регистрировать симптомы и любые ежедневно принимаемые лекарства в специальном дневнике в течение сезона цветения, с 15 апреля по 15 июня. Каждый месяц проводился медицинский осмотр и проверка записей в дневнике.

Еженедельно симптомы оценивались баллами (*назальные*: зуд, чихание, выделения из носа, заложенность носа; *глазные*: зуд, покраснение; *бронхиальные*: кашель, трудности при дыхании, хрипы), которые получались путем сопоставления ежедневной оценки, сделанной родителями по следующей шкале: 0 – нет симптомов, 1 – легкие, 2 – умеренные, 3 – тяжелые симптомы.

Пациентам было разрешено при необходимости принимать следующие лекарства: местные (назальные спреи и глазные капли) или системные антигистамины, ингаляционные β_2 -антагонисты, ингаляционные стероиды и теофиллин.

Прием лекарств регистрировали в дневнике и оценивали по следующей шкале: одно очко за каждый прием местных антигистаминных препаратов; два очка за каждую дозу системных антигистаминных препаратов, вдох β_2 -антагонистов, вдох ингаляционных стероидов, или теофиллина. Еженедельное потребление лекарств каждым пациентом учитывалось путем подсчета баллов суточных доз, описываемых выше.

Безопасность и соответствие

Безопасность лечения каждого пациента оценивалась в течение всего периода исследования. Родители должны были звонить в отделение, в случае если у детей возникали побочные эффекты от лечения, а также записывать их в дневник. Безопасность оценивалась по количеству побочных эффектов наблюдавшихся в ходе лечения после получения аллергена. Для каждого пациента записывался тип симптома; временной интервал после принятия дозы; продолжительность реакции; дозировка, вызвавшая реакцию; наличие любых сопутствующих нарушений. Соблюдение схемы лечения проверялось подсчетом оставшихся таблеток при каждом визите.

ЭКБ (Эозинофильный катионный белок)

Перед началом иммунотерапии (январь), при низкой концентрации пыльцы (апрель) и при умеренной концентрации пыльцы (начинается в июне), измерялись уровни назального ЭКБ с помощью моноклональных антител против EG1 и EG2.

Назальные пробы выполнялись методом инкубации *in situ*. Вкратце, в качестве твердой фазы использовалась губка с нанесенными на нее ковалентно моноклональными антителами EG1 и EG2 (Pharmacia, Uppsala, Sweden). Губку разрезали пополам и смачивали на листе ватмана, затем половинки вставляли в аппликаторы и закрывали мембраной. Аппликаторы вставляли на 10 мин. в нижние носовые раковины пациента. После чего губки помещались в тест-тубу с 1 мл 0,9% (w/v) раствора NaCl, содержащего в качестве консерванта NaN_3 0,02 % (w/v). Образцы хранились при -20°C до инкубации с конъюгированными анти-ЭКБ моноклональными антителами (Pharmacia, Uppsala, Sweden).

Подсчет пыльцы

Подсчет пылицы в течение сезона цветения, с 15 апреля по 15 июня, проводился Агентством региональной профилактики среды (Agenzia Regionale Prevenzione Ambiente).

Статистический анализ

Для обработки непрерывных переменных использовался дисперсионный анализ, а для категориальных переменных - χ -квадрат или точный тест Фишера. Величина симптомов, потребность в медикаментах и количество EG1 и EG2 были статистически проанализированы с помощью непараметрического теста; для внутригруппового анализа применялся тест Вилкоксона, а для межгруппового анализа - U-критерий Манна-Уитни. У каждого ребенка было определено соотношение EG2/EG1. Соотношение вычислялось следующим способом: $EG2/EG1 \times 100$. Затем была установлена средняя величина соотношения для каждой группы.

Результаты

Сорок четыре из 48 пациентов (91,6%), все 24 из активной группы и 20 из 24-х, получавших плацебо, прошли исследование и получили кумулятивную дозу 37 250 АЕ. Четыре пациента из группы плацебо отстранились от исследования, трое в связи с переездом и один из-за легкого побочного эффекта (внутрибрюшные боли). Характеристики групп с активной иммунотерапией и плацебо отражены в таблице 1. На момент начала исследования статистически значимая разница между двумя группами отсутствовала. В исследовании участвовали два 4-х летних ребенка. Один принимал плацебо, другой получал активное лечение.

Ни системных, ни местных неблагоприятных реакций в ходе лечения не наблюдалось. Все пациенты очень хорошо соблюдали схему лечения.

Во время сезона цветения число симптомов (средний балл за неделю) в группе лечения было ниже, чем в группе плацебо, разница составила статистически значимую величину (среднее [SD] 9,5[7,2] vs 14,5 [8,3]; $P < 0,05$) (см. рис. 1). Число назальных, глазных и бронхиальных симптомов было ниже в группе лечения, но разница была статистически значима только для бронхиальных симптомов (2,4[2,7] vs 4,6 [3,5]; $P < 0,05$) (см. рис.1).

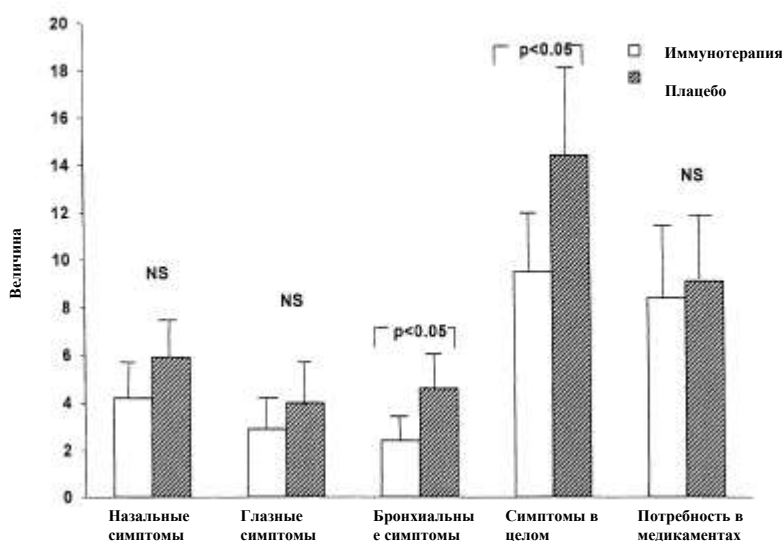


Рис. 1. Среднее за неделю (95% ДИ) число симптомов и степень потребности в медикаментах для групп иммунотерапии и плацебо во время сезона цветения. Суммарное число симптомов в среднем за

неделю и усредненное число бронхиальных симптомов за неделю в двух группах различались существенно ($P < 0,05$).

На протяжении всего сезона цветения потребность в медикаментах для снятия симптомов у пациентов из группы иммунотерапии была ниже, чем в группе плацебо. Эта разница была статистически значима на 3-ей неделе ($P < 0,05$), на 7-ой неделе ($P < 0,05$) и на 8-ой неделе ($P < 0,03$) (см. рис. 2). На рис. 2 показаны усредненные результаты еженедельного измерения количества пыльцы трав в воздухе на протяжении периода цветения. Из графика видно, что на протяжении 5 недель концентрация пыльцы была очень высокой (в среднем больше чем 80 крупинок пыльцы на один кубический метр) и на протяжении 4 недель высокой. На протяжении времени повышенного содержания пыльцы потребность в медикаментах была значительно ниже у группы иммунотерапии, чем у плацебо группы (10,1[3,3] vs 16,84 [4,4]; $P < 0,03$). В период умеренной экспозиции пыльцы существенной разницы по потребности в медикаментах у пациентов получавших лечение и получавших плацебо не выявлено (8,75[4,6] vs 11,5 [6,2]; $P < 0,05$).

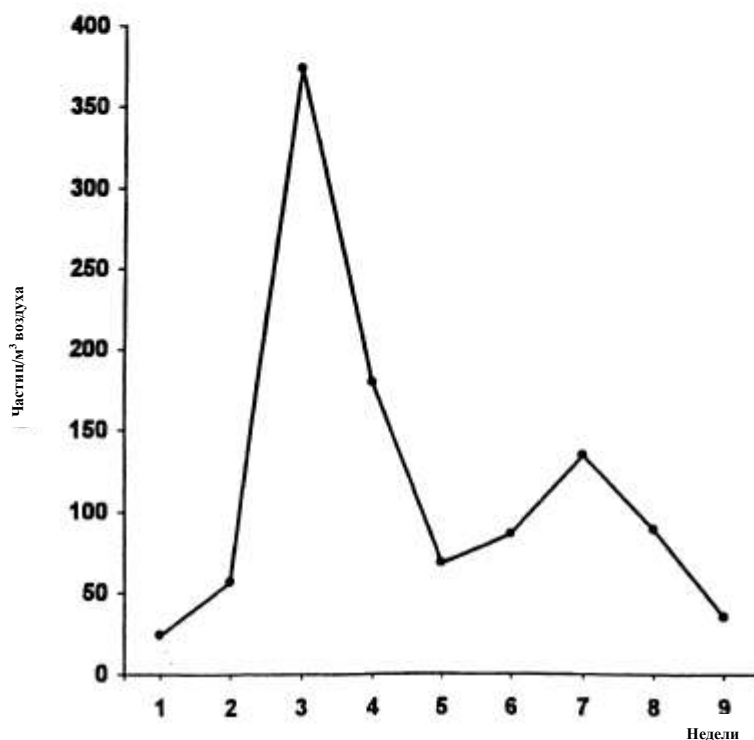
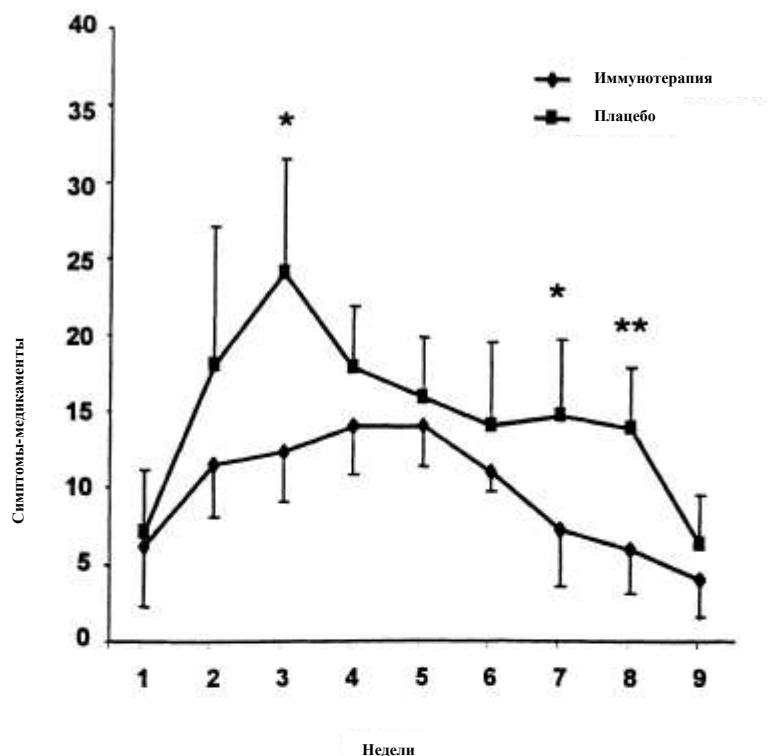


График 2. Средняя величина потребности в медикаментах (95% ДИ) и количество пыльцы в сезон цветения трав. Существенные различия между группами иммунотерапии и плацебо: *P<0,05; **P<0,03

В ходе исследования мы обнаружили, что у пациентов из группы иммунотерапии во время сезона цветения значительно увеличивается число назальных EG1 и EG2 (см. Таблицу 2). Сходные результаты мы наблюдали в группе плацебо. Сравнение уровней EG1 и EG2 показало отсутствие различий между группами иммунотерапии и плацебо (см. Таблицу 2).

В тоже время у пациентов из группы плацебо в сезон низкой концентрации пыльцы существенно повышается соотношение EG2/EG1 по сравнению с базовым

уровнем (T_0) (см. Таблицу 2). В группе иммунотерапии соотношение EG2/EG1 в сезон цветения не изменилось (см. Таблицу 2); межгрупповое сравнение показало отсутствие различий.

Таблица 2. Медиана (диапазон) и среднее значение (стандартное отклонение [SD]) уровней назальных EG1, EG2 и соотношения EG2/EG1 группах иммунотерапии и плацебо, по сравнению с базовым уровнем, до начала иммунотерапии (январь) (T_0), при низкой концентрации пыльцы трав (T_1) и при умеренной концентрации пыльцы трав (T_2).

	Медиана (диапазон)		
	Среднее (SD)		
	T_0	T_1	T_2
Группа иммунотерапии			
EG1(мкг/л)	6,6 (0,5 - 7,5) 10,3 (9,7)	19,2 (2,1 - 105)** 28,9 (29,6)	17,5 (0,1 - 200)* 53,6 (74,7)
EG2 (мкг/л)	0,1 (0,1 - 12,8) 1,9 (3,4)	3,6 (0,1 - 41)* 8,7 (11,5)	2,1 (0,1 - 97,2)* 12 (24,5)
EG2/EG1 (%)	14,7 (0,4 - 100) 19,0 (25)	20,8 (1,4 - 85,4) 28,0 (27)	22,7 (0,2 - 100) 31,6 (35)
Группа плацебо			
EG1 (мкг/л)	6,9 (0,1 - 31) 10,3 (9,8)	11,6 (0,1 - 135)* 30 (39)	8,3 (0,1 - 200) 36,6 (59,5)
EG2 (мкг/л)	0,1 (0,1 - 3,8) 0,8 (1,3)	2,3 (0,1 - 38,3)* 5,7 (10,3)	0,1 (0,1 - 200)* 16,0 (48)
EG2/EG1 (%)	4,0 (0,5 - 100) 14,9 (29)	10,0 (1,2 - 100)** 18,0 (23)	13,5 (0,3 - 100) 38,0 (41)

* T_0 vs T_1 и T_0 vs T_2 ; $P < 0,05$

** T_0 vs T_1 ; $P < 0,01$

Обсуждение

Наши результаты показывают, что ОПИ на пыльцу трав эффективно снижает респираторные симптомы, в частности астмы, после 3,5 месяцев предсезонного лечения детей. Вместе с тем, снижение назальных и глазных симптомов не достигает статистически значимой величины. Степень потребности в медикаментах в группе иммунотерапии, по сравнению с группой плацебо, была меньше в течение всего сезона цветения. Однако значительное уменьшение произошло, только когда пациенты были под воздействием высокой концентрации травяной пыльцы. Последние наблюдения могут уменьшить клиническое значение короткого предсезонного курса ОПИ.

Недавно была рассмотрена эффективность оральной иммунотерапии в двойном слепом, плацебо контролируемом исследовании была (2). В 2 из 6 исследований имеются доказательства клинической эффективности. Контролируемые испытания показали эффективность СЛИТ у взрослых с аллергическими ринитами на пыльцу трав (5,7,8) и с астмой (8,13). СЛИТ привела к клинически значимым улучшениям состояния детей с астмой, вызванной клещами (9) или пыльцой оливы (12). Наше исследование имеет следующие отличия от предыдущих исследований: 1) мы изучали детей с

гиперчувствительностью на пыльцу трав; 2) продукты аллергенов были оригинальной рецептуры; 3) продукты аллергенов держали в полости рта, а затем проглатывались.

Растворимые во рту таблетки имеют преимущества по сравнению с обычными каплями водных экстрактов, выражающиеся в том, что с их помощью гораздо легче определить дозу и меньше вероятности допустить ошибки при подсчете капель.

Механизм действия сублингвальной или оральной иммунотерапии пока не совсем ясен (25). Кинетические исследования радиоактивно меченных аллергенов показали, что следы аллергенов, которые держатся под языком, а затем проглатываются, остаются на слизистых оболочках полости рта в течение длительного времени – до 18-20 часов после проглатывания (26). Попадая в организм, часть аллергенов быстро абсорбируется в желудочно-кишечном тракте. Это позволяет сделать предположение о том, что задействованы и лимфоидная ткань слизистых оболочек и абсорбционная способность кишечника (22).

Исследования животных показали, что высокие дозы сублингвальных аллергенов супрессируют выработку IgE (28). Фанта с соавт. (Fanta et. al) (29) показал, что после сублингвальной иммунотерапии с последующим сплевыванием слюны значительно уменьшается пролиферативный ответ лимфоцитов периферической крови на воздействие травяной пыльцы. Более того, наблюдалось значительное увеличение уровня сывороточных специфических IgG, IgG4 и IgE (29). Вместе с тем, некоторые исследования показали, что СЛИТ не влияет на уровень сывороточных IgE, IgG, IgG4 или кожные тесты при реакции на пыльцу трав (13,14). Было выявлено, что оральная иммунотерапия уменьшает уровень специфических IgE и повышает уровни IgG4 и IgG1 у детей (30).

Мы определили уровни назального ЭКБ до сезона цветения и во время него с целью установить, может ли иммунотерапия модифицировать эозинофильную активность, которая является соответствующей частью аллергических воспалений. Наши результаты показали, что в течение сезона травяной пыльцы уровень назального ЭКБ значительно возрастает как у пациентов группы плацебо, так и у пациентов группы активного лечения. Эти открытия согласовываются с результатами открытых исследований, показавших значительное повышение ЭКБ в назальных выделениях в течение сезона пыльцы у пациентов, получающих медикаментозное лечение, и у пациентов проходящих инъекционную иммунотерапию (18).

Процент активированных ЭКБ более правильно оценивать используя соотношение EG2/EG1, поскольку моноклональные антитела EG1 и EG2 были рекомендованы для обнаружения, соответственно, суммарных и активированных ЭКБ (19). Мы обнаружили, что в сезон цветения соотношение EG2/EG1 значительно возрастает только в группе плацебо. В сезон цветения увеличение соотношения EG2/EG1 в группе плацебо было больше, чем в группе иммунотерапии, даже если оно было статистически незначительно. Совокупность данных результатов может указывать на возможную роль иммунотерапии в снижении эозинофильной активации. Это согласовывается с отчетами других исследований об уменьшении в клеточном инфильтрате нейтрофилов и эозинофилов, а также экспрессии ICAM-1 на эпителии после СЛИТ (10,17). Однако, предположив, что прошлые наблюдения представляют собой случайные выводы, мы выяснили, что уровни назальных EG1 и EG2 не были связаны с иммунотерапией. Дальнейшие исследования по сопоставлению уровней ЭКБ с величиной симптомов и сведениями о пыльце на протяжении всего сезона цветения трав, гарантированно прояснят интерпретацию этих параметров. В этих исследованиях важно учесть то, что различные методы приготовления образцов могут влиять на реакционную способность EG1 и EG2 (31).

Системные реакции при оральной и сублингвальной иммунотерапии (5-9,15), главным образом, желудочно-кишечные симптомы, крапивница, риниты и астма возникали редко. Анафилактический шок никогда не случался. В этом исследовании наблюдалась только одна легкая реакция, явившаяся последствием ОПИ.

Настоящее исследование позволяет сделать вывод о том, что при лечении симптомов астмы у детей аллергиков, предсезонный курс ОПИ аллергенами пыльцы трав более эффективен, чем плацебо. Однако наши результаты требуют дальнейшего подтверждения исследованиями большего количества детей.

Список литературы:

1. MALLING H-J, WEEKE B. Immunotherapy position paper. *Allergy* 1993;48 Suppl 14:9–35.
2. WHO position paper. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic disease. *Allergy* 1998;53 Suppl 44:1–42.
3. MALLING H-J, ABREU-NOGUEIRA J, ALVAREZCUESTA E, et al. Local immunotherapy position paper. *Allergy* 1998;53:933–944.
4. SCADDING K, BROSTOFF J. Low dose sublingual therapy in patients with allergic rhinitis due to dust mite. *Clin Allergy* 1986;16:483–491.
5. VAN NIEKERK CH, DE WET JI. Efficacy of grass-maize pollen oral immunotherapy in patients with seasonal hay fever: a double blind study. *Clin Allergy* 1987;17:507–513.
6. TARI MG, MANCINO M, MONTI G. Efficacy of sublingual immunotherapy in patients with rhinitis and asthma due to house dust mite. A double blind study. *Allergol Immunopathol (Madr)* 1990;18:277–284.
7. SABBAH A, HASSOUN S, LE SELLIN J, ANDRE'C, SICARD H. A double-blind, placebo-controlled trial by the sublingual route of immunotherapy with a standardized grass pollen extract. *Allergy* 1994;49:309–313.
8. FELIZIANI V, LATTUADA G, PARMIANI S, DALL'AGLIO PP. Safety and efficacy of sublingual rush immunotherapy with grass allergen extracts. A double blind study. *Allergol Immunopathol (Madr)* 1995;23:224–230.
9. NOVEMBRE E, MARANO E, BERNARDINI R, CARIA M, DINI L, VIERUCCI A. Studio controllato sull'immunoterapia per via sublinguale nel trattamento dell'asma allergico del bambino. *Riv Ital Pediatr* 1991;17:75–78.
10. PASSALACQUA G, ALBANO M, FREGONESE L, et al. Randomised controlled trial of local allergoid immunotherapy on allergic inflammation in mite-induced rhinoconjunctivitis. *Lancet* 1998;351: 629–632.
11. TROISE C, VOLTOLINI S, CANESSA A, PECORA S, NEGRINI AC. Sublingual immunotherapy in Parietaria pollen-induced rhinitis: a double-blind study. *J Investig Allergol Clin Immunol* 1995;5:25–30.
12. VOURDAS D, SYRIGOU E, POTAMIANOU P, et al. Double-blind placebo controlled evaluation of sublingual immunotherapy with standardized olive pollen extract in pediatric patients with allergic rhinoconjunctivitis and mild asthma due to olive pollen sensitization. *Allergy* 1998;53: 662–672.
13. CLAVEL R, BOUSQUET J, ANDRE'C. Clinical efficacy of sublingual-swallow immunotherapy: a double-blind, placebo-controlled trial of a standardized five-grass pollen extract in rhinitis. *Allergy* 1998;53:493–498.
14. QUIRINO T, IEMOLI E, SICILIANI E, PARMIANI S, MILAZZO F. Sublingual versus injective immunotherapy in grass pollen allergic patients: a double-blind (double dummy) study. *Clin Exp Allergy* 1996; 26: 1253–1261.
15. DI RIENZO V, PAGANI A, PARMIANI S, PASSALACQUA G, CANONICA GW. Post-marketing surveillance study on the safety of sublingual immunotherapy in pediatric patients. *Allergy* 1999;55: 1110–1113.
16. European Economic Community (EEC). CPMP Working party on quality of medicinal products. Note for guidance. III/3593/91-EN, 1991.
17. PASSALACQUA G, ALBANO M, RICCIO A, et al. Clinical and immunologic effects of a rush sublingual immunotherapy to Parietaria species: a double-blind, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104:964–968.
18. SVENSSON C, ANDERSSON M, PERSSON CG, VENGE P, ALKNER U, PIPKORN U. Albumin, bradykinins, and eosinophil cationic protein on the nasal mucosal surface in patients with hay fever during natural allergen exposure. *J Allergy Clin Immunol* 1990;85:828–833.
19. KLIMEK L, WOLF H, MEWES T, et al. The effect of short term immunotherapy with molecular standardized grass and rye allergens on eosinophil cationic protein and tryptase in nasal secretions. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103:47–53.
20. MOQBEL R, BARKANS J, BRADLEY BL, DURHAM SR, KAY AB. Application of monoclonal antibodies against major basic protein (BMK-13) and eosinophil cationic protein (EG1 and EG2) for quantifying eosinophils in bronchial biopsies from atopic asthma. *Clin Exp Allergy* 1992;22:265–273.
21. MISTRELLO G, BRENNANO O, RONCAROLO D, ZANONI D, GENTILI M, FALAGIANI P. Monomeric chemically-modified allergens: immunologic and physico-chemical characterization. *Allergy* 1996;51:8–15.

22. YMAN L, PONTERIUS G, BRANDT R. RAST based allergen assay methods. *Dev Biol Stand* 1975;1:51.
23. GIANNARINI L, MAGGI E. Decrease of allergen-specific T-cell response induced by local nasal immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 1998;28:404–412.
24. SENSI LG, SERI A, SIRACUSA A, PERTICI L, MARCUCCI F. Allergic rhinitis in children: effects of flunisolide and disodium cromoglycate on nasal eosinophil cationic protein. *Clin Exp Allergy* 1997;27:270–276.
25. HOLT PG. A potential vaccine strategy for asthma and allied atopic disease during early childhood. *Lancet* 1994;344:456.
26. BAGNASCO M, MARIANI G, PASSALACQUA G, et al. Absorption and distribution kinetics of the major *Parietaria judaica* allergen (Par j 1) administered by noninjectable routes in healthy human beings. *J Allergy Clin Immunol* 1997;100:122–129.
27. HOLT PG, SLY PD, SMITH W. Sublingual immunotherapy for allergic respiratory disease. *Lancet* 1998; 351: 613–614.
28. HOLT PG, VINES J, BRITTEN D. Sublingual allergen administration. I. Selective suppression of IgE production in rats by high allergen doses. *Clin Allergy* 1988;18:229–234.
29. FANTA C, BOHLE B, HIRT W, et al. Systemic immunological changes induced by administration of grass pollen allergens via the oral mucosa during sublingual immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol* 1999;120: 218–224.
30. GIOVANE AL, BARDARE M, PASSALACQUA G, CANONICA W. A three-year double-blind placebo-controlled study with specific oral immunotherapy to *Dermatophagoides*: evidence of safety and efficacy in paediatric patients. *Clin Exp Allergy* 1993;24:53–59.
31. NAKAJIMA H, LOEGERING DA, KITA H, KEPHART GM, GLEICH GJ. Reactivity of monoclonal antibodies EG1 and EG2 with eosinophils and their granule proteins. *J Leukoc Biol* 1999;66:447–454.