

**Solution de CCD blocking**  
**Incubation supplémentaire pour**  
**les systèmes AlleisaScreen®**

Blockage des Cross-reactive Carbohydrate Determinants (CCDs)  
durant l'utilisation des kits AlleisaScreen®

Art. No.: A992

Test *in-vitro*, medical product IVD guideline 98/79/EC

Stockage entre 2 - 8 °C

MEDIWISS Analytic GmbH, Uerdinger Straße 3 D-47441 Moers

## 1. Que sont les CCD?

Ce sont des chaînes d'hydrates de carbone qui, fixées à certaines protéines, confèrent à ces molécules des propriétés particulières telles qu'une meilleure solubilité et une meilleure résistance aux chocs thermiques.

Ces chaînes d'hydrates de carbone ou glycanes sont fixées aux peptides sur des sites spécifiques. On distingue les O-glycanes ou les N-glycanes suivant l'acide aminé auquel la chaîne glucidique se fixe.

Au tout début des années 80, la présence d'IgE dirigées contre ces déterminants carbohydratés a été mise en évidence dans les sérums de patients. La production de tels anticorps de type IgE peut résulter d'une exposition aux pollens ou aux venins d'insectes. La capacité de ces déterminants carbohydratés à produire des IgE à forte réactivité croisée leur a valu le nom de "CCD": "Carbohydrates Cross-reactive Determinants".

Les CCD ont été identifiés dans différents types d'allergènes d'origine végétale ou animale.

L'exposition aux pollens semble être une source importante de production d'IgE croisant avec des hydrates de carbone. Il est pour le moment encore non déterminé si certains pollens sont plus "efficaces" que d'autres dans la production d'IgE contre les CCD. Des déterminants contenant des hydrates de carbone ont été décrits dans les pollens d'arbres et d'herbacées, mais la source principale de production d'IgE anti-CCD semble être les pollens de graminées.

Les réactions croisées entre pollens et aliments d'origine végétale sont souvent observées notamment pour: la tomate, le céleri, la carotte, la courge, la pomme, la cacahuète, les lentilles, le soja, le kiwi, la cerise, la noisette, la mangue, les graines de pavot, le kaki... Les réactions croisées entre les pollens et les aliments d'origine végétale sont essentiellement dues aux CCD.

Le latex contient au moins deux molécules glycosylées (Hev b2 et Hev b13) qui pourraient induire la production d'IgE anti-CCD.

Les hyaluronidases (apidae, vespidae), les phospholipases A1 et A2 (abeille) sont des protéines glycosylées présentes dans les venins d'insectes qui pourraient être à l'origine de la production d'IgE anti CCD après une piqûre d'insecte.

### Les IgE anti-CCD sont-elles cliniquement relevantes?

L'hypothèse selon laquelle les IgE anti-CCD n'ont pas de relevance clinique prédomine; en effet, leur présence peut être associée à des réactions négatives aux tests cutanés (SPT) et à une absence de symptômes cliniques. Le fait que de nombreuses glycoprotéines soient porteuses d'une seule chaîne glycanes donne à penser qu'il leur est impossible de réaliser un pontage entre deux IgE fixées aux récepteurs membranaires de la cellule.

Ceci est déterminé par l'accessibilité stérique de l'épitope et l'affinité de l'anticorps. Les patients qui produisent exclusivement des IgE anti-CCD restent donc asymptomatiques. Cependant, il a été déterminé que les IgE anti-CCD pouvaient être mis en évidence par l'emploi des tests In-Vitro. Jusqu'à une mise en évidence de symptômes cliniques associés à la présence unique d'IgE anti-CCD, ceux-ci doivent donc être considérés comme une cause d'interférence dans la réalisation des tests In Vitro pour la recherche des IgE spécifiques. Les données relatives à la prévalence des IgE anti-CCD sur une cohorte importante de patients présentant des symptômes allergiques sont malheureusement limitées.

### Quelles sont les conséquences de la présence d'IgE anti-CCD dans le diagnostic de l'allergie?

Lorsque l'on cherche par une méthode In Vitro à mettre en évidence chez un patient la présence d'IgE anti-arachide, la présence d'IgE anti-CCD peut avoir les conséquences suivantes:

- Si le patient est réellement sensibilisé à l'arachide, le test In Vitro va détecter de manière indifférente les IgE contre les protéines spécifiques et contre les groupes d'hydrates de carbone de l'allergène arachide. Le résultat positif du test s'accompagne d'une surévaluation des concentrations et donne une indication faussée.

- Si le patient n'est pas sensibilisé à l'arachide mais que le test met en évidence les IgE anti-CCD, le résultat positif du test peut être interprété comme un "faux positif".

Plusieurs travaux de recherche encore en cours démontrent que l'interférence induite par la présence d'IgE anti-CCD varie de façon significative en fonction du type de test In Vitro pour la recherche des IgE spécifiques employé.

### Quand rechercher une interférence avec les CCD?

1. Quand les résultats des dosages d'IgE spécifiques ne concordent pas avec l'histoire clinique (symptômes, tests cutanés) pour un patient.

2. Quand un patient est positif vis-à-vis d'un grand nombre d'allergènes.

3. Lorsque différentes méthodes de diagnostic In Vitro donnent des résultats discordants pour un allergène donné.

4. Principalement pour 3 groupes d'allergènes:

- Aliments d'origine végétale : légumes, fruits, graines (arachide).

- Latex: sans risque d'exposition professionnel.

- Venins d'insectes: si des tests In Vitro positifs sont observés à la fois pour les venins de guêpe et d'abeille.

Les patients polliniques, plus particulièrement en cas de polysensibilisations, ont un risque majeur d'avoir des IgE anti-CCD interférant dans le dosage des IgE spécifiques.

### Pourquoi est-il important de mettre en évidence une interférence des CCD?

Les médecins traitants doivent impérativement être mis au courant des possibles impacts de la présence d'IgE anti-CCD sur les tests In Vitro. Malgré que le diagnostic de l'allergie ne puisse en aucun cas se baser uniquement sur un résultat de test In Vitro, la présence d'IgE anti-CCD peut induire des erreurs dans le diagnostic des allergies aux plantes, latex et venins d'insectes. Ce type de résultat erroné peut amener à prescrire des régimes d'éviction (diètes) ou des immunothérapies inutiles.

## 2. Réactifs fournis

La solution CCD (0,5 ml/ 5 ml fournis) contient de la Broméline (enzymes protéases), Péroxydase de Raifort et Ascorbate Oxydase – ce sont des glycoprotéines avec un nombre différent des chaînes carbohydratees. La concentration totale des trois CCD est de 1,25 mg/ml diluées dans le tampon TBS.

Le tampon TBS (pH ~ 7,5) contient de la base TRIZMA (0,02 mol), NaCl (0,14 mol) et de l'azide de sodium conservateur (0.0995 %).

### 2.2 Matériel nécessaire mais non fourni

Les tubes de réaction appropriés pour le mélange du sérum avec la solution CCD-Blocking; un agitateur de type Vortex; les pipettes de prélèvement (10-100 µl et 100-1000 µl), des gants.

## 3. Précautions

Les échantillons doivent être considérés comme potentiellement contaminants et les mesures de sécurité conséquentes doivent être respectées. La solution CCD contient de l'azide de sodium à 0.0995 %. Tout contact avec la peau et les muqueuses est donc à éviter. Après utilisation, le manipulateur est responsable de désinfection appropriée de tous les composants. Tous les réactifs et dispositifs qui entrent en contact avec des échantillons potentiellement infectieux doivent être traités avec des désinfectants appropriés ou autoclavés à 121°C durant au moins une heure.

## 4. Stockage et Stabilité

Stocker la solution de CCD à 2 - 8°C.

Ne pas utiliser au-delà de la date de péremption.

Utiliser le mélange solution CCD+Sérum le même jour de la préparation.

## 5. Procédure

### 5.1 La préincubation avec la solution CCD:

Agiter délicatement le sérum et la solution CCD avant l'utilisation. Diluer la solution CCD dans le sérum à 1/10 et les mélanger soigneusement - Exemple: 270 µl du sérum (90%) + 30 µl de solution CCD (10%) pour AlleisaScreen.

**Incuber à température ambiante durant 30 minutes, en agitant périodiquement la préparation.**

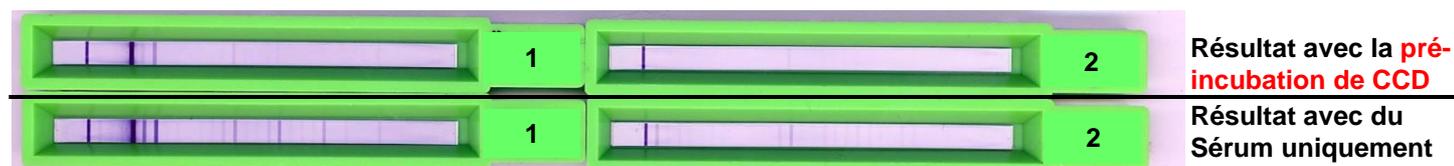
### 5.2 Procédure de test AllergyScreen® :

Avant toute manipulation, consulter la fiche d'utilisation du test AlleisaScreen® pour les informations générales et la procédure exact du test.

Noter le changement important de la première incubation du test AlleisaScreen®:

Le nombre nécessaire de membranes doit être retiré de l'emballage. Rincer brièvement la membrane avec la solution tampon de lavage. Après, remplir avec **300 µl du mélange CCD+Sérum pour AlleisaScreen®**. Utiliser un nouvel embout pour chaque mélange! Incuber les membranes sur l'agitateur à température ambiante (20 – 22°C) durant 45 minutes. Continuer l'analyse suivant l'instruction d'utilisation incluse dans le coffret AlleisaScreen®.

## 6. Exemple de AlleisaScreen® avec la solution CCD



**Fig.1:** Comparaison entre deux sérums de patients en préincubant avec la solution CCD et sans préincubation. Le panel alimentaire AlleisaScreen® a été testé avec deux sérums de patients contenant des IgE anti-CCD. Les sérums des panels en haut ont été préincubés avec la solution CCD durant 30 minutes, alors que les sérums des panels en bas ont été traités au pur (sans incubation). Les membranes du haut ont moins d'allergènes détectés par rapports aux membranes du bas. Les traits fortement positifs non affectés par les CCD apparaissent sur toutes les membranes. Ces lignes indiquent les vraies sensibilisations des patients vis à vis des allergènes. Ainsi, on s'est affranchi des réactions faussement positives.

## 7. Analyse et documentation

Consulter les instructions d'utilisation du test AlleisaScreen®.

## 8. Limitations

Il n'existe pas une garantie de blocage à 100 % des IgE anti-CCD dans l'échantillon.

## 9. Remarques sur la signification clinique du test d'inhibition dans le dosage des IgE spécifiques

La réduction des lignes positives après l'inhibition du sérum avec des allergènes-CCD indique que la réponse positive est due à la présence de glycoprotéines dans des allergènes, surtout alimentaires. Donc la réaction clinique est improbable mais n'est pas impossible.

Le diagnostic des allergies ne peut être établi sur des résultats d'analyses du laboratoire uniquement. Il n'est pas possible d'avoir un profil complet tant que l'anamnèse (histoire clinique) n'est pas combinée au profil clinique (les résultats de différents tests in-vivo et in-vitro). Les classes déterminées en utilisant ce système permettent de confirmer le degré de sensibilisation du patient vis-à-vis de chaque allergène distinct. La détermination de la présence des anticorps spécifiques présente une extension très importante et pratique à des méthodes in-vivo telles que les tests cutanés. Très souvent, l'exploration in-vitro et le seul moyen possible d'identification de sensibilité spécifique aux allergènes de Type 1.

AllergyScreen® est conçu, pour que la coloration positive signifiante du trait spécifique à l'allergène, résulte d'une réaction immunologique spécifique des IgE dans le sérum du patient. Cependant, un trait positif signifie que le patient est sensibilisé contre l'allergène et non forcément allergique. On ne parle d'allergie que si cette sensibilisation se traduit par des symptômes cliniques, et un lien de cause à effet est établi entre les symptômes et l'allergène positif.

## Références

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

Altmann, F. (2007): The Role of Protein Glycosylation in Allergy. Int Arch Allergy Immunol 2007;142:99-115

Malandain H: IgE-reactive carbohydrate epitopes - classification, cross reactivity, and clinical impact. Allergy Immunol (Paris) 2005;37:122-128

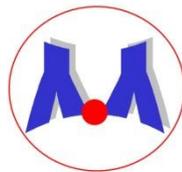
Kersten, W. (2002) : Vergleich des AllergyScreen (MEDIWISS Analytic, Moers) mit dem Hauttest (HAL, Düsseldorf -in-vivo) und dem CAP-System (Pharmacia, Freiburg -in-vitro). – Allergologie 25/4:203-208

Renz, H. (2005): Diagnostic and analytical performance of a screening panel for allergy. Clin Chem Lab Med 2005, 43(9):963-966

van Ree R (2004): Clinical importance of cross-reactivity in food allergy. Curr Opin Allergy Clin Immunol 2004;4:235-240



Made in Germany



**MEDIWISS Analytic GmbH**  
Gesellschaft für angewandte in-vitro Analytik mbH  
Uerdinger Straße 3  
D-47441 Moers  
Tel.: +49 (0) 2841/88 90 470  
Fax.: +49 (0) 2841/88 90 472  
Pwahl@mediwiss-analytic.de