

Krzyżowo reagujące determinanty węglowodanowe (CCD) i bloker CCD w diagnostyce alergii



Dr n. med.
Emilia Majsia¹

Dr n. med.
Maciej Grzywnowicz¹

Prof. dr hab. n. med.
Krzysztof Buczyński²

¹ Polsko-Ukraińska
Fundacja Rozwoju
Medycyny, Lublin

² NZOZ Centrum
Alergologii, Łódź

Cross-reactive Carbohydrate Determinants (CCD) and CCD blocker in allergy diagnostics

S U M M A R Y

Cross-reactive Carbohydrate Determinants (CCD) are widespread in the plant world. Because of structural similarities, they can cause cross-reactions between different allergens with similar carbohydrate-like biochemical chains. For the same reason, there are also problems with serological diagnostics. One way to overcome them may be to use an anti-CCD antibodies blocker. Its purpose is to reduce the false positives in the immunoglobulin E (IgE) detection test caused by the anti-CCD antibodies present in a given test sample. Blocking of anti-CCD antibodies can contribute to the actual sensitization results. Due to the prevalence of anti-CCD antibodies in the general population, CCD blocker significantly increases the specificity of serological methods for the diagnosis of IgE-dependent allergy.

Determinanty węglowodanowe (CCD) są szeroko rozpowszechnione w świecie roślin. Ze względu na podobieństwa strukturalne mogą powodować reakcje krzyżowe pomiędzy różnymi alergenami, w których występują podobne pod względem budowy biochemicznej łańcuchy węglowodanowe. Z tego samego powodu występują również problemy w zakresie diagnostyki serologicznej. Jednym ze sposobów ich przezwyciężenia może być zastosowanie blokera przeciwciał anti-CCD. Celem jego zastosowania jest ograniczenie fałszywie pozytywnych reakcji w teście wykrywającym swoiste immunoglobuliny E (IgE), spowodowanych przez przeciwciała anti-CCD występujące w danej próbce badanej. Zablokowanie przeciwciał anti-CCD może przyczynić się do uzyskania wyników rzeczywistego uczulenia. Ze względu na powszechność występowania przeciwciał anti-CCD w populacji bloker CCD znacząco zwiększa swoistość metod serologicznych w diagnostyce alergii IgE-zależnej.

Majsia E.: Krzyżowo reagujące determinanty węglowodanowe (CCD) i bloker CCD w diagnostyce alergii *Alergia*, 2017, 4; 24-27

Determinanty węglowodanowe

Determinanty węglowodanowe (nazywane CCD od angielskich słów cross-reacting carbohydrate determinants) u niektórych osób mogą działać immunogennie skutkując wytworzeniem swoistych immunoglobulin E (IgE) w surowicy (IgE anti-CCD) [1]. Nie do końca poznana jest ich rola, a znaczenie w alergii jest kwestionowane i pozostaje przedmiotem badań od kilkunastu lat [2, 3].

Białka są jednym z podstawowych materiałów budujących komórki. Wśród nich wyróżniamy nieliczną grupę białek prostych (zbudowanych jedynie z aminokwasów), oraz znacznie powszechniejszą grupę białek złożonych.

W swoim składzie białka złożone zawierają trwałe wbudowany składnik niebiałkowy, np. cukrowy (węglowodanowy) tworząc grupę glikoprotein. Reprezentantem właśnie tej grupy są determinanty węglowodanowe - CCD [4].

Mogą one w swoim składzie zawierać różne ilości węglowodanów, przyłączonych do białek, jako krótkie lub długie (do 15 jednostek), rozgałęzione lub nierozgałęzio-

ne łańcuchy (Rycina 1). Efektem tego jest to, że determinanty węglowodanowej nie możemy traktować jako jednego antygeny – to nazwa zbiorcza dla ogromnej ilości możliwych kombinacji, z czego wynikają trudności w ocenie wyników diagnostyki serologicznej alergenów, w których one występują. Reszty węglowodanowe łączą się z białkami przy pomocy grup aminowych (N-glikany) lub hydroksylowych (O-glikany). Szczególnie immunogenne są fragmenty N-glikanowe indukujące produkcję immunoglobulin klasy E. Krzyżową reaktywność pomiędzy różnymi źródłami alergenowymi tłumaczy się obecnością reszty α -1,3-fukozy we fragmentach N-glikanów pochodzenia roślinnego, a także występujących u owadów (np. *Apis mellifera*). Podobne łańcuchy zostały opisane u robaków pasożytniczych (np. *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonica*) oraz u ślimaków [1].

Występowanie CCD

Determinanty węglowodanowe są bardzo szeroko rozpowszechnione w środowisku. Ich obecność stwierdzo-

Słowa kluczowe:
determinanty
węglowodanowe
(CCD), IgE anti-CCD,
bloker CCD

Key words:
cross-reactive
carbohydrate
determinants (CCD),
IgE anti-CCD, CCD
blocker



no w wielu alergenach pochodzenia roślinnego (owoce, warzywa i pyłki), jak również w ekstraktach jadów owadów [1, 5].

Podobieństwa struktury biochemicznej reszt węglowodanowych mogą indukować reakcje krzyżowe pomiędzy różnymi źródłami alergenowymi, w których one występują [6].

W latach siedemdziesiątych ubiegłego wieku, grupa japońskich naukowców badała strukturę proteazy z ananasa. Jak się później okazało, była to bromelaina, zawierająca oligosacharyd o dwóch strukturalnych cechach, których nie znaleziono w glikoproteinach ssaków [5].

Baza danych allergome.org zawiera ponad 30 różnych komponent przyporządkowanych do grupy CCD-bearing protein (XF). W wśród nich są Ana c 2 (ananas), Api m 1, Api mc 1, Api ml 1 (pszczoły miodne), Ara h 1 (orzech ziemny), Bra di 4, Bro a 4, Bro i 91, Cyn d 1 (trawy - wiechlinowate), Cup a 1 (cyprys), Jug r 2 (orzech włoski), Lol p 1, Lol p 4 (życica), Phl p 1, Phl p 4 (tymotka łąkowa), Pla a 2 (platan), Sola t 1 (ziemniak) czy Arm r HRP (chrzan) [6].

Znaczenie kliniczne CCD

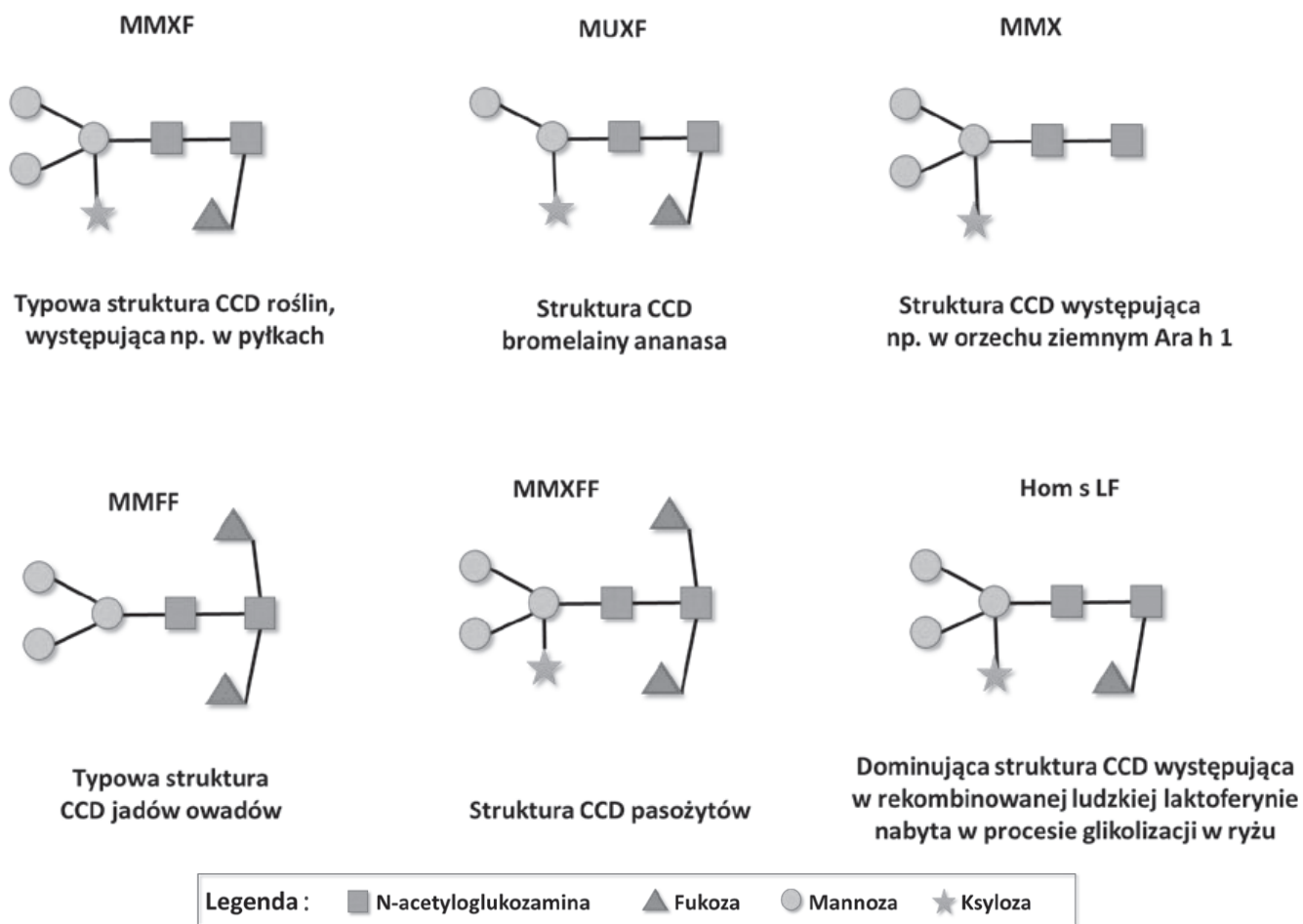
Prowadzone obserwacje przez ostatnich 15 lat u pacjentów, u których stwierdzono występowanie IgE anty-CCD sugerowały, że obecność tych przeciwciał nie powo-

duje widocznych objawów klinicznych [7]. Kilka ostatnich badań wyraźnie wskazuje na brak klinicznego znaczenia determinant węglowodanowych [8-10]. Potwierdza to również, duże badanie przeprowadzone przez Adriano Mari, który przebadał surowice od 1,831 osób z podejrzeniem choroby układu oddechowego o podłożu alergicznym, wykrywając IgE wobec bromelainy. Analiza danych pokazała, że częstość występowania swoistych IgE wobec CCD wynosiła 23%. Częstość ta zmieniła się w przypadku podgrupy niealergiczej (5%), uczulonych na inne alergeny niż pyłki (15%) i uczulonych na pyłki (31%).

Częstość występowania sIgE wobec CCD była wyższa u osób uczulonych na wiele pyłków (71%) oraz u osób po przeprowadzonej immunoterapii pyłkowej (46%), podczas gdy różnice płci i wieku były niewielkie [9].

Inne duże badanie obejmujące 1 025 osób dorosłych z nieżytym nosa i astmą obejmujące kwestionariusz, punktowe testy skórne (SPT), całkowite IgE, multialergenowe testy IgE i swoiste IgE (sIgE) na bromelainę, MUXF (bromelaina typu N) i fosfolipazę A2 (pszczoła miodna) pokazały, że częstość uczulenia na CCD (MUXF sIgE i/lub bromelaina sIgE ≥ 0.1 kU(A)/l) wyniosła 18%. Tylko 58 pacjentów (5,6%) wykazało poziomy IgE wobec CCD ≥ 0.35 kU (A)/l. Obecność CCD towarzyszyła częściej uczuleniu na pyłki

1 Ryc. Budowa strukturalna determinant węglowodanowych (CCD) z różnych źródeł pochodzenia. Opracowanie własne, za zgodą autora na podstawie rysunku Altmann F. Int Arch Allergy Immunol 2007 [5]



niż na roztocza. Uczulenie na błonkoskrzydłe było związane z występowaniem przeciwciał anti-CCD. Stężenie oznaczonych przeciwciał anti-CCD nie było istotnie związane z wiekiem, miejscem zamieszkania, spożyciem alkoholu czy paleniem tytoniu [11].

Znaczenie występowania przeciwciał E wobec CCD badano również przy użyciu komercyjnego testu aktywacji bazofili (BAT) testując 62 pacjentów uczulonych na owady błonkoskrzydłe oraz 16 pacjentów niealergiczy, jako grupy kontrolnej.

Uzyskane dane sugerują, że występowanie przeciwciał IgE wobec CCD jest klinicznie nieistotne u tych pacjentów [12]. Nie są poznane przyczyny tej zasadniczo całkowitej niezdolności wywołania objawów uczuleniowych.

Nie wiadomo również, dlaczego w surowicy niektórych pacjentów pojawiają się przeciwciała anti-CCD. Rozważana jest zależność pomiędzy ich obecnością w surowicy, a ugryzieniem przez owady błonkoskrzydłe [11]. Badane jest również zwiększone ryzyko indukcji IgE anti-CCD wśród osób znacznie nadużywających alkohol [13, 14]. Interesujące powiązanie z funkcją fizjologiczną IgE może stanowić badanie, w wyniku którego stwierdzono zwiększone stężenie anti-CCD w wyniku zakażenia pasożytami [13].

Możliwość występowania reakcji krzyżowych z udziałem przeciwciał anti-CCD, może prowadzić w niektórych przypadkach do błędów w diagnostyce serologicznej [5, 8]. Skutkiem czego, u pacjenta uczulonego na pyłki roślin i/lub jady owadów błonkoskrzydłych może pojawić się dodatni wynik na latex, pomimo że pacjent nie miał z nim styczności. Przeciwciała anti-CCD reagują krzyżowo z tym antygenem, sugerując uczulenie na latex [1, 14].

Z praktycznego punktu widzenia, jeśli anti-CCD zostaną wykryte w surowicy pacjenta, to jego wyniki dla wielu alergenów (tj.: pyłki i pokarmy pochodzenia roślinnego, jady owadów, lateks) mogą imitować stan polisensytyzacji (alergie wieloważną). Analizując wynik sugerujący polisensytyzację w każdym przypadku należy przede wszystkim uwzględnić obraz kliniczny pacjenta i jego wywiad.

W przypadku diagnostyki alergii na jady owadów błonkoskrzydłych zwłaszcza jeśli u pacjenta wystąpił wstrząs anafilaktyczny nie można wykonać testów skórnych, ani testów prowokacji w ośrodkach bez akredytacji. W związku z tym dużo większe znaczenie ma określenie prawidłowego wyniku w oznaczeniu serologicznym. W takim przypadku każdy dodatni wynik badania IgE swoistego we krwi bez zbadania obecności CCD może wpłynąć na złą interpretację wyników i podjęcie nieprawidłowych decyzji terapeutycznych [8, 15, 16].

Sposoby oznaczania CCD

Obecnie w testach różnych producentów stosowane są różne metody oznaczania przeciwciał IgE wobec CCD w surowicy krwi. Najbardziej rozpowszechnione jest stosowanie bromelainy ananasa (MUXF). Uczulenie na ananasa w populacji występuje bardzo rzadko [1], dlatego właśnie ta determinanta używana jest najczęściej (testy ImmunoCAP, Polycheck). Węglowodanowy łańcuch MUXF

obecny jest w wielu roślinach, co może być przyczyną fałszywie dodatnich wyników dla alergenów, w których znajdują się krzyżowo reagujące determinanty węglowodanowe.

Innym antygenem używanym do oznaczania IgE wobec CCD w surowicy krwi jest peroksydaza chrzanowa (horseradish peroxidase – HRP).

W teście najnowszej generacji do diagnostyki molekularnej w nanotechnologii FABER znajduje się kilka komponent zawierających antygeny CCD, wśród których jest bromelaina ananasa (Ana c 2), patatyna ziemniaka (Sola t 1), peroksydaza chrzanowa (Arm r HRP) oraz Hom s LF (homolog ludzkiej laktoferyny). W przypadku dwóch pierwszych antygenów (Ana c 2 oraz Sola t 1) pomimo że, wynik dodatni z dużym prawdopodobieństwem wskazuje na występowanie swoistych przeciwciał E wobec reszt węglowodanowych, ponieważ epitopy bromelainy i patatyny mają niską immunogenność, to jednak nie pozwala on wykluczyć uczulenia na ananasa czy ziemniaka. Arm r HRP zawiera inną w odróżnieniu od Ana c 2 oraz Sola t 1 strukturę glikanów. Ciekawą propozycją do oznaczania w surowicy anti-CCD wydaje się Hom s LF. Możliwe, że spośród wymienionych jest on najlepszym markerem CCD, ponieważ jak dotąd, nie stwierdzono, aby rekombinowane białko ludzkiej laktoferyny, powodowało wytwarzanie przeciwciał IgE. Laktoferyna występuje w ślinie, łzach czy mleku ludzkim. W wyniku działań inżynierii genetycznej, po połączeniu z ryżem ulega glikolizacji, dzięki czemu przyłączone zostają do niej łańcuchy węglowodanowe. Reagujące z tą molekułą w trakcie testowania przeciwciała E są rzeczywiście dedykowane przeciw CCD [10, 17]. FABER, to nie tylko test, jest on swojego rodzaju platformą do diagnozowania alergii IgE-zależnych. Integralną jego częścią, jest system pomagający w interpretacji wyników CDRS PRO (dla lekarzy) pozwalający posegregować molekuly według grup homologicznych. Dzięki czemu pomaga analizować całą grupę alergenów (CCD-bearing protein XF) zawierających w swoim składzie reszty węglowodanowe w jednym miejscu. Pozwala on również posegregować molekuly według źródeł pochodzenia i analizować molekuly zawierające w swoim składzie CCD w odniesieniu do ekstraktu tego alergenu i innych jego molekul [18].

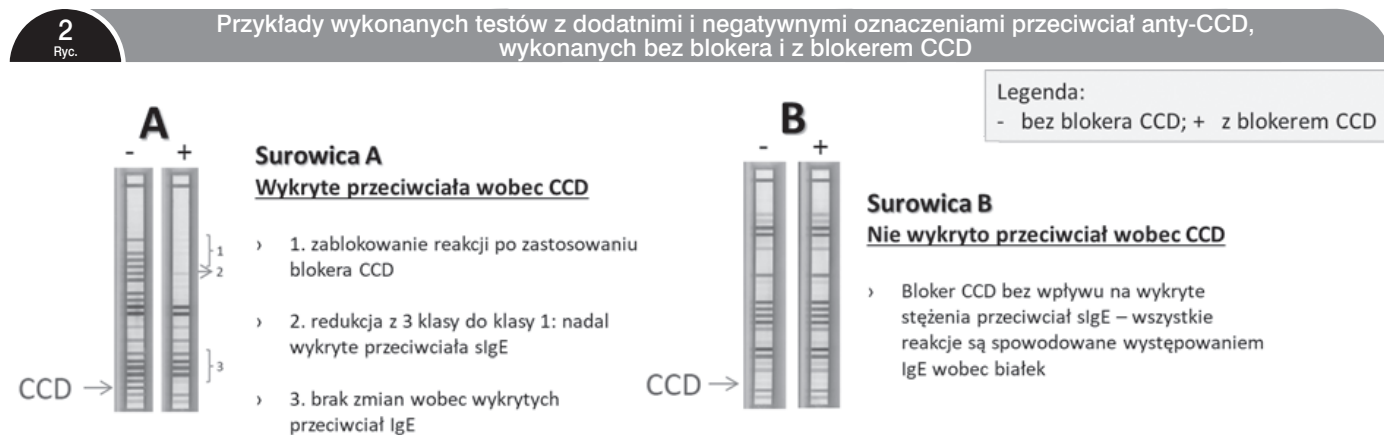
Bloker CCD

Blokerem CCD, inaczej inhibitorem CCD, nazywamy odczynnik, którego celem jest ograniczenie fałszywie pozytywnych reakcji w teście wykrywającym sIgE, które są powodowane przez przeciwciała IgE anti-CCD występujące w danej próbce badanej. W skład blokera CCD wchodzi wyselekcjonowana mieszanina cząsteczek CCD. Cząsteczki te zmieszane z badaną próbką surowicy, będą kompetytywnie łączyć się z obecnymi w próbce przeciwciałami E wobec CCD. Ponieważ cząsteczki CCD wchodzące w skład inhibitora CCD nie są związane z fazą stałą testu, w przeciwieństwie do cząsteczek ekstraktów alergenowych, ich kompleksy z IgE anti-CCD są w stanie wolnym i mogą być wypłukane razem z innymi niezwiązanymi elementami surowicy.



W podstawowym założeniu, jako bloker CCD mogą służyć teoretycznie dowolne glikoproteiny pochodzenia roślinnego zawierające typowe struktury CCD (MMXF lub MUXF). Im większą jest liczba struktur CCD tym większa ilość wiązanych typów przeciwciał E anty-CCD przez bloker CCD. Niezwykle istotny jest stopień oczyszczenia materiału, aby nie zawierał homologów do alergenów badanych.

ków dla alergenów pochodzenia roślinnego oraz jadów owadów. Tym samym wyniki badań serologicznych mogą w sposób bliższy stanowi faktycznemu oddawać poziom sIgE, pozwalając lepiej diagnozować faktyczne przypadki polisensytyzacji u osób diagnozowanych [20]. Rycina nr 2 (A, B) przedstawia wykonane oznaczenia multiparametrycznych ilościowych testów z wykrytymi oraz niewykrytymi



Również epitopy białkowe wykorzystanych glikoprotein powinny być w jak najmniejszym stopniu reaktywne, aby nie blokować przeciwciał innych niż anty-CCD.

Mając na uwadze powyższe wymagania w pracach nad doskonaleniem inhibicji przeciwciał anty-CCD coraz częściej stosuje się bloker anty-CCD. W multiparametrycznych testach alergologicznych Polycheck® wykorzystywany jest, jako opcjonalny półsyntetyczny bloker CCD (ProGlycAn CCD-blocker; www.proglycan.com). Jest on oparty o podlegające wieloetapowej proteolizie i wysokiemu oczyszczeniu poliwalentne struktury CCD roślinnej bromelajny, które związane są jedynie do maksymalnie 4 aminokwasów, co gwarantuje brak epitopów dla sIgE (oprócz anty-CCD) oraz zwiększoną swoistość. Tak przetworzone struktury CCD przyłączane są do nośnika białkowego: albuminy surowicy ludzkiej, co również pozwala uniknąć wiązania, innych niż anty-CCD, przeciwciał IgE. Zwiększa to efektywność działania bloкера, przez co wymagana jest jego mniejsza ilość do efektywnego działania [19].

Korzyści płynące z wykorzystania bloкера CCD

Podstawową korzyścią płynącą z wykorzystania bloкера CCD przy wykonywaniu testów alergologicznych wykrywających sIgE jest uniknięcie fałszywie pozytywnych wyni-

przeciwcałami anty-CCD a następnie wykonanymi oznaczeniami ponownie z zastosowaniem bloкера CCD. Można zaobserwować na nich, że użycie bloкера CCD zmniejszyło lub blokowało wykrywanie przeciwciał wobec alergenów zawierających CCD u pacjentów, u których wykryte zostały przeciwciała anty-CCD (rycina 2A). Podczas gdy, w surowicy pacjenta nie wykryto przeciwciał anty-CCD (rycina 2B), zastosowanie bloкера nie wpływało na poziom oznaczeń sIgE wobec alergenów.

Ze względu na powszechność występowania przeciwciał anty-CCD w populacji, zastosowanie bloкера CCD znacząco zwiększa swoistość metod serologicznych w alergologii [23]. Należy zaznaczyć, że wykorzystanie naturalnych glikoprotein jako blokerów CCD może wiązać się z ryzykiem zablokowania niektórych istotnych alergenowo-swoistych IgE. Inhibitor półsyntetyczny ProGlycAn jest wolny od tego mankamentu, przy jego zastosowaniu nie obserwowano inhibicji istotnych przeciwciał wobec alergenów (przy cutoff 0,35 kU/L) [21].

Używanie bloкера CCD w badaniach serologicznych wiąże się niewątpliwie ze zwiększonym kosztem, jednak należy mieć na uwadze, że zwiększa skuteczność badania diagnostycznego jednocześnie eliminując dodatkowe koszty dalszej diagnostyki u dużej grupy badanych osób. ■

Prace nadesłano

20.10.2017

Zaakceptowano do druku 23.10.2017

Konflikt interesów nie występuje. Treści przedstawione w artykule są zgodne z zasadami Deklaracji Helsińskiej, dyrektywami EU oraz ujednoliconymi wymaganiami dla czasopism biomedycznych.

Piśmiennictwo: 1. Zgorzelska-Kowalik J., Wiszniewska M., Kowalik D. et al.: Cross-reactive carbohydrate determinants in diagnostics of occupational allergy. *Medycyna Pracy*, 2010, 61(1), 79-89. 2. Wiszniewska M., Zgorzelska-Kowalik J., Nowakowska-Swirna E. et al.: Identification of cross-reactive carbohydrate determinants in subjects reporting work-related respiratory symptoms. *Int J Occup Environ Health*, 2015, 28(1), 90-101. 3. Falak R., Sankian M., Ketabdar H. et al.: The role of anti-CCD antibodies in grape allergy diagnosis. *Rep Biochem Mol Biol*, 2013, 1(2), 74-82. 4. Zak I., Balcerzyk A., Polipeptydy i białka. *Chemia medyczna*. 2001, Śląska Akademia Medyczna, Katowice, 244-274. 5. Altmann F.: The role of protein glycosylation in allergy. *Int Arch Allergy Immunol*, 2007, 142(2), 99-115. 6. <http://www.allergome.org/> [dostęp 25.08.2017]. 7. Altmann F.: Coping with cross-reactive carbohydrate determinants in allergy diagnosis. *Allergo J Int*, 2016, 25(4), 98-105. 8. Malandain H.: IgE-reactive carbohydrate epitopes—classification, cross-reactivity, and clinical impact. *Eur Ann Allergy Clin Immunol*, 2005, 37(4), 122-8. 9. 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(4), 286-95. 10. Mari A., Ooievaar-de Heer P., Scala E. et al.: 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. Vidal C., Sanmartin C., Arminen M. et al.: Minor interference of cross-reactive carbohydrates with the diagnosis of respiratory allergy in standard clinical conditions. *Int Arch Allergy Immunol*, 2012, 157(2), 176-85. 12. Mertens M., Amier S., Moerschbacher B.M. et al.: Cross-reactive carbohydrate determinants strongly affect the results of the basophil activation test in hymenoptera-venom allergy. *Clin Exp Allergy*, 2010, 40(9), 1333-45. 13. Amoah A.S., Obeng B.B., Larbi I.A. et al.: Peanut-specific IgE antibodies in asymptomatic Ghanaian children possibly caused by carbohydrate determinant cross-reactivity. *J Allergy Clin Immunol*, 2013, 132(3), 639-47. 14. Mari A., Iacovacci P., Afferni C. et al.: Specific IgE to cross-reactive carbohydrate determinants strongly affect the in vitro diagnosis of allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol*, 1999, 103(6), 1005-11. 15. Brehler R., Grundmann S., Stocker B.: Cross-reacting carbohydrate determinants and hymenoptera venom allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2013, 13(4), 360-4. 16. Jin C., Hantusch B., Hemmer W. et al.: Affinity of IgE and IgG against cross-reactive carbohydrate determinants on plant and insect glycoproteins. *J Allergy Clin Immunol*, 2008, 121(1), 185-190 e2. 17. Majsiaik E.: Faber. Nowa generacja testów molekularnych do diagnozowania alergii IgE-zależnych. *Alergia*, 2017, 1. 18. Mari A., Carabella G., Zennaro D. et al.: CDRS and CDPS pro: the CAAM Digital Reporting System an Exclusive Online free tool for Allergy test Visualization dedicated to Patients and Accessible by Allergists. Plakat, Kongres European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI), 17-21 czerwca 2017, (Helsinki, Finlandia), <http://www.multwebcast.com/eaaci/2017/helsinki/180197/> [dostęp 26.08.2017]. 19. Proglycan. www.proglycan.com [dostęp 26.08.2017]. 20. Yokoi H., Yoshitake H., Matsumoto Y. et al.: Involvement of cross-reactive carbohydrate determinants-specific IgE in pollen allergy testing. *Asia Pac Allergy*, 2017, 7(1), 29-36. 21. Holzweber F., Svehla E., Fellner W. et al.: Inhibition of IgE binding to cross-reactive carbohydrate determinants enhances diagnostic selectivity. *Allergy*, 2013, 68(10), 1269-77.