

RUBRICA SPECIALISTULUI

Inhibitorii de N-glicani în metodele de imunoanaliză pentru IgE alergen-specifice serice

N-Glycan Inhibitors in Immunoassay Methods for serum Allergen Specific IgE

[Florin-Dan Popescu \(/reviste/search?author=Popescu+Florin-Dan\)](#),

[Mariana Vieru \(/reviste/search?author=Vieru+Mariana\)](#),

[Carmen Saviana Ganea \(/reviste/search?author=Ganea+Carmen Saviana\)](#),

[Prof. Univ. Dr. Carmen Bunu-Panaitescu \(/reviste/search?author=Bunu-Panaitescu+Carmen\)](#)

First published: 31 martie 2020

Editorial Group: MEDICHUB MEDIA

DOI: 10.26416/Aler.4.1.2020.2983

Abstract

Cross-reactive carbohydrate determinants (CCDs) represent fucosylated/xylosylated N-glycans present in pollen and food of plant origin, latex and hymenoptera venoms. IgE antibodies against CCD do not have significant clinical relevance, but represent an important cause of cross-reactivity in the case of in vitro immunoassay methods for determining serum specific IgE. CCD inhibitors play a key role in the laboratory for preventing misinterpretation of such in vitro positive assays and for increasing their specificity.

Keywords

cross-reactive carbohydrate determinants, N-glycan inhibitors, IgE immunoassay

Rezumat

Determinanții carbohidrați cu reactivitate încrucișată/cross-reactivi (CCD) reprezintă N-glicani fucozilați/xilozilați prezenți în polenuri și alimente de origine vegetală, latex și veninuri de himenoptere. Anticorpii IgE față de CCD nu au relevanță clinică semnificativă, dar reprezintă o cauză importantă de reactivitate încrucișată în cazul

metodelor de imunoanaliză *in vitro* pentru determinarea IgE specifice serice. Inhibitorii CCD utilizați în laborator au un rol-cheie pentru a evita interpretarea greșită ca pozitivă a unor astfel de teste *in vitro* și cresc specificitatea lor.

Cuvinte cheie

determinanți carbohidrați cross-reactivi (/reviste/alergologia?tag=determinanți carbohidrați cross-reactivi)

inhibitori de N-glicani (/reviste/alergologia?tag=inhibitori de N-glicani)

imunoanaliză IgE (/reviste/alergologia?tag=imunoanaliză IgE)

Determinanții carbohidrați cu reactivitate încrucișată/cross-reactivi (*Cross-reactive Carbohydrate Determinants*, CCD) reprezintă N-glicani care sunt oligozaharide legate de asparagină, având miez cu a(1→3)-fucoză și/sau b(1→2)-xiloză, ca urmare a modificărilor posttranslaționale comune ale unor glicoproteine din plante, insecte și alte nevertebrate⁽¹⁾. N-glicanii constituie un grup cu diversitate mare de oligozaharide legate prin asparagină la glicoproteinele eukariotelor, fiind implicați în pliarea, stabilitatea, traficul intracelular, secreția și funcționarea proteinelor⁽²⁾.

Termenii de „cross-reactivitate” (reactivitate încrucișată) și „cross-reactiv” (cu reactivitate încrucișată) sunt cuvinte de origine engleză împrumutate în limba română (anglicisme) și recent integrate în limbajul de specialitate ca neologisme, fiind utilizați în documente oficiale ale Ministerului Sănătății (MS), inclusiv în documentele pentru curriculumul de pregătire în specialitatea alergologie și imunologie clinică, și ale Ordinului Biochimistilor, Biologilor și Chimistilor în Sistemul Sanitar din România (OBBCSSR)^(3,4). Similar, în limba italiană, termenul „cross-reattività” (*reattività crociata*) este utilizat în documente de pe paginile online oficiale ale Societății Italiene de Alergologie, Astm și Imunologie Clinică (*Società Italiana di Allergologia, Asma ed Immunologia Clinica*, SIAAIC) și ale Societății Italiene de Alergologie și Imunologie Pediatrică (*Società Italiana di Allergologia e Immunologia Pediatrica*, SIAIP)^(5,6).

Termenul de determinant carbohidrat cross-reactiv (CCD) a fost folosit prima dată în 1981, când s-a constatat că anticorpilor IgE din anumite seruri umane reacționează cu antigene prezente într-un număr mare de alimente de origine vegetală neînrudite, precum arahide, cartof, spanac, făină de grâu, orez, antigenele existând, de asemenea, și în grăuncioarele de polen. Anticorpilor au reacționat *in vitro*, surprinzător, și cu veninul de albină și viespe și au fost uneori induși de înțepăturile de himenoptere⁽⁷⁾.

Cele mai multe extracte alergenice naturale provenite din plante sau venin de insecte conțin CCD, dar CCD nu se comportă ca alergene *in vivo* și nu au semnificație relevantă clinic⁽⁸⁻¹²⁾. Inducerea anticorpilor IgE față de CCD la om se consideră că este determinată de expunerea la polen și/sau de înțepăturile de insecte⁽¹³⁾.

Anticorpilor de tip IgE față de CCD reacționează încrucișat cu toate proteinele care conțin astfel de epitopi CCD, de aceea reprezintă o cauză importantă de reactivitate încrucișată în cazul metodelor de imunoanaliză *in vitro* pentru determinarea IgE specifice serice față de alergene de origine vegetală care conțin CCD. Anticorpilor IgE anti-CCD sunt detectați la până la 25% dintre pacienții alergici, dar în general nu au nicio relevanță clinică în comparație cu anticorpilor IgE față de regiunile proteice

specifice. Deoarece mulți pacienți au anticorpi IgE anti-CCD nerelevanți clinic, un număr semnificativ de rezultate ale metodelor de imunoanaliză pentru IgE specifice serice sunt interpretate ca pozitive, dacă nu se utilizează inhibitor CCD. Prezența IgE anti-CCD poate deruta evaluarea reactivității *in vitro* în cazul în care se utilizează extracte naturale sau glicoproteine purificate care conțin CCD, cum ar fi cele din polenuri, alimente de origine vegetală, latex sau veninuri de himenoptere^(11,14-17).

Mai multe componente alergene naturale purificate utilizate în diagnosticul molecular alergologic prin imunoanaliză bazată pe nanotehnologie cu alergene cuplate cu nanoparticule și interpretare prietenoasă pentru pacient (*patient-friendly allergen nano-bead array*) conțin CCD: expansina **nLol p 1** din polen de graminee zănie sau raigras (*Lolium perenne*), **nOle e 1** din polen de măsline (*Olea europaea*), pectat liaza **nCup a 1** din polen de chiparos de Arizona (*Cupressus arizonica*), patatina **nSola t 1** din tubercul de cartof (*Solanum tuberosum*), globulina 7S de tip vicilină **nAra h 1** din arahidă (*Arachis hypogaea*), vicilina sau globulina 7S **Jug r 2** din nucă (*Juglans regia*), fosfolipaza A2 **nApi m 1** din venin de albină (*Apis mellifera*), tipic peroxidaza de hrean (*Armoracia rusticana*) **nArm r HRP** (*horseradish peroxidase*) și cistein proteaza **nAna c 2** din tulpină și fruct de ananas (*Ananas comosus*)⁽¹⁸⁾.

nAna c 2 (nMUXF3) este un N-glican purificat din bromelaina provenită din tulpina de ananas (*Ananas comosus*) capabil să detecteze IgE față de N-glicani din cele mai multe surse vegetale. Prescurtările din structura glicanului sunt: manoza (M), manoza nesubstituită central (U), xiloza (X) și fucoza (F). IgE serice anti-CCD sunt un biomarker de reactivitate față de fragmente de tip carbohidrat ale glicoproteinelor^(11,16,17).

Proteinele recombinante produse în *Escherichia coli* nu sunt afectate de recunoașterea CCD, datorită pierderii glicozilării posttranslaționale a proteinelor⁽¹⁹⁾. Cu toate acestea, metodele de imunoanaliză singleplex pentru IgE cu alergene recombinante, care utilizează celuloza, pot furniza rezultate fals-pozitive de până la 2 kU_A/L în serurile intens pozitive pentru CCD, ca urmare a prezenței reziduurilor de glicoproteine cu CCD în matricea de celuloză. Polimerul celulozic capsulat din imunoanaliza fluoroenzimatică în fază solidă conține mici cantități reziduale de CCD, suficiente pentru a produce legare de fond în serurile cu nivel ridicat de IgE anti-CCD. Acest fapt poate induce rezultate pozitive chiar și la alergene recombinante neglicozilate la 2-3% din serurile pacienților atopici⁽²⁰⁾.

Determinarea IgE anti-CCD folosind un identificator de tip MUXF fixat la faza solidă este utilă, dar nu poate discrimina între rezultatele fals-pozitive și cele cu adevărat pozitive⁽¹⁵⁾.

Eliminarea IgE anti-CCD cu CCD imobilizate a fost de asemenea sugerată, dar neaplicată, fiind considerată prea laborioasă pentru a fi utilizată de rutină^(9,21).

În cercetarea științifică a fost utilizată și distrugerea epitopilor de carbohidrați prin tratament cu periodat. Din păcate, conformația proteică poate fi modificată de acest tratament, ceea ce provoacă reducerea sensibilității și rezultate fals-negative. Prin urmare, oxidarea prin periodat nu este aplicată în testele de imunoanaliză disponibile comercial pentru determinarea IgE specifice⁽¹⁾.

Una dintre soluțiile practice pentru a evita rezultate fals-pozitive datorate IgE anti-CCD în cazul metodelor de imunoanaliză pentru determinarea IgE specifice serice poate fi adăugarea unui exces de glicoconjugate care să competiționeze cu legarea anticorpilor anti-CCD, dar, surprinzător, această soluție nu a fost aplicată de rutină în laboratorul de alergologie și imunologie clinică, chiar dacă glicoproteinele naturale din plante, cum ar fi peroxidaza de hrean sau ascorbat oxidaza, au fost alegeri evidente⁽¹⁵⁾.

Un inhibitor de *N*-glican CCD, semisintetic, de primă generație, constă din glicopeptide din bromelaină (din tulpină de ananas) legate cu albumină serică bovină (MUXF-BSA)⁽²²⁾.

Un inhibitor potent CCD de a doua generație a fost creat ca un conjugat glicopeptid-albumină serică umană (HSA), pentru care glicopeptidele vegetale au fost supuse unei scheme riguroase de purificare, iar polimerul transportor este albumina umană. Astfel de glicopeptide care conțin maximum patru reziduuri de aminoacizi sunt purificate din bromelaină ca glicoproteină vegetală și cuplate la albumina serică umană în proporție de cel puțin 7 la 1. Această abordare asigură absența epitopilor pentru IgE pe bază de proteine și, prin urmare, specificitate maximă. Măsurile de control al calității prin spectrometrie de masă asigură calitatea constantă a produsului. Doza recomandată este de 2 volume de blocant CCD la 100 de volume de ser – sau, altfel spus, 20 μ L de blocant CCD pentru fiecare mL de ser. Inhibitorul CCD și serul pacientului se amestecă corect înainte de prelucrarea ulterioară, cu etapă de preincubare scurtă. Astfel de inhibitor de *N*-glican CCD este disponibil sub formă de pulbere liofilizată, care la dizolvarea în apă realizează concentrație de 1 mg/mL inhibitor într-un tampon slab de acetat de amoniu. Există și imunoanaliză multiplex care integrează inhibitor CCD în diluentul probelor. Utilizarea inhibitorilor de *N*-glicani CCD poate fi aplicată în metode de imunoanaliză pentru IgE specifice de tip singleplex, multiparametric și multiplex^(1,15,17,22,23).

Referitor la recunoașterea alergenelor într-un sistem de imunoanaliză *in vitro*, același alergen cu un epitop glican și un epitop peptidil poate conduce la rezultat pozitiv în trei situații diferite. Dacă serul de testat conține doar anticorpi IgE specifici pentru *N*-glican (anticorpi IgE anti-CCD), rezultatul este fals-pozitiv și se datorează CCD, dacă serul conține doar anticorpi IgE specifici peptidelor, rezultatul este pozitiv real și se datorează sensibilizării peptidice, iar dacă serul de testat conține anticorpi IgE față de peptide și glicani, rezultatul pozitiv incert este datorat unei sensibilizări mediate IgE față de peptide cu semnal amplificat din cauza anticorpilor IgE anti-CCD. Problema CCD poate fi mai puțin perceptibilă în cazul imunoanalizelor singleplex cu indicație ghidată anamnestic, dar exercită efect confuzionant mai amplu în cazul sistemelor de imunoanaliză cu alergene multiple evaluate concomitent⁽²³⁾.

Într-o metodă de imunoanaliză multiparametrică pentru diagnostic *in vitro* cu extracte alergenicice naturale și componente alergenicice purificate caracterizate biochimic, acoperind benzi în linii subțiri paralele de tip line-blot, pentru a preveni potențiale rezultate fals-pozitive ale testelor datorate IgE anti-CCD, anticorpii cu reactivitate încrucișată din eșantionul pacientului pot fi eliminați prin legare prealabilă a unui absorbant anti-CCD⁽²⁴⁾.

O altă analiză imunoenzimatică multiparametrică cu extracte naturale și componente alergenice care acoperă o membrană fixată în casete utilizează inhibitor de *N*-glican compus din structuri CCD polivalente de bromelaină, cu mai puțin de patru aminoacizi rămași după proteoliză și purificare, ceea ce garantează lipsa epitopilor peptidici. Glicopeptidul astfel obținut este atașat la proteina transportor, care este albumina serică umană extrem de purificată⁽²⁵⁾.

Imunoanaliza multiplex în fază solidă bazată pe nanotehnologie de tip macroarray utilizată ca explorator de alergologie moleculară (*macroarray nanotechnology-based immunoassay as a molecular allergy explorer*), introdusă recent în laboratorul de alergologie și imunologie clinică, integrează inhibitor CCD potent în timpul incubării serului^(17,26). Acest conjugat glicopeptid-HSA reduce dificultatea interpretării de către medicii alergologi clinicieni a rezultatelor *in vitro* CCD pozitive și crește specificitatea rezultatelor testului. Un astfel de test *in vitro* de generație nouă pentru alergiile mediate IgE are un panel extins de peste 290 de alergene, cu extracte alergenice naturale și alergene moleculare native (n) sau recombinante (r), completat de determinarea concomitentă a IgE totale. Diferitele extracte și componente alergenice moleculare sunt disponibile pe membrană de nitroceluloză în cipul din cartuș. La fiecare cartuș se adaugă 400 μL de diluent de probă care include inhibitorul CCD și se adaugă 100 μL din proba pacientului, asigurându-se că soluția rezultată este răspândită uniform. Incubarea serului se efectuează timp de 2 ore. Lactoferina umană Hom s LF este o proteină cu CCD care poate fi utilizată pentru evaluarea eficacității inhibitorului CCD. Cu procedura standard de inhibare a CCD, eficiența inhibării anticorpilor anti-CCD este de 85%. O etapă suplimentară de inhibare a CCD conduce la o rată de inhibare a acestor anticorpi de peste 95%⁽²⁶⁻²⁹⁾.

Concluzii

Interferențele analitice datorate IgE anti-CCD pot afecta rezultatele metodelor imunologice pentru determinarea IgE specifice serice față de polenuri, alimente de origine vegetală, latex sau veninuri de himenoptere, de aceea inhibitorii de CCD ca *N*-glicani fucozilați și/sau xilozilați utilizați în laborator au un rol-cheie pentru a evita interpretarea greșită ca pozitive a rezultatelor unor astfel de teste *in vitro* pentru a crește specificitatea lor.

Bibliografie

1. Hemmer W. Human IgE antibodies against Cross-Reactive Carbohydrate Determinants. In: Anticarbohydrate antibodies: from molecular basis to clinical application. Kosma P, Muller-Loennies S. (eds). Springer. Wien New York. 2012, 191-203.
2. Lannoo N, Van Damme EJ. Review/N-glycans: The making of a varied toolbox. Plant Sci. 2015; 239: 67-83.
3. www.ms.ro/wp-content/uploads/2016/12/Alergologie-si-imunologie-clinica.pdf (accesare online la data de 13 ianuarie 2019).
4. www.obbcssr.ro/files/6._D.Popa_Rolu_Specialistului_OBBCSSR_2018.pdf (accesare online la data de 13 ianuarie 2019).
5. www.siaaic.org/?p=3799 (accesare online la data de 13 ianuarie 2020).
6. www.siaip.it/upload/riap/1482_Le%20reazioni%20di%20ipersensibilita%20agli%20antibiotici%20beta-lattam (accesare online la data de 13 ianuarie 2019).
7. Aalberse RC, Koshte V, Clemens JG. Immunoglobulin E antibodies that crossreact with vegetable foods, pollen, and Hymenoptera venom. J Allergy Clin Immunol. 1981; 68(5):356-64.
8. van der Veen MJ, van Ree R, Aalberse RC, Akkerdaas J, Koppelman SJ, Jansen HM, van der Zee JS. Poor biologic activity of cross-reactive IgE directed to carbohydrate determinants of glycoproteins. J Allergy Clin Immunol. 1997; 100(3):327-34.

9. Malandain H, Giroux F, Cano Y. The influence of carbohydrate structures present in common allergen sources on specific IgE results. *Eur Ann Allergy Clin Immunol.* 2007; 39: 216-220.
10. Mari A, Ooievaar-de Heer P, Scala E, Giani M, Pirrotta L, Zuidmeer L, Bethell D, van Ree R. Evaluation by double-blind placebo-controlled oral challenge of the clinical relevance of IgE antibodies against plant glycans. *Allergy.* 2008; 63(7):891-6.
11. Altmann F. Coping with cross-reactive carbohydrate determinants in allergy diagnosis. *Allergo J Int.* 2016; 25(4): 98-105.
12. Mahler V, Gutgesell C, Valenta R, Fuchs T. Natural rubber latex and hymenoptera venoms share Immunoglobulin E-epitopes accounting for cross-reactive carbohydrate determinants. *Clin Exp Allergy.* 2006; 36(11): 1446-56.
13. Matricardi PM, Kleine-Tebbe J, Hoffmann HJ, Valenta R, Hilger C, Hofmaier S, Aalberse RC, Agache I, Asero R, Ballmer-Weber B, Barber D, Beyer K, Biedermann T, Bilò MB, Blank S, Bohle B, Bosshard PP, Breiteneder H, Brough HA, Caraballo L, Caubet JC, Cramer R, Davies JM, Douladiris N, Ebisawa M, Elgenmann PA, Fernandez-Rivas M, Ferreira F, Gadermaier G, Glatz M, Hamilton RG, Hawranek T, Hellings P, Hoffmann-Sommergruber K, Jakob T, Jappe U, Jutel M, Kamath SD, Knol EF, Korosec P, Kuehn A, Lack G, Lopata AL, Mäkelä M, Morisset M, Niederberger V, NowakWęgrzyn AH, Papadopoulos NG, Pastorello EA, Pauli G, PlattsMills T, Posa D, Poulsen LK, Raulf M, Sastre J, Scala E, Schmid JM, Schmid-Grendelmeier P, van Hage M, van Ree R, Vieths S, Weber R, Wickman M, Muraro A, Ollert M. EAACI Molecular Allergology User's Guide. *Pediatr Allergy Immunol.* 2016; 27 Suppl 23: 1-250.
14. Mari A. IgE to cross-reactive carbohydrate determinants: analysis of the distribution and appraisal of the in vivo and in vitro reactivity. *Int Arch Allergy Immunol.* 2002; 129: 286-295.
15. Holzweber F, Svehla E, Fellner W, Dalik T, Stubler S, Hemmer W, Altmann F. Inhibition of IgE binding to cross-reactive carbohydrate determinants enhances diagnostic selectivity. *Allergy.* 2013; 68: 1269-1277.
16. Altmann F. The role of protein glycosylation in allergy. *Int Arch Allergy Immunol.* 2007; 142: 99.
17. Popescu FD, Vieru M. Precision medicine allergy immunoassay methods for assessing immunoglobulin E sensitization to aeroallergen molecules. *World J Methodol.* 2018; 8(3):17-36.
18. www.caam-allergy.com/pdf/Green_John_IgE_Multiplex_FABER244_ENG.pdf (accesare online la data de 13 ianuarie 2020).
19. Demain AL, Vaishnav P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol Adv.* 2009; 27: 297-306.
20. Hemmer W, Altmann F, Holzweber F, Gruber C, Wantke F, Wöhrl S. ImmunoCAP cellulose displays cross-reactive carbohydrate determinant (CCD) epitopes and can cause false-positive test results in patients with high anti-CCD IgE antibody levels. *J Allergy Clin Immunol.* 2018; 141(1): 372-381.
21. Jin C, Nitsch S, Hemmer W, Altmann F. Improving allergy diagnosis by removal of CCD-specific IgE from patients' sera. *Allergy* 2009; 64(Suppl. 90):30.
22. www.proglycan.com/allergy-diagnosis/proglycan-ccd-blocker/how-it-works (accesare online la data de 13 ianuarie 2020).
23. <https://mediwiss-analytic.de/ccd.html> (accesare online la data de 13 ianuarie 2020).
24. www.euroimmunblog.com/cross-reactive-anti-ccd-antibodies-can-hinder-allergy-diagnostics (accesare online la data de 13 ianuarie 2020).
25. Grzywnowicz M, Majsiak E, Gawęł J, Miśkiewicz K, Doniec Z, Kurzawa R. Inhibition of Cross-Reactive Carbohydrate Determinants in allergy diagnostics. *Adv Exp Med Biol.* 2018; 1116: 75-79.
26. Heffler E, Puggioni F, Peveri S, Montagni M, Canonica GW, Melioli G. Extended IgE profile based on an allergen macroarray: a novel tool for precision medicine in allergy diagnosis. *World Allergy Organ J.* 2018; 11(1):7.
27. https://a.storyblok.com/f/69176/x/81f1990ace/alex2_allergen_list_en.pdf (accesare online la data de 13 ianuarie 2020).
28. www.macroarraydx.com (accesare online la data de 13 ianuarie 2020).
29. ALEX (Allergy Explorer) Instruction for use. 20170821_RZ_ALEX_Gebrauchsanweisung_EN.indd

MedicHub

[Acasă \(/acasa\)](#)

[Misiunea noastră \(/misiunea-noastra\)](#)

[Știri \(/stiri\)](#)

[Reviste \(/reviste\)](#)

[Contact \(/contact\)](#)

Contact