

Cross-reactive Carbohydrate Determinants (CCD): biochimica, epidemiologia, impatto diagnostico e clinico

Cross-reactive Carbohydrate Determinants (CCD): biochemistry, epidemiology, diagnostical and clinical impact

Paolo Maria Matricardi, Ekaterina Sergueevna Potapova

Department of Pediatric Respiratory Medicine, Immunology and Critical Care Medicine, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Corporate Member of Freie Universität Berlin and Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin, Germany

RIASSUNTO

All'inizio degli anni '80, Rob Aalberse ha osservato in vari pazienti allergici anticorpi IgE che reagivano contro la componente glucidica, invece della componente proteica delle molecole allergeniche. Due importanti proprietà caratterizzavano questi anticorpi: 1) l'incapacità di indurre un'efficiente degranolazione dei mastociti a contatto con l'antigene; 2) la capacità di interagire con diverse glicoproteine allergeniche.

Aalberse ha anche previsto molte ramificazioni derivate dalle sue osservazioni: a) la bassa rilevanza patogenetica di questi anticorpi nel causare reazioni allergiche; b) il rischio che questi anticorpi confondessero i risultati dei test allergologici in vitro, dando luogo a test positivi per diversi estratti allergenici in assenza di un'effettiva patogenicità di quegli stessi estratti; c) la necessità di prevenire falsi positivi trattando i reagenti allergenici per rimuovere i loro componenti glucidici; d) la necessità di privare il siero del paziente di questi anticorpi prima di esaminare il siero stesso per la sua reattività IgE contro gli estratti allergenici.

Inoltre, Rob Aalberse ha coniato la duratura definizione di "Determinanti di carboidrati cross-reattivi" (CCD). Questa revisione è dedicata ai cosiddetti CCD "classici" e mira a: a) riassumere le informazioni di base sulla natura biochimica dei CCD; b) presentare gli aspetti epidemiologici della risposta delle IgE ai CCD; c) descrivere i due principali tipi di interferenza dei CCD nei test allergologici in vitro e il loro superamento; d) ampliare la panoramica delle IgE contro i CCD, in particolare nei parassiti, e le ipotesi sulla loro giustificazione evolutiva.

Infine, cercheremo di evidenziare le domande di ricerca aperte e gli esempi di ricerca in corso per rispondere.

PAROLE CHIAVE: allergia, determinanti carboidratici cross-reattivi (CCD), IgE, test di laboratorio, skin prick test, glicani, pollini, insetti, piante

SUMMARY

In the early 1980s, Rob Aalberse observed, in various allergic patients, IgE antibodies that reacted against the glucose component, instead of the protein component of the allergenic molecules. Two important properties characterized these antibodies: (1) inability to induce an efficient mast cell degranulation when in contact with the antigen; (2) ability to interact with different allergenic glycoproteins.

Review

CORRISPONDENZA

Paolo Maria Matricardi
paolo.matricardi@charite.de

Conflitto di interessi: gli Autori dichiarano nessun conflitto di interessi.

Come citare questo articolo: Matricardi PM, Potapova ES. Cross-reactive Carbohydrate Determinants (CCD): biochimica, epidemiologia, impatto diagnostico e clinico. Rivista di Immunologia e Allergologia Pediatrica 2021;35(04):10-16. <https://doi.org/10.53151/2531-3916/2021-9>

© Copyright by Società Italiana di Allergologia e Immunologia Pediatrica



OPEN ACCESS

L'articolo è OPEN ACCESS e divulgato sulla base della licenza CC-BY-NC-ND (Creative Commons Attribuzione – Non commerciale – Non opere derivate 4.0 Internazionale). L'articolo può essere usato indicando la menzione di paternità adeguata e la licenza; solo a scopi non commerciali; solo in originale. Per ulteriori informazioni: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.it>

Aalberse also predicted many ramifications derived from his observations: (a) Low pathogenetic relevance of these antibodies in causing allergic reactions; (b) The risk of these antibodies confounding the results of in vitro allergy tests, resulting in positive tests for different allergenic extracts in the absence of an actual pathogenecity of those same extracts; (c) The need to prevent false positives by treating allergenic reagents to remove their glucose components; or (d) The need to deprive the patient serum of these antibodies before examining the serum itself for its IgE reactivity against allergenic extracts.

Additionally, Rob Aalberse coined the enduring definition of "Cross-reactive Carbohydrate Determinants" (CCD). This review is dedicated to the so-called "classic" CCDs and aims to (a) summarize basic information on the biochemical nature of CCDs; (b) present the epidemiological aspects of the IgE response to CCDs; (c) describe the two main types of CCD interference in in vitro allergy tests and their overcoming, and (d) broaden the overview of IgE against CCDs, namely in parasites, and the hypotheses about their evolutionary justification.

Lastly, we will try to highlight open research questions and examples of ongoing research to answer them.

KEY WORDS: allergy, cross-reactive carbohydrate determinants (CCD), IgE, laboratory test, skin prick test, glycans, pollen, insects, plants

INTRODUZIONE

All'inizio degli anni '80, Rob Aalberse osservò in diversi pazienti allergici la presenza di anticorpi IgE che reagivano non contro la componente proteica degli estratti allergenici, bensì contro la loro componente glicidica¹. Questi anticorpi non inducono, al contatto con l'antigene, la degranolazione e sono altamente cross-reattivi. Questi glicani, definiti da Aalberse stesso "Cross-reactive Carbohydrate Determinants" (CCD), ovvero "determinanti carboidratici a reazione crociata"¹, hanno una notevole importanza nella diagnostica, provocando quindi false positività nella diagnostica in vitro delle IgE.

1. BIOCHIMICA DEI CCD

1.A. Definizione

Un'ampia categoria di proteine si distingue per il fatto di legare oligosaccaridi (glicani) sulla sua superficie, guadagnandosi quindi il nome di "glicoproteine". In allergologia, il termine CCD è stato coniato per diversi tipi di oligosaccaridi (circa 20 quelli fin qui caratterizzati) che vengono riconosciuti come determinanti antigenici (epitopi B) da anticorpi IgE umani e che, essendo espressi in molte specie vegetali (incluse graminacee, alberi, piante erbacee) o animali (inclusi nematodi, molluschi, artropodi), giustificano anche una cross-reattività tra glicoproteine di specie diverse, altrimenti non correlate tra loro.

1.B. Struttura

Tranne alcune rilevanti eccezioni, i CCD appartengono alla categoria degli "N-glicani" perché si legano in modo covalente alla struttura peptidica della proteina tramite l'azoto di un gruppo ammidico. Gli elementi di base che compongono i CCD includono, necessariamente, mannosio (Man), N-acetilglucosamina (GlcNAc), fucosio (Fuc) e, in alcuni casi, xilosio (Xyl), galattosio (Gal) e acido N-acetilneuraminico (NeuNAc), i quali sono codificati per consenso secondo simboli grafici specifici (Fig. 1)². Tra gli N-glicani, quelli che vengono riconosciuti dalle IgE contengono fucosio, legato in posizione α 1,3 (α 1,3-fucosio) al residuo più interno di GlcNAc³. Alcuni di questi glicani contengono anche un residuo monomero di xilosio, legato a un residuo di mannosio in posizione β (β 1,2-xilosio). Come accennato, esiste un tipo di

N-glicani che, al contrario dei CCD oggi denominati "classici", producono reazioni allergiche a volte anche gravi: si tratta dell' α 1,3-galattosio (α GAL), il cui ruolo in allergologia è ampiamente illustrato in un'altra review di questo volume della RIAP⁴.

Gli N-glicani IgE-reattivi con nucleo α 1,3-fucosio si presentano in diverse forme, tipiche di distinte categorie di specie (piante, insetti, ecc.) (Fig. 1). Le IgE si legano anzitutto al residuo di fucosio, ma perché questo legame avvenga sembra siano molto importanti altre componenti, quali il residuo di Man legato all' α 1,6, la GlcNAc o lo stesso Xyl⁵. Le diverse vie di sintesi e trasformazione endocellulare degli N-glicani generano diverse varianti, molte delle quali condividono gli elementi essenziali per il riconoscimento da parte degli anticorpi IgE (Fig. 2)². Da un lato, i pollini di graminacee, piante erbacee e alberi (ad esempio il loglio, la segale, l'ambrosia, la betulla, l'olivo) e molti alimenti vegetali contengono i glicani MUXF e MMXF; dall'altro lato, il veleno di imenotteri contiene invece CCD di tipo diverso, sempre fucosilati ma privi di xilosio, quali l'MMF3 e l'MMF3F6². Questi risultati dell'analisi strutturale sono in linea con il legame IgE osservato con i test multi-allergenici, dove tutti i pollini e tutti gli allergeni alimentari – e anche

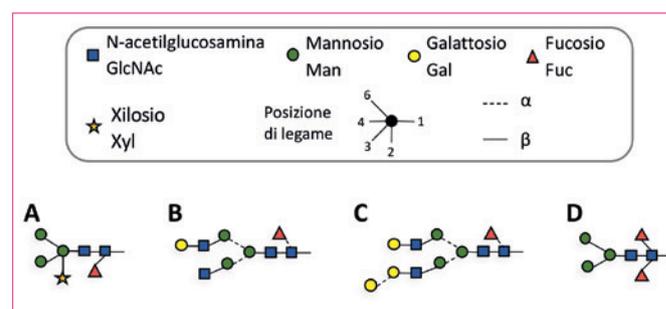


FIGURA 1. N-glicani. A. Struttura CCD comune nelle piante, MMXF3 o MMXF. B. Un N-glicano di mammifero. C. N-glicano con α 1,3-galattosio (α Gal). D. N-glicano di veleno di insetto con 2 monomeri di fucosio². *N-glycan structures. A. Common CCD structure in plants, MMXF3 or MMXF. B. A non-immunogenic mammalian N-glycan. C. N-glycan with α 1,3-galactose (α Gal). D. N-glycan from insect venom presenting 2 types of core-fucose².*

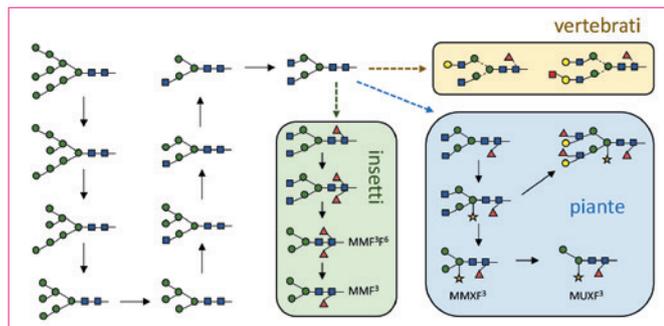


FIGURA 2. La biosintesi degli N-glicani in gruppi distinti di organismi. Gli N-glicani ad alto contenuto di manosio (fila a sinistra) si convertono in N-glicani complessi attraverso una serie di passaggi che iniziano con un attacco di un residuo di GlcNAc. I glicani continuano a trasmutare a seconda degli organismi di cui fanno parte, cioè vertebrati, piante, insetti. Le strutture finali MMXF3, MUXF3, MMF3F6, MMF3 sono CCD². *N-glycans' biosynthesis within distinctive groups of organisms. High-mannose N-glycans (left row) convert to complex N-glycans through a series of steps that start with an attachment of a GlcNAc residue. The glycans continue transmuting depending on the organisms they are part of, i.e. vertebrates, plants, insects. The final structures MMXF3, MUXF3, MMF3F6, MMF3 are CCD².*

gli estratti dello scarafaggio – danno segnali positivi più o meno forti con i sieri dei pazienti CCD-reattivi⁶.

2. EPIDEMIOLOGIA DELLE IGE CONTRO I CCD NELLE MALATTIE ALLERGICHE

2a. IgE contro i CCD nella pollinosi

Lo studio epidemiologico più ampio finora condotto sulle IgE contro i CCD è stato svolto quasi 20 anni or sono proprio in Italia e ha registrato una prevalenza complessiva del 23% tra oltre 1.800 pazienti⁷. La prevalenza degli anticorpi IgE al CCD nel siero risultò minima tra i soggetti non allergici (5%), media tra i pazienti non allergici ai pollini (10%), elevata tra gli allergici ai pollini (31%) ed elevatissima tra i pazienti con sensibilizzazione multipla ai pollini (71%)⁷. Questo e molti altri studi hanno suggerito che le IgE al CCD, nei pazienti allergici, sono principalmente legate alla sensibilizzazione ai pollini e comunque a estratti allergenici di origine vegetale e molto meno ad acari e miceti⁷.

Gli studi epidemiologici hanno largamente confermato le prime osservazioni di Aalberse e van Ree⁸, dimostrando una negatività allo SPT eseguito con estratti allergenici il cui test IgE diveniva negativo dopo inibizione delle IgE contro i CCD⁷. Il fattore di rischio principale associato con la produzione di IgE anti-CCD è l'elevata predisposizione atopica⁷.

I pazienti pollinosici con IgE contro i CCD possono mostrare test IgE in vitro positivi contro una notevole varietà di estratti allergenici⁸. Gli allergeni più frequentemente coinvolti includono altri pollini (graminacee, alberi, erbe), alimenti vegetali (nocciola, arachide, soia, mela, carota, banana, ecc.), lattice (latex), veleno di imenotteri e altri. Queste positività sono in generale di basso livello, cioè inferiori a 3,5 kU/l, ma non mancano pazienti con concentrazioni superiori a 20 kU/l⁷.

2b. IgE contro i CCD nell'allergia al veleno di imenotteri

Come originariamente osservato da Aalberse¹, anche l'allergia al veleno di insetti è frequentemente associata alla sensibilizzazione contro i CCD, persino in pazienti non allergici ai pollini⁹. La maggior parte delle cross-reattività tra gli estratti allergenici di veleno di vespe e api può essere attribuita agli anticorpi IgE al CCD classico¹⁰. Non a caso, la maggior parte degli allergeni del veleno di imenotteri è costituita da glicoproteine che esprimono CCD. L'uso di test in vitro tradizionali, con estratti allergenici, rende quindi piuttosto confusa in molti casi clinici la diagnosi di allergia al veleno di insetti e la conseguente prescrizione di immunoterapia specifica⁹. Infatti, le IgE dirette contro l' α -1,3-fucosio sono responsabili di circa il 75% delle doppie sensibilizzazioni a Honeybee e Yellow Jacket¹⁰. Conseguentemente, ai fini diagnostici, è molto importante discriminare negli allergici al veleno di imenotteri tra: (A) una genuina doppia sensibilizzazione alle proteine specie-specifiche sia di vespa che di ape, (B) una cross-reattività dovuta alla sensibilizzazione delle IgE agli epitopi proteici espressi da omologhe proteine presenti sia nella vespa che nell'ape, e (C) una cross-reattività dovuta solamente alle IgE contro gli epitopi carboidratici (CCD) presenti sia nell'estratto di vespa che di ape⁹. L'utilizzo di molecole allergeniche prive di CCD nei test in vitro (diagnostica risolta a livello delle singole componenti, *component resolved diagnostics*, CRD) è essenziale per definire quale delle tre condizioni si applica al paziente esaminato^{9,12}. Nel loro insieme, nella maggior parte dei casi in cui la diagnostica basata sull'estratto non consente l'identificazione del veleno colpevole a causa della cross-reattività, l'analisi a livello molecolare applicando allergeni del veleno specie-specifici, prodotti con la tecnologia del DNA ricombinante e privi di CCD, consente la caratterizzazione dettagliata dei profili di sensibilizzazione e l'identificazione del veleno che causa i sintomi clinici^{9,12}.

2c. Irrilevanza clinica dell'ampia cross-reattività in vitro delle IgE contro i CCD "classici"

Gli studi sopra citati e molti altri hanno portato alla conclusione che le IgE ai CCD sono comuni tra la popolazione allergica. D'altro canto, il fatto che pazienti con IgE verso CCD possano risultare positivi al test IgE in vitro con un estratto allergenico ma negativi all'SPT in vivo con lo stesso estratto, ha evidenziato una scarsa attività biologica delle loro IgE verso i CCD. A rinforzo di questa conclusione, elevate concentrazioni di lattoferrina umana ricombinante, (poli-)glicosilata con CCD vegetale in quanto espressa in cellule di riso, attivano i basofili

in vitro ma sono ben tollerate per via orale in vivo da pazienti con elevate concentrazioni di IgE contro i CCD¹³.

Il motivo per cui le IgE CCD-specifiche non attivano la degranulazione dei basofili non è stato ancora chiarito. L'ipotesi che ciò sia dovuto a una bassa affinità anticorpale richiede ulteriori studi e non incontra finora consenso unanime⁵. Un'altra ipotesi prevede che i sieri dei pazienti con anticorpi di classe IgE contro i CCD siano anche ricchi, e in misura preponderante, di anticorpi di classe IgG contro gli stessi CCD, e che questi ultimi blocchino il legame delle IgE per competizione¹. L'origine di questi anticorpi potrebbe essere dovuta ad esempio all'ingestione quotidiana di alimenti vegetali ricchi in CCD¹. Potremmo anche considerare che la non infrequente monovalenza della componente CCD sulle molecole allergeniche potrebbe contribuire a precludere la capacità di legare tra loro i recettori per le IgE su basofili o mastociti, impedendone quindi l'attivazione.

I pazienti pollinosici o allergici al veleno di insetti, che abbiano IgE specifiche per CCD, reagiscono con le loro IgE in vitro in modo incrociato agli alimenti vegetali in misura variabile, senza che questo esito diagnostico corrisponda necessariamente a un'allergia alimentare clinicamente manifesta a questi alimenti^{14,15}. Questa irrilevanza clinica comporta difficoltà evidenti per il clinico, che non può, con la normale diagnostica in vitro con estratti allergenici, discriminare quali tra le positività siano dovute anche o solamente a genuina sensibilizzazione verso la parte proteica di molecole allergeniche principali dell'estratto in questione (vera positività) e quali invece siano dovute esclusivamente a reattività crociata delle IgE del paziente contro i CCD contenuti nell'estratto allergenico (falsa positività)^{14,15}. I falsi positivi possono infatti influenzare sia consigli preventivi (ad esempio, eliminazione dell'alimento), sia decisioni terapeutiche (composizione allergenica dell'immunoterapia specifica da prescrivere).

3. INTERFERENZA DEI CCD NEI TEST IgE IN VITRO: LE SOLUZIONI

Come già descritto, la ridotta efficienza nell'attivare la degranulazione di basofili e mastociti giustifica la scarsa o nulla rilevanza clinica di tali anticorpi che, tuttavia, sono altamente cross-reattivi. Questa scarsa rilevanza clinica, a sua volta, genera da un lato l'esigenza di test diagnostici che identificano le IgE specifiche del CCD come possibile spiegazione di polisensibilizzazione in vitro, dall'altro l'esigenza di una dimostrazione che la reattività allergenica sospetta sia effettivamente legata ai CCD stessi¹.

3a. Rilevamento degli anticorpi IgE contro i CCD

Il sospetto di una "falsa" polireattività legata a IgE contro i CCD può essere già sollevato quando, nel testare diversi estratti pollinici, ci troviamo di fronte a una diffusa polisensibilizzazione di bassa intensità. Va segnalato, tuttavia, che anche la sensibilizzazione alle profiline, alle polcalcine, o ad altri allergeni altamente cross-reattivi, può produrre lo stesso scenario diagnostico¹². Nei microarray molecolari la

presenza di IgE contro i CCD nel siero del paziente può essere sospettata quando diverse molecole native, tutte contenenti CCD, risultano blandamente positive. Tra queste molecole quelle tipicamente in questione sono nCyn d 1 (*Cynodon dactylon*), nOle e 1 (Olivio), nPhl p 4 (*Phleum pratense*), nPla a 2 (Platano), nCup a 1 e nCry j 1 (*Cupressaceae*), nJug r 2 (7S globuline)¹⁶.

La conferma o la confutazione del sospetto di presenza delle IgE contro i CCD si può ottenere includendo questi determinanti antigenici nei pannelli di screening delle allergie, associati ad antigeni proteici contro i quali non vengono quasi mai scatenate risposte IgE. Un risultato positivo in un paziente polisensibile segnala quindi che la polisensibilizzazione osservata possa essere causata da IgE contro i CCD. Il reattivo più frequentemente utilizzato in tal senso è la bromelina, una proteasi dell'ananas, che esprime MUXF3, ma i cui epitopi B proteici sono raramente riconosciuti dalle IgE umane⁷. Un'altra molecola utilizzata allo stesso scopo è la perossidasi di rafano (*horseradish peroxidase*, HRP)⁷. Recentemente, una versione ricombinante della mioglobina del miocardio equino è stata convertita in glicoproteina aggiungendo uno o due siti di glicosilazione in regione N-terminale¹⁶. In quest'ultimo studio, è stato rilevato che l'impiego combinato di più determinanti antigenici per lo screening delle IgE contro i CCD coprono uno spettro di specificità più ampio della singola bromelina¹⁶.

3b. Dimostrazione di una falsa positività dovuta a IgE contro i CCD

Abbiamo sopra ricordato come, in pazienti sensibili a diversi pollini o al veleno di più imenotteri, la positività a un IgE test con bromelina o HRP, cioè la dimostrazione della presenza di IgE contro i CCD, non permetta di per sé di considerare falsamente positivo un qualsiasi test di quello stesso paziente. In altri termini, rimane l'esigenza di discriminare, nei pazienti polisensibilizzati e positivi al test delle IgE contro i CCD, tra una cross-reattività dovuta solamente o anche a una sensibilizzazione IgE diretta verso epitopi proteici su allergeni cross-reattivi (vera positività), da una cross-reattività esclusivamente dovuta a IgE contro i CCD presenti negli estratti allergenici, correlati o non correlati tra loro (falsa positività). Per operare questa distinzione, sono state proposte nel tempo diverse strategie:

3b1. Rimozione dei CCD

I glicani legati allo scheletro proteico degli allergeni possono essere rimossi abbastanza facilmente, ad esempio mediante trattamento con periodato. Se un paziente è falsamente positivo al veleno di vespa, perché le sue IgE riconoscono in questo solamente i CCD, allora il test diverrà negativo usando lo stesso estratto di vespa dopo pretrattamento con periodato, che elimina dalla sua superficie i CCD stessi. Questa strategia, tuttavia, è dispendiosa in termini di tempo e non praticabile per l'analisi di laboratorio nella routine clinica.

3b2. Inibizione delle IgE contro i CCD

Un'altra strategia si basa sulla rimozione delle IgE contro i CCD me-

diante l'aggiunta di un inibitore, come già suggerito da Aalberse et al. molto tempo fa. Questa strategia prevede la pre-incubazione, prima del test IgE, del siero del paziente con una soluzione contenente un cosiddetto "inibitore CCD" o "CCD-blocker". Si utilizzano, a riguardo, preparati contenenti peptidi a proteine irrilevanti dal punto di vista allergologico cui siano legati i CCD stessi. L'incubazione permette la neutralizzazione dei soli anticorpi IgE contro i CCD, il cui sito legante l'antigene viene saturato dai CCD dell'inibitore, impedendo specificamente per competizione il legame di quella sola categoria di IgE, ma non di altre, all'estratto allergenico in questione. Questa procedura è semplicissima e già applicata nella routine clinica. Tuttavia, il passaggio di inibizione riduce leggermente la sensibilità del test diagnostico per via dell'indispensabile diluizione del siero che essa comporta. Un inibitore CCD può essere aggiunto in un formato immunoblot (RIDA qLine; r-Biopharm, Darmstadt, Germania), oppure può essere mescolato col siero prima di eseguire un macroarray (ALEX2, MacroArray Diagnostics, Vienna, Austria) (Fig. 3)¹⁷.

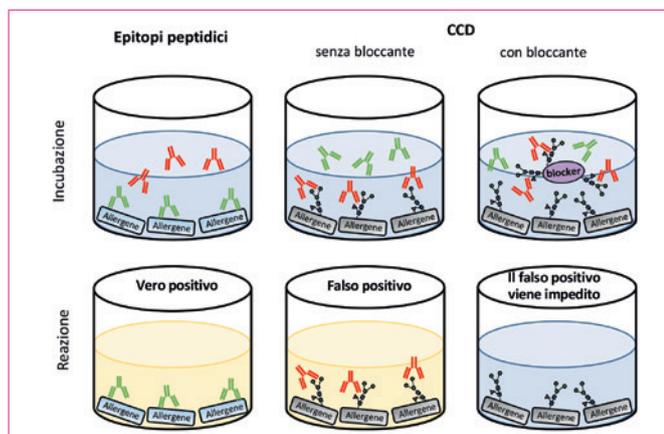


FIGURA 3. Inibizione competitiva tra IgE e CCD. Durante la fase di incubazione di un test IgE il siero, contenente anticorpi, viene incubato con un allergene immobilizzato. Nella colonna di sinistra si verifica una reazione tra l'allergene proteico e le sue IgE specifiche e si ottiene un risultato vero-positivo; nella colonna centrale si verifica una reazione tra i glicani legati all'allergene e le IgE anti-CCD e si ottiene quindi un risultato falsamente positivo; nella colonna di destra si osserva la stessa situazione della colonna centrale, ma la presenza di un inibitore o bloccante provoca un'inibizione competitiva con l'allergene e impedisce la falsa positività, dando come risultato un vero-negativo¹⁷. *Competitive inhibition between IgE and CCD. During the incubation stage of an IgE assay the serum, containing antibodies, is incubated with an immobilized allergen. A positive result is obtained: left column - a reaction between protein allergen and its specific IgE occurs; middle column - a reaction between a glycoprotein and anti-CCD IgE occurs. A negative result is obtained; right column - an inhibitor leads to competitive inhibition with the allergen and results in a negative result¹⁷.*

3b3. Impiego di molecole allergeniche da DNA ricombinante

Nella diagnostica molecolare, il problema della falsa positività determinata dalle IgE contro i CCD non è risolto quando si utilizzino molecole native, purificate cioè dall'estratto naturale. L'interferenza delle IgE contro i CCD nei test in vitro può essere invece evitata impiegando molecole allergeniche prodotte con tecnologia del DNA ricombinante ed espresse in sistemi che non producono i glicani in questione. In questo modo, le molecole allergeniche non sono glicosilate, non contengono i CCD, cosicché l'eventuale esito positivo del test è attribuibile solamente a una sensibilizzazione IgE diretta contro gli epitopi proteici della molecola allergenica¹².

3b4. Impiego di matrici assolutamente prive di CCD

Un problema da citare per completezza ma relativamente infrequente, si presenta in alcuni casi di pazienti con elevate concentrazioni sieriche di IgE contro i CCD (almeno 7 kU/l di IgE contro la bromelina)¹⁸. Il siero di questi pazienti è in grado di riconoscere i pochi CCD presenti sulla matrice di cellulosa del test immunoCAP (ThermoFisher). In questi casi si ottiene una falsa positività anche in caso di impiego di molecole allergeniche da DNA ricombinante, quindi prive di CCD, e persino eseguendo il test con la sola matrice del test, senza che a essa sia legato alcun allergene¹⁸. L'esecuzione dei test in vitro con un'altra piattaforma, che non soffra di questo inconveniente, risolve il problema.

4. I TEST PER LE IgE CONTRO I CCD: QUANDO UTILIZZARLI E COME INTERPRETARLI

4a. L'impiego dei test IgE contro i CCD nell'allergia ai pollini

In base agli studi epidemiologici e all'esperienza dei clinici, la grande maggioranza dei pazienti con pollinosi sono genuinamente sensibili a più pollini. Una parte consistente di questi pazienti è sensibile alle profiline (Phl p 12 e molecole correlate), o alle PR10 (Bet v 1, Cor a 1.0101 e molecole correlate) o alle nsLTPs (Pru p 3, Mal d 4 e molecole correlate) e soffre di sindrome orale allergica (oral allergy syndrome, OAS), una componente della sindrome allergica polline-alimenti (*pollen food allergy syndrome*, PFAS). Le IgE contro queste molecole giustificano un ampio spettro di cross-reattività, che si manifesta quindi clinicamente rilevante. Moltissimi di questi pazienti sensibili a più pollini e alimenti vegetali sono anche positivi per le IgE contro i CCD. Questo comporta che alcune o molte delle positività delle IgE in vitro per estratti allergenici sono invece clinicamente irrilevanti. Il compito dell'allergologo è quindi complesso, in quanto deve riuscire a discriminare quali tra le positività IgE in vitro contro gli estratti allergenici sono rilevanti e quali sono esclusivamente dovute alle IgE contro i CCD, e quindi irrilevanti. Si possono adottare in questi casi i seguenti

criteri pratici, nessuno dei quali permette, da solo, una diagnosi definitiva, ma tutti utili a formarla:

4a1. Storia clinica

Il primo criterio è indubbiamente il criterio clinico. Una corretta anamnesi cercherà di evidenziare a quali allergeni il paziente è stato recentemente esposto e se quell'esposizione è stata accompagnata da sintomi allergici. Un'esposizione remota e tollerata, oppure la mancanza di una storia clinica certa in un senso o nell'altro, a volte non permettono di verificare una tolleranza attuale. Per cui il criterio clinico va spesso integrato con diagnostica specifica.

4a2. Skin tests

L'impiego di *skin prick tests*, anche (per gli alimenti vegetali) con la tecnica del prick+prick, può essere di aiuto, considerando che l'esclusiva positività ai CCD si associa a skin test negativi. In questo caso, va ricordato che la sensibilità degli skin test per allergie da alimenti vegetali è non sempre ottimale.

4a3. Test di scatenamento

I test di scatenamento con la fonte allergenica sono altamente sensibili e specifici nel verificare la rilevanza clinica di una sensibilizzazione, ma richiedono anche molto tempo e vengono in genere eseguiti in ambiente protetto.

4a4. Ricerca delle IgE contro i CCD

L'esecuzione di un test IgE contro la bromelina in singleplex o inserita in un test multiplex (microarray, immunoblot) permette di escludere con alta probabilità, in caso di test negativo, una falsa positività di un test IgE positivo per la fonte allergenica sospettata.

4a5. Test di inibizione

Il trattamento preventivo del siero con un CCD-blocker (previsto ad esempio nei multitest commerciali molecolari della Euroimmun e della MADx) permette di verificare l'eventuale negativizzazione di un test positivo in paziente portatore di IgE contro i CCD, escludendo l'estratto allergenico corrispondente dalla lista.

4a6. Test IgE con molecole allergeniche specie-specifiche

L'esecuzione di test IgE contro le principali molecole dell'estratto allergenico espresse in forma ricombinante (ad esempio rPhl p 1 per le graminacee, rApi m 1 per l'ape domestica) permette di accertare la presenza di una genuina sensibilizzazione a quella fonte allergenica.

4a7. Test IgE con molecole allergeniche cross-reattive

L'esecuzione di test IgE contro le profiline (ad esempio Phl p 12, Bet v 2), le PR10 (ad esempio Bet v 1, Cor a 1.0101, Mal d 1) e le nsLTP (ad esempio Pru p 3, Mal d 3), permette di accertare la presenza di

una sensibilizzazione a panallergeni che potrebbe spiegare parte dei sintomi del paziente.

5. IGE CONTRO I CCD NELLE ELMINTIASI: UN SIGNIFICATO EVOLUZIONISTICO?

5a. IgE ai CCD in zone endemiche per elmintiasi

IgE ai CCD sono state descritte per la prima volta in pazienti allergici di paesi occidentalizzati. Negli ultimi anni sono cresciute le evidenze che gli esseri umani frequentemente esposti ai vermi producano molto frequentemente risposte IgE contro un'ampia varietà di N-glicani, inclusi i CCD^{19,20}. L'impiego di microarrays di glicani ha dimostrato in popolazioni ugandesi la diffusa presenza di IgE a specifiche porzioni di glicani e un'associazione positiva tra reattività agli epitopi CCD classici (core β -1,2-xilosio; α -1,3-fucosio), sensibilizzazione IgE agli estratti allergenici, residenza in ambiente rurale e infezione a *Schistosoma mansoni*^{19,20}. Al contrario, la reattività cutanea agli estratti o la sensibilizzazione ai loro principali componenti allergenici, privi di CCD, non ha presentato alcuna di queste correlazioni. Questo studio ha quindi suggerito che, in questo specifico contesto epidemiologico, l'induttore della risposta delle IgE al CCD era l'infezione da vermi, non l'esposizione agli allergeni^{19,20}.

5b. Esiste una funzione evolutivistica delle IgE contro i CCD?

Considerando che l'elmintiasi è stata una condizione normale durante l'evoluzione umana, sorge la domanda se questa categoria di anticorpi sia solo un epifenomeno nell'allergia, mentre svolge una funzione biologica nell'elmintiasi. Non ci sono infatti prove evidenti che i sintomi indotti dai nematodi siano correlati agli anticorpi IgE specifici per gli oligosaccaridi. La funzione del IgE contro i CCD classici nei paesi ad alta endemia per elmintiasi è quindi sconosciuta e potrebbe essere anche di tipo protettivo, sia contro gli elminti che contro l'anafilassi provocata da altri anticorpi IgE contro gli elminti stessi²⁰. È interessante notare che in pazienti Ugandesi è stata trovata un'associazione inversa tra la presenza di IgE a un sottoinsieme di CCD (quelli con un epitopo alfa-1, 3-fucosio) e l'asma, il che può implicare un ruolo protettivo di IgE a CCD²⁰.

CONCLUSIONI

A distanza di 40 anni esatti dalla sua scoperta, Rob Aalberse ha nuovamente affrontato la materia dei CCD, questa volta con molti altri colleghi, incluso lo scopritore dell'effetto allergico dell'alpha-GAL, Tom Platts-Mills, e ne ha ulteriormente chiarito le importanti implicazioni evolutivistiche, cliniche, diagnostiche²¹. La scoperta delle IgE contro i CCD, tipiche anzitutto dei pazienti con pollinosi o con

allergia al veleno di imenotteri, ha infatti aperto un settore dell'immunologia allergologica solo apparentemente secondario. Questi anticorpi hanno in primo luogo evidenziato l'esistenza di problemi diagnostici per l'allergologo e il medico di laboratorio, per i quali diverse soluzioni sono state offerte. In tempi recenti, i CCD sono stati rilevati in diversi tipi di elminti, suscitando nuovo interesse sia per la risposta anticorpale IgE che essi inducono, sia per la ricerca di un'eventuale funzione evolutivistica di questi determinanti antigenici e degli anticorpi contro di essi prodotti dall'ospite. Un altro, rilevante settore di indagine futura riguarderà l'identificazione delle molecole allergeniche che inducono gli anticorpi IgE contro i CCD nell'Uomo e la caratterizzazione dei processi immunologici che portano alla produzione di questi anticorpi²².

Bibliografia

- 1 Aalberse RC, Koshte V, Clemens JG. Immunoglobulin E antibodies that crossreact with vegetable foods, pollen, and Hymenoptera venom. *J Allergy Clin Immunol* 1981;68:356-64. [https://doi.org/10.1016/0091-6749\(81\)90133-0](https://doi.org/10.1016/0091-6749(81)90133-0)
- 2 Altmann F. The role of protein glycosylation in allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 2007;142:99-115. <https://doi.org/10.1159/000096114>
- 3 Wilson IB, Altmann F. Structural analysis of N-glycans from allergenic grass, ragweed and tree pollens: core alpha1,3-linked fucose and xylose present in all pollens examined. *Glycoconj J* 1998;15:1055-70. <https://doi.org/10.1023/a:1006960401562>
- 4 Commissione Malattie Allergiche Rare della SIAIP, a cura della. Saretta F, Giovannini M, Mori F, et al. La sindrome da alpha-gal nell'adulto e nel bambino. *Rivista di Immunologia e Allergologia Pediatrica* 2021;35:I-XVI. <https://10.53151/2531-3916-3>
- 5 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;121:185-190.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2007.07.047>
- 6 Holzweber F, Svehla E, Fellner W, et al. Inhibition of IgE binding to cross-reactive carbohydrate determinants enhances diagnostic selectivity. *Allergy* 2013;68:1269-77. <https://doi.org/10.1111/all.12229>
- 7 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;129:286-95. <https://doi.org/10.1159/000067591>
- 8 Van Ree R, Aalberse M. Pollen-vegetable food crossreactivity: serological and clinical relevance of crossreactive IgE. *J Clin Immunoassay* 1993;16:124-130.
- 9 Ollert M, Blank S. Anaphylaxis to insect venom allergens: role of molecular diagnostics. *Curr Allergy Asthma Rep* 2015;15:26. <https://doi.org/10.1007/s11882-015-0527-z>
- 10 Hemmer W, Focke M, Kolarich D, et al. Identification by immunoblot of venom glycoproteins displaying immunoglobulin E-binding N-glycans as crossreactive allergens in honeybee and yellow jacket venom. *Clin Exp Allergy* 2004;34:460-9. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2004.01897.x>
- 11 Jappe U, Raulf-Heimsoth M, Hoffmann M, et al. In vitro Hymenoptera venom allergy diagnosis: improved by screening for cross-reactive carbohydrate determinants and reciprocal inhibition. *Allergy* 2006;61:1220-9. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2006.01232.x>
- 12 Matricardi PM, Kleine-Tebbe J, Hoffmann HJ, et al. EAACI Molecular Allergy User's Guide. *Pediatric allergy and immunology* 2016;27(S23):1-250. <https://doi.org/10.1111/pai.12563>
- 13 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;63:891-6. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2008.01703.x>
- 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;103:1005-11. [https://doi.org/10.1016/s0091-6749\(99\)70171-5](https://doi.org/10.1016/s0091-6749(99)70171-5)
- 15 Van Ree R, Aalberse RC. Specific IgE without clinical allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103:1000-1. [https://doi.org/10.1016/s0091-6749\(99\)70169-7](https://doi.org/10.1016/s0091-6749(99)70169-7)
- 16 Gattinger P, Mittermann I, Lupinek C, et al. Recombinant glycoproteins resembling carbohydrate-specific IgE epitopes from plants, venoms and mites. *EBioMedicine* 2019;39:33-43. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.12.002>
- 17 Altmann F. Coping with cross-reactive carbohydrate determinants in allergy diagnosis. *Allergo J Int* 2016;25:98-105. <https://doi.org/10.1007/s40629-016-0115-3>
- 18 Hemmer W, Altmann F, Holzweber F, et al. 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;141:372-381.e3. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.04.028>
- 19 Amoah AS, Asuming-Brempong EK, Obeng BB, et al. Identification of dominant anti-glycan IgE responses in school children by glycan microarray. *J Allergy Clin Immunol* 2018;141:1130-1133. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.09.040>
- 20 Nkurunungi G, van Diepen A, Nassuuna J, et al. Microarray assessment of N-glycan specific IgE and IgG profiles associated with *Schistosoma mansoni* infection in rural and urban Uganda. *Sci Rep* 2019;9:3522. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40009-7>
- 21 Platts-Mills TA, Hilger C, Uta Jappe U, et al. Carbohydrate epitopes currently recognized as targets for IgE antibodies. *Allergy* 2021;76:2383-2394. <https://doi.org/10.1111/all.14802>
- 22 Matricardi PM. IgE to cross-reactive carbohydrate determinants: Origins, functions, and confounding role in nPhl p 4-IgE assays. *J Allergy Clin Immunol* 2020;145:1554-5. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2020.04.012>