



DOBRA LABORATORIJSKA PRAKSA KOD MOGUĆIH INTERFERENCIJA REZULTATA NA SPECIFIČNE IGE ZA POJEDINE ALERGENE

Nermin Kotorić

SAŽETAK

Dijagnoza alergije određivanjem alergen-specifičnog IgE komplicirana je klinički irelevantnim IgE antitijelima, od kojih je najistaknutiji primjer IgE protiv unakrsno reaktivnih ugljikohidratnih determinanti (CCD), koje se javljaju na alergenima iz biljaka i insekata. Iako nemaju nikakav klinički značaj, u dijagnostici alergija in vitro, pojava ovih antitijela otežava interpretaciju pozitivnih rezultata. Inhibicija CCD-ova predložena je kao lijek. U ovom smo radu prikazali naša iskustva u rješavanju problema koje u in vitro dijagnostici alergija donose CCD, kao i namjeru da sumnjive rezultate potvrdimo ili isključimo kao lažno pozitivne. Od 2012. godine služba za laboratorijsku dijagnostiku u Općoj bolnici Tešanj radi in vitro testiranje alergija. Kroz rad smo se neizbježno susretali sa „sumnjivim“ pozitivnim rezultatima, sumnjajući na unakrsnu reakciju ugljikohidrata i poduzimajući mjere za njihovo rješenje. Od 2021. godine CCD blokatore uvodimo u rutinsku obradu sumnjivih rezultata. U istoj godini smo kod 388 uzorka ispitali preosjetljivost na inhalatorne i alergene hrane a kod 43 pacijenta smo izrazili sumnju na reaktivnost CCD. Izdvojeni uzorci su podvrgnuti CCD testu inhibicije i ponovo testirani a rezultati upoređeni sa prethodnim. Ovaj rad je rezultat našeg iskustva sa „šarenim“ rezultatima za specifične IgE i njihovo tretiranje sa CCD blokatorima. Utvrđena je statistički značajna razlika u vrijednostima alergena hrane po klasama prije i nakon dodavanja blokatora. Međutim kod inhalatornih alergena i alergena gljivica i epitela životinja nije pronađena statistički značajna razlika u vrijednostima klasa prije i nakon dodavanja blokatora. Eliminacija CCD-specifičnih IgE antitijela pomoću sintetičkog CCD blokatora drastično je smanjila broj lažno pozitivnih rezultati in vitro testova bez ugrožavanja osjetljivosti na relevantne IgE interakcije. Stoga, CCD-blokator predstavlja vrijedan alat za povećanje specifičnosti testa rutinske in vitro dijagnoze alergije.

UVOD

Očigledna svrha svake dijagnostičke mjere je dobiti tačan dojam o pacijentovom stanju. U slučaju dijagnoze alergije, to podrazumijeva identifikaciju pravog krivca, alergena, uz izbjegavanje optuživanja bezopasnih alergena. Među različitim „imitatorima alergije“, ugljikohidrati povezani s proteinima istaknuti su i dobro definirani uzrok lažno pozitivnih reakcija. Unakrsno reaktivne determinante ugljikohidrata (CCD) su strukture šećera koje su vezane za proteine tokom posttranslacijske glikozilacije. CCD strukture glikoziliranih proteina iz biljaka i insekata razlikuju se od ljudskih glikoproteina i stoga su imunogene. Pri prvom kontaktu s glikoziliranim alergenom stvaraju se specifična IgE antitijela na protein kao i na CCD strukture. Obično nemaju nikakav klinički značaj. U dijagnostici alergija in vitro, pojava ovih antitijela otežava interpretaciju pozitivnih rezultata, jer nije

Autor za korespondenciju:
Nermin Kotorić dipl. ing. MLD,
Opća bolnica Tešanj,
Služba za laboratorijsku dijagnostiku
Email: kotoric.nermin@hotmail.com
Tel. 00387 061 692 852



moguće razlikovati reakcije uzrokovane antitijelima protiv peptidnih epitopa i anti-CCD IgE antitijela.

ALERGIJA DANAS

Posljednjih pola stoljeća, u cijelom svijetu prati se porast alergijskih bolesti. Razloge takvog epidemiološkog trenda medicinska znanost ne može objasniti, iako se spominju mnogi faktori koji mogu imati utjecaja. Jednim dijelom su za nastalo stanje odgovorne promjene u okolišu kao i promjene higijenskih navika, koje su rezultirale smanjenom izloženošću imunostimulacijskim bakterijama. Smanjen kontakt s domaćim životinjama i obitelji su manje, što se u istraživanjima pokazalo rizičnim faktorima za razvoj alergija. Smatra se da je to dio odgovora zašto u najranijoj dobi djeteta dolazi do usporenog razvoja ravnoteže između T_H1 i T_H2 odgovora limfocita, te se u atopijske djece pojačano luči citokinski profil T_H2 limfocita koji favorizira alergijski odgovor organizma. Takođe smanjena je i izloženost parazitima, zagađenost okoliša, sa zrakom zasićenim tvarima izgaranja dizelskih goriva, uz promjenu vanjskog mijenja se i unutrašnji okoliš u kojima ljude provode sve više vremena. Povećava se izloženost prašinskim grinjama, žoharima, plijesni, dimu cigareta, vlazi, a smanjeno ili ukinuto prirodno prozračivanje prostorija, umjesto kojeg se koristi umjetna ventilacija. Drugi dio uzroka porasta promjena leži u novim, promijenjenim navikama prehrane novorođenčeta, sa sve manjim brojem dojene djece a kao zamjena preporučuju se hidrolizirane formule hrane za djecu. I odrasli ljudi pojačano su izloženi posve novim alergenima u hrani na koje nisu tradicionalno navikli, a što je donijela globalizacija. Ove promjene u prehrani, uz smanjeno unošenje svježih namirnica, sve manje sirove hrane bogate antioksidansima, mogu dovesti i do promjena crijevne mikroflore, što možda pridonosi alergijskoj preosjetljivosti. U kontekstu povećanja broja osoba s alergijama značajan doprinos daje brzo i stresno življenje. Stres je složeni imunobiološki proces u kojem se oslobađaju brojne supstancije u mozgu, a koje mogu imati utjecaj na promjenu imunološku reakciju organizma.[1]

IMUNOLOŠKA PREOSJETLJIVOST

Osnovna zadaća imunološkog sistema je da brani domaćina od infekcija, međutim imunski odgovor sam

po sebi može da izazove oštećenja tkiva kao i bolest. Takve reakcije nazivamo reakcije preosjetljivosti.

Rana preosjetljivost je reakcija na određene antigene posredovana IgE antitijelima i mastocitima, koja izaziva brz izlazak tečnosti iz krvnih sudova, sekreciju mukoze i često praćena zapaljenjem, što sve zajedno nazivamo alergija ili atopija. Ove reakcije mogu da zahvate različita tkiva i mogu da variraju u intenzitetu kod različitih osoba. Najčešći tipovi ovakvih reakcija su: polenskagroznicu, bronhijalna astma, alergija na hranu, lijekove i anafilaksija. Alergije predstavljaju najčešće imunološke poremećaje u razvijenim zemljama (oko 20 % ljudi oboljeva) sa tendencijom stalnog porasta, najčešće oboljevaju djeca. [2]

Putevi stvaranja IgE antitijela

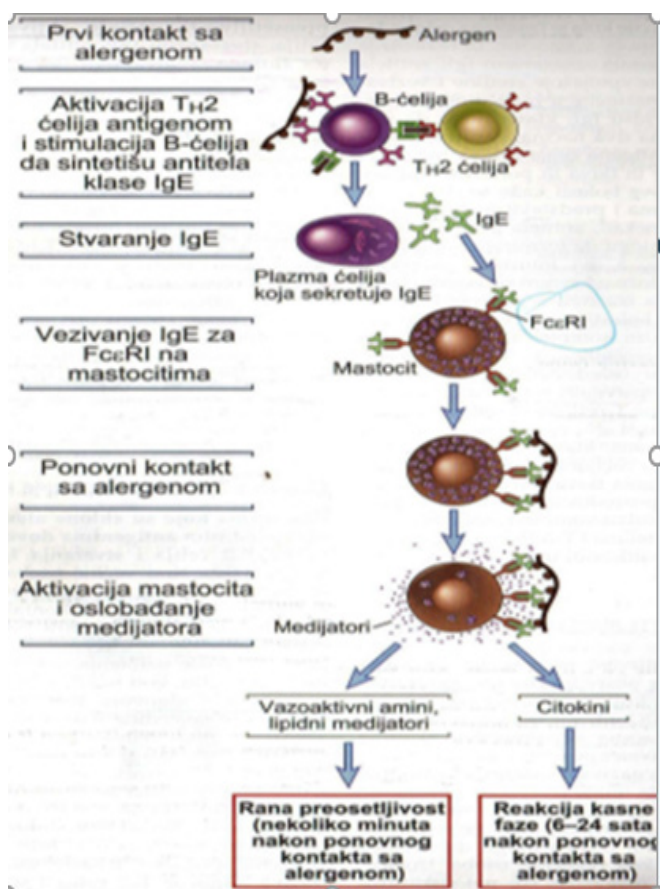
Kod osoba koje su sklone alergiji izlaganje pojedinim antigenima dovodi do aktivacije T_H2 ćelija i stvaranja IgE antitijela. Citokini koje sekretuju T_H2 ćelije, interleukin - 4 i interleukin -13, stimulišu B- limfocite specifične za strane antigene da diferenciraju u plazma ćelije koje proizvode antitijela IgE klase. Kod većine osoba ne razvija se snažan T_H2 odgovor na strane antigene. Iz nepoznatih razloga u kontaktu sa antigenima kao što su proteini polena, određena hrana, otrov insekata, ili životinjska perut, ili poslije uzimanja lijekova, kod nekih osoba dolazi do snažnog T_H2 odgovora. Rana preosjetljivost nastaje kao posljedica aktivacije T_H2 u odgovoru na proteinske antigene ili hemijske supstance koje se vezuju za proteine. Nije jasno zbog čega mali broj uobičajnih antigena spoljašnje sredine kod atopičara izaziva odgovor T_H2 ćelija i stvaranje IgE antitijela i koje karakteristike antigena uslovljavaju da se ponaša kao alergen. [2]

Aktivacija i sekrecija mastocita

IgE antitijela stvorena na alergen vezuju se za $Fc\epsilon R1$ receptor visokog afiniteta specifične za eta-teške lance, koji su eksprimirani na mastocitima. Mastociti se nalaze u svim vezivnim tkivima u organizmu, naročito ispod epitela i obično se nalaze u blizini krvnih sudova. Koji će mastociti biti aktivirani un-



akrsnim povezivanjem IgE antitijela specifičnih za alergen često zavisi od puta ulaska alergena u organizam. Kada se ovako senzibilizirani mastociti izlože ponovnom kontaktu istog antigena, ove ćelije se aktiviraju i luče svoje medijatore. Do aktivacije mastocita dolazi usljed vezivanja alergena za dva ili više molekula IgE antitijela na toj ćeliji, kada se to dogodi dolazi do unakrsnog povezivanja FcεRI molekula koji nose IgE i sprovođenja biohemijskih signalnih lanaca FcεRI. Ti signali dovode do odgovora u mastocitima i brzog oslobađanja sadržaja granula (degranulacija), sinteze i sekrecije lipidnih medijatora i sinteze i sekrecije citokina. (slika 1.) Najvažniji medijatori mastocita su vazoaaktivni amini i proteaze koji se skaldiste i oslobađaju iz granula, novo stvoreni i sekretovani produkti metabolizma arahidonske kiseline i citokini. Najznacajni amini je histamin. [2]



Slika 1. Redosljed događaja u ranoj preosjetljivosti, stvaranje IgE antirijela, 2. -Osnovna imunologija, Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Sciv Pillal, četvrto izdanje, str.210

IN VITRO DIJAGNOSTIKA ALERGIJE

Postupak in vitro dijagnostike u alergijskim bolestima kreće otkrićem imunoglobulina E (IgE) (Ishizaka i Johansson, 1968), i omogućava razvoj alergološko laboratorijske dijagnostike. Danas određivanje koncentracije ukupnih i alergen-specifičnih IgE antitijela čini osnovu in vitro laboratorijske alergološke dijagnostike. Imunološki testovi, općenito, otkrivaju reakciju antigen-antitijelo (Ag-At). S obzirom da je reakcija antigen-antitijelo visoko specifična, pogodna je za dijagnostiku, jer će IgE antitijelo reagirati samo s alergenom koji je izazvao njegovu sintezu. Pokazatelji da se u laboratorijskom mediju zbilja reakcija Ag-At mogu biti različiti biljezi koji se vežu za antitijelo. Ako je biljeg enzim, pokreće se reakcija sa supstratom, ako je biljeg izotop, može se detektirati radioaktivnost, dok se kod fluorogenih molekula otkriva fluorescencija. Različiti imunološki testovi dobili su ime prema biljegu za dokaz reakcije.[3]

Određivanje ukupnog IgE

Prvi korak u identifikaciji atopične osobe kao takve, nakon anamneze, može se provesti određivanjem ukupnog IgE, iako je njegova stvarna vrijednost kontroverzna jer normalne vrijednosti ukupnog IgE ne isključuju postojanje atopijske bolesti, a visoke vrijednosti ukupnog IgE nisu same po sebi uvjet za dijagnozu atopije. Većina atopičnih osoba ima visoke vrijednosti IgE, ali normalan rezultat mora se pažljivo tumačiti: moraju se uzeti u obzir varijacije vezane uz dob i godišnje doba. Općenito, atopijski bolesnici s vrijednostima IgE većim od 1000 UI/ml, uvijek imaju pozitivan specifični IgE protiv nekog alergena.[4]

Određivanje specifičnog ige

Antigen-specifični IgE je sljedeći korak u in-vitro identifikaciji odgovornog alergena. Danas postoji veliki broj (preko 400) karakteriziranih alergena dostupnih za in - vitro dijagnostičke testove i nekoliko korisnih metodologija za određivanje specifičnog IgE. Rezultati specifičnih IgE dobiveni različitim metodama značajno variraju, s apsolutnim slaganjem u 55-65% slučajeva, razlikama u jednoj klasi IgE u 20-30% slučajeva i razlikama u više od dvije klase



u 5-10%. Specifičnost anti-IgE protutijela korištenog u testu je od kritične važnosti jer svako kontaminirajuće protutijelo može dati nespecifične rezultate. S druge strane postoji kompromis između specifičnosti i osjetljivosti, tako da povećanje osjetljivosti tehnike dovodi do smanjenja njezine specifičnosti. Ne može se reći da postoji jedna metoda koja je bolja od ostalih. Dakle, specifično određivanje IgE varira ovisno o vrsti alergena. Tako da za inhalacijske alergene specifičnost i osjetljivost metoda su znatno veće u odnosu na testove alergena u hrani. Postoji dobra korelacija između kliničke anamneze i specifičnog IgE protiv inhalacijskih alergena, a niža korelacija u slučaju alergena hrane. Uspoređujući dijagnostičku pouzdanost specifičnog IgE u odnosu na druge alergološke dijagnostičke metode, nalazimo značajnu i pozitivnu korelaciju ove tehnike s kožnim testovima (ali nikad više od 90-95%) i testom oslobađanja histamina.[4]

IMUNO BLOT POLYCHECK TESTOVI

U ovom radu koristili smo imunoblot Polycheck® testove tvrtke Biocheck GmbH Njemačka. To je platformska tehnologija koja omogućava kvantitativno multiparametarsko testiranje različitih parametara (jedan test 20 – 30 alergena) u jednom testnom pristupku. Softver Biocheck Imaging jednostavan za korištenje precizno ocjenjuje testove. Dokumentacija o rezultatima ispisuje i pohranjuje u središnji LIS, uključujući sliku sirovih podataka.

Polycheck platforma

Danas je odabir alergijskih reakcija središnje pitanje za ljudsku dijagnostiku jer se broj alergija i njezini klinički problemi ubrzano povećavaju tokom posljednjih godina. Biocheck pruža rutinskim laboratorijima brzo i isplativo rješenje za serološku dijagnostiku alergija in vitro. Budući da nije potrebna skupa analitička oprema, test se može postaviti i u malim laboratorijima i izravno u liječničkoj ordinaciji. Po izboru su različiti paneli za alergene: hrana, inhalacija, pedijatrijska, atopijska kao i više kombinacija različitih vrsta alergena – svaki predstavlja 20 zasebnih alergena, jednostavno rukovanje, i samo 200 µl seruma za testiranje na 20 alergena. (slika 2 i 3.), [5]



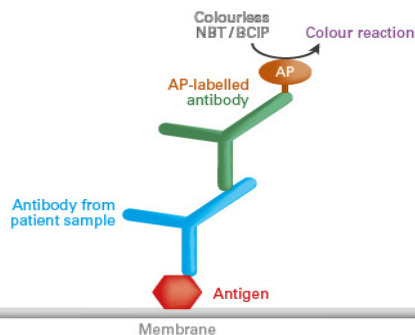
Slika 2. prikaz imunoblot testa priprema za rad (preuzeto sa www.polycheck.de)



Slika 3. Prikaz imunoblot testa, završeno testiranje (preuzeto sa www.polycheck.de)

Princip rada imunoblot testa

Polycheck® Screening Assay je enzimski imunotest za kvantitativno mjerenje alergija specifični IgE u serumu. Relevantni alergeni su odvojeno obloženi u linijama kao i kalibratori na nosaču koji je fiksiran u bušotini kasete. Tokom inkubacije pacijentovog seruma, alergen specifični IgE veže se na odgovarajuće alergene. Nevezane komponente seruma se uklanjaju pranjem. Anti-IgE-antitijela obilježena monoklonskim ligandom vežu se na IgE vezan za alergen. Nevezana antitijela uklanjaju se ispiranjem. Obilježeni enzimima anti-ligandi se vežu na imunološke komplekse; višak konjugata enzima uklanja se pranjem te otopina supstrata se dodaje i specifično veže enzimi pretvaraju bezbojni supstrat u tamni talog. (slika 4). Intenzitet boje linija proporcionalan je odgovarajućoj koncentraciji IgE specifičnog za alergen u pacijento-



Slika 4. Prikaz vezanja komponenti u imunoblot testu (preuzeto sa <https://www.euroimmunblog.com>)

Uz pomoć Biocheck Imaging Software (BIS) i računala, Polycheck® kasete se interpretiraju. Svaki pojedinačni alergen bit će identificiran i, prema

kalibratorskoj krivulji prisutnoj u svakoj kaseti, koncentracija svakog alergena-specifičnog IgE se kvantificira.[5]

Tumačenje rezultata

Uz korištenje skenera Softver za evaluaciju Biocheck Imaging Software (BIS) analizira i dokumentira rezultate svih pacijenata. Program evaluacije provjerava valjanost kalibracijsku krivulju, dodjeljuje odgovarajući alergen svakoj poziciji skenirane trake i izračunava koncentraciju IgE specifičnu za alergen kalibracijsku krivulju, dodjeljuje odgovarajući alergen svakoj poziciji skenirane trake i izračunava koncentraciju IgE specifičnu za alergen. Rezultati su kvantitativno prijavljeni u International Jedinice (kU IgE/l). (slika 5).[5]

Slika 5. Tabela klasifikacije referentnih rezultata po klasama (preuzeto sa <https://www.polycheck.de>)

Klasa	Koncentr. IgE [kU/l]	Interpretacija	Klasa	Koncentr. IgE [kU/l]	Interpretacija
0	<0.35	Nema detekcije specifičnog IgE.	4	17.5 - <50	Visok titar specifičnog IgE.
1	0.35 - <0.7	Veoma slab titar specifičnog IgE.	5	50 - <100	Veoma visok titar specifičnog IgE.
2	0.7 - <3.5	Slaba titar specifičnog IgE.	6	>= 100	Ekstremno visok titar specifičnog IgE.
3	3.5 - <17.5	Jasan titar specifičnog IgE.			

SMETNJE U IMUNOTESTIRANJU - INTERFERENCIJA

Postupci imunotestiranja imaju široku primjenu u kliničkoj medicini i kao takvi se koriste u kliničkim biokemijskim laboratorijima kako za hitna tako i za rutinska ispitivanja. Kliničarima i laboratorijskom osoblju često se prezentiraju rezultati imunotestiranja koji nisu u skladu s kliničkim nalazima. Bez visokog stepena sumnje na smetnje se uglavnom neće detektovati. Često takvi rezultati mogu biti posljedica niza interferencija u imunološkim testovima a između ostalih mogu uključivati i unakrsno reagirajuće tvari. Uglavnom otkrivanje i daljnje postupke kod interferencije rezultata ovisi o praksi laboratorije, njene saradnje sa distributerom reagenasa koje daju praktič-

na rješenja za ispitivanje sumnjivih rezultata kao i dobre saradnje sa kliničarima. Tvari koje mijenjaju mjerljivu koncentraciju analita, odnosno utiču na proces vezanje antigena i antitijela mogu potencijalno dovesti do smetnji u imunološkom testu rezultirajući lažno povišenim ili lažno niskim koncentracijama analita. Prevalencija smetnji općenito je niska u testovima koji sadrže blokatore koji neutraliziraju ili inhibiraju smetnje, ali je često veća u novim, neprovjerenim imunotestovima.[6]

Interferencija u imunotestiranju može dovesti do pogrešne interpretacije pacijentovih rezultata od strane laboratorija i pogrešnog toka liječenja od strane ljekara. Laboratoriji bi trebali uspostaviti procese za otkrivanje, testiranje i prijavu sumnjivih smetnji. Jednako je važno da ljekari prenesu laboratoriju svaku kliničku sumnju na nesklad između kliničkih i lab-



oratorijskih podataka. Neophodno je da laboratorij obavijesti ljekare o postupku praćenja i izvještaje o prisutnosti bilo kakvih smetnji. Uspostavljanje stalnog kontakta laboratorij-lijječnik ključno je za kontinuiranu svijest o mogućim pogrešnim rezultatima analiza zbog smetnji u procesu testiranja.[6]

UNAKRSNO REAKTIVNE DETERMINANTE UGLJIKOHIDRATA (CCD)

Unakrsno reaktivne determinante ugljikohidrata ili CCD-ovi su prisutni u glikoziliranim proteinima, a proces glikozilacije događa se u endoplazmatskom retikulumu i u Golgijevom kompleksu dodatkom ugljikohidrata na specifične aminokiselinske ostatke proteina. U proteinima biljaka i insekata dolazi do N-glikozilacije u kojoj se oligosaharidi (glikani) vežu na atom dušika koji je prisutan u aminokiselinskim ostacima asparagina (Asn). U biljkama i insektima, dodani N-glikani su veoma slični; na primjer, α 1,3-fukoza, rjeđe, α 1,6-fukoza (glavna struktura poznata kao MMF³F⁶), koji su epitopi visoko imunogeni i sposobni inducirati proizvodnju IgE antitijela.[7] Iako se CCD smatra imunogenom molekulom, klinički je irelevantan, jer nema izvještaja o alergijskim reakcijama uzrokovanim kao rezultat imunološkog odgovora potaknutog na ove epitope.[8]. Ovaj nedostatak alergijskih reakcija može se pripisati činjenici da je CCD monovalentna struktura, koja ne dopušta poprečnu vezu između CCD i anti-CCD IgE povezanog sa FcεRI receptorima na mastocitu, čime ne uzrokuje degranulaciju mastocita i oslobađanje upalnih medijatora kao što su vazoaktivni amini i citokini. Međutim, anti-CCD IgE je relevantan kod in vitro dijagnostike alergije, budući da više od 20% pacijenata s alergijom razvija ova antitijela, što bi moglo biti povezano s generiranjem lažno pozitivnih rezultata na RAST testovima.[9] CCD-ovi su molekularne strukture koje se također nalaze u bromelainu (Brl), enzimu dobivenom iz sirovog i vodenog ekstrakta ananasa (*Ananas comosus*), koji ima dva N-glikana, β 1,2-ksilozu i α 1,3-fukoze, sa strukturom zvanom MUXF³. Zbog sličnosti između ove strukture i CCD epitopa prisutnih u alergenima biljaka i insekata, Brl

može biti koristan alat za razlikovanje pacijenata koji imaju samo anti-CCD IgE od onih koji imaju specifično prepoznavanje proteinskih epitopa. [10]

HISTORIJAT CCD

Iako je prvi put opisano prije nekoliko desetljeća, važnost antitijela specifičnih za ugljikohidrate kao medijatora alergije tipa I nije bila prepoznata sve do nedavno. Prije se smatralo da antitijela specifična za alergen IgE koja se vežu na epitope ugljikohidrata pokazuju klinički irelevantnu unakrsnu reaktivnost. Međutim, to se promijenilo nakon otkrića alergija tipa I posebno posredovanih oligosaharidnim strukturama.[11]

U 1960-ima znanstvenici su sve više pretpostavljali da alergene mora karakterizirati zajednička karakteristika koja definira alergen kao alergen.[12] Nekoliko skupina znanstvenika neovisno je ispitala kliničku reaktivnost alergičnih bolesnika na različite ekstrakte alergena u kožnim testovima i, prema izračunatim koeficijentima korelacije, predložilo da se alergeni mogu grupirati u skupine ili obitelji bliskog alergennog potencijala.[13] Na temelju ovih rezultata, drugi su pretpostavili da su ključna kemijska svojstva alergena N-glikozidno povezani šećeri.[14] Iako se to nije pokazalo kao ključ za razumijevanje alergijskog potencijala određenih antigena općenito, pokazalo se tačnim: mnogi alergeni, posebno oni iz biljnog carstva, posjeduju zajedničke N-glikozidno povezane imunogene determinante ugljikohidrata sa svojstvima vezanja IgE. Godine 1979., japanska je skupina opisala kompletnu strukturu ugljikohidratnog dijela bromelaina iz matice ananasa, što se općenito smatra početnom točkom identifikacije unakrsno reaktivnih determinanti ugljikohidrata i njihove važnosti.[15]

Iste godine Baur i sur. opisao je međusobnu inhibiciju Radio-Allergo-Sorbent-Test-a (RAST) na papain, bromelain, pšenično brašno, raženo brašno, pelud trave i pelud breze. Međutim, relevantne unakrsno reaktivne strukture bilo je teško identificirati s radioimunoelektroforezom, koja je u to vrijeme bila standardna metoda. Početkom 1980-ih, Aalberse i njegovi kolege identificirali su IgE antitijela koja unakrsno reagiraju s biljnom hranom, peludom i otrovom Hymenoptera novim i preferiranim postupkom "imunoblotting".[16]



Posebno su dva nalaza omogućila uspostavljanje koncepta 'unakrsno reaktivnih determinanti ugljikohidrata', ukratko CCD-a: njihovi rezultati koji pokazuju da se križno-reaktivni inhibitorni učinak peludi trave u RAST-u može uništiti predobradom perjudatom, postupkom koji rezultira razgradnjom ugljikohidrata, I opažanja, da lektin koji sadrži gume poput tragakan-tove gume - lektini vrlo specifično vežu određene ugljikohidrate - mogu inhibirati razine RAST-a u heljdi ili krumpiru. Kasnije su ovi nalazi dokazani pokazujući da glikopeptidi napravljeni od bromelaina iz stabljike ananasa mogu inhibirati vezanje anti CCD IgE . Ne-humani monosaharid β -(1,2) ksiloza vezan je za prvu manozu u području jezgre N-glikana. Identificirano je da su ove imunogene fukoze i ksiloze odgovorne za vezanje IgE i križnu reaktivnost IgE. Očekuje se da oko 15-30% atopijskih bolesnika koji povećavaju IgE odgovor ima anti-CCD IgE. [17]

CCD BLOKERI

Prisutnost anti-CCD IgE može se dokazati uz pomoć screening alergena koji sadrži CCD, kao što je MUXF3, ili pomoću prirodnih glikoproteina kao što su bromelain, peroksidaza iz hrena, ili askorbat oksidaze. Pozitivan test samo potvrđuje prisutnost takvih protutijela u serumu, ali ne dopušta pouzdanu izjavu o tome je li reaktivnost s određenim izvorom alergena isključivo posljedica CCD-ova ili su dodatno uključena protein-specifična IgE antitijela. Smjernice AWMF-a poznate kao In vitro Allergiediagnostik (In vitro dijagnoza alergije) [18] navode da test inhibicije sa specifičnim CCD probirnim alergenom može značajno poboljšati specifičnost testa. U tamo spomenutim referencama , test inhibicije se smatra poželjnim alatom za povećanje specifičnosti, ali posebne preporuke nisu dane. Podaci o tome nedostaju, a tehnička primjena ostaje neriješena. [19]. Dakle, postoji potreba za jednostavnim postupkom odvajanja pljeve anti-CCD IgE antitijela od pšenice klinički relevantnog antigen- specifičnog IgE. Nevažne ili lažno pozitivne rezultate testova treba suzbiti, a na relevantne ne treba utjecati. Tehnički plan Izvođenje postupka treba biti jednostavno, tvar stabilna i neproblematična, troškovi niski, rezultati ponovljivi, a valjanost visoka. Nedavno je razvijen CCD blokator za rješavanje upravo ovog problema. [20]

CCD blokator je sintetski gliko protein napravljen od humanog serumskog albumina (HSA, Sigma-Aldrich) i visoko pročišćenog biljnog glikopeptida. Bromelain se prvo izolira iz ekstrakta stabljike ananasa (Sigma-Aldrich) i probavlja s protease. Ovim se procesom uništavaju svi postojeći proteinski epitopi. Tako dobiveni glikopeptid pročišćava se takozvanom MUXF strukturom (posebno MUXF³) i dipeptidom ili tripeptidom kako bi se postigla homogenost. Identitet i čistoća testirani su MALDI-TOF masenom spektroskopijom. MUXF glikopeptid je povezan s HSA preko dinetrodifluorobenzena (Sigma-Aldrich). MALDI-TOF masena spektroskopska analiza otkrila je umjerenu prisutnost najmanje devet MUXF glikopeptida. (slika 6.) Budući da sam CCD blokator ne sadrži antigen-ske determinante, može se, isključiti rizik od nenamjerne supresije relevantnih IgE alergijskih reakcija. Polivalentnost CCD blokatora osigurava njegovu visoku učinkovitost i, posljedično, nisku radnu koncentraciju. CCD blokator se može dodati serumima prije određivanja specifičnih IgE antitijela korištenjem bilo kojeg tipa IgE sistema za testiranje. [20]

CILJ RADA

U ovom smo se radu usredotočili na „šarene“ rezultate za specifične IgE za inhalatorne alergene a pogotovo za rezultate hrane, s ciljem da potvrdimo ili isključimo kao lažno pozitivne kako bi kliničari imali pouzdane podatke. Sve rezultate dobivene prije kao i poslije obrade sa CCD blokatorom smo statistički obradili i uporedili

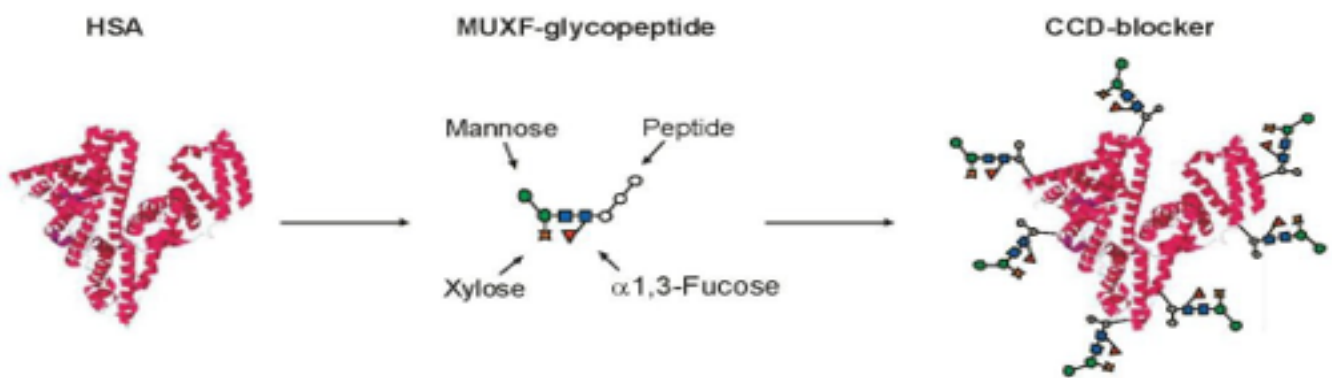
MATERIJAL I METODE

Od 2013. godine služba za laboratorijsku dijagnostiku u Općoj bolnici Tešanj radi in vitro testiranje uzoraka na inhalatorne i alergene hrane. Kroz rad smo se neizbježno susretali sa „sumnjivim“ pozitivnim rezultatima, sumnjajući na unakrsnu reakciju ugljikohidrata, pokušavali ih riješiti na način ponavljanje testova i uzoraka kao i izdavanjem komentara rezultata uz nalaz. Od 2021 godine CCD blokatore uvodimo u rutinsku obradu sumnjivih rezultata. U istoj godini je kod 388 uzoraka seruma ispitana preosjetljivost na inhalatorne i alergene hrane. Za obradu seruma su korišteni Polycheck multiparametarski testovi (Njemačka)



koji tada još nisu sadržavali indikatore za CCD. Kod 43 uzorka smo izrazili sumnju na reaktivnost CCD. Izdvojeni serumi su podvrgnuti CCD testu inhibicije i ponovo testirani a rezultati upoređeni sa prethodnim. Oba rezultata su poslana liječniku koji je upućivao

kao i odgovarajući komentar. Ovaj rad je rezultat našeg iskustva sa „šarenim“ rezultatima za specifične IgE i njihovo tretiranje sa CCD blokatorima.



Slika 1. Proizvodnja CCD blokatora iz humanog serumskog albumina (HSA) i MUXF glikopeptida.

Slika 6. Proizvodnja CCD blokera iz humanog albumina (HAS) i MUXF glikoproteina (preuzeto sa <https://www.proglycan.com>)

REZULTATI

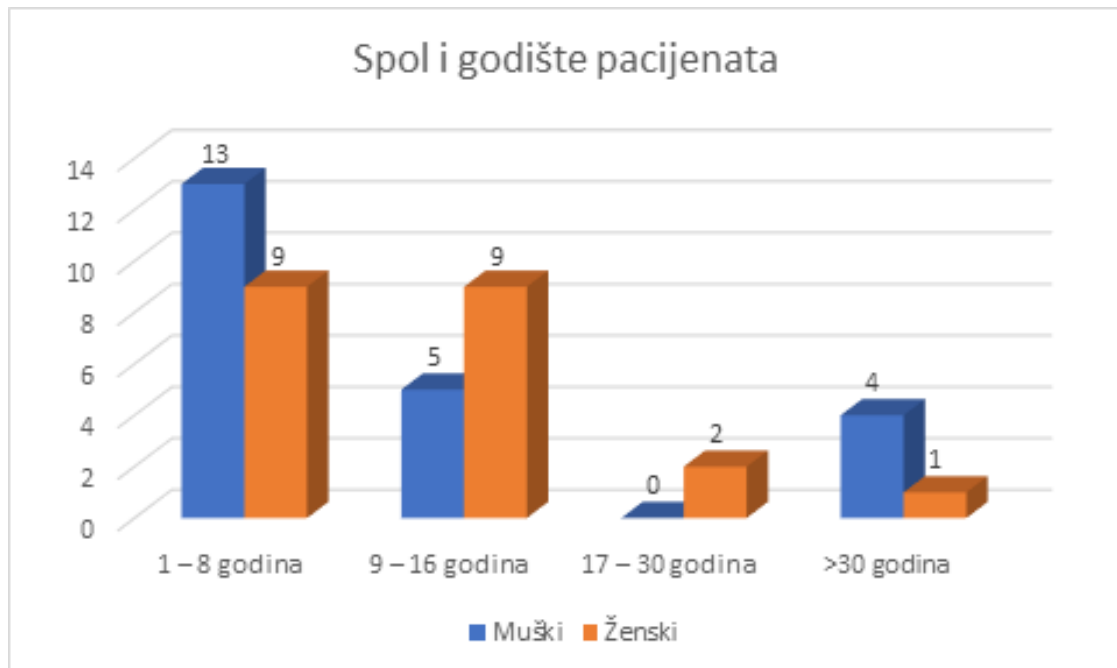
Utvrđena je statistički značajna razlika u vrijednostima alergena hrane po klasama prije i nakon davanja blokatora ($p < 0,05$). Nije utvrđena statistički značajna razlika u vrijednostima klasa inhalatornih alergeni i alergeni životinja te gljivice prije i nakon testa sa blokatorom ($p > 0,05$).

Ukupan broj ispitanih pacijenata je 43, muški je bilo 22, a ženski 21. u starosnoj dobi od 1 – 8 godina bilo je 22 pacijenta, dok je u starosnoj dobi od 9 – 16 godina bilo 14 pacijenata. U starijim dobnim skupinama je zabilježen manji broj pacijenata. Razlika se nije pokazala statistički značajnom u odnosu spola i životnog doba pacijenata ($p > 0,05$).

Tabela 1. Spol i godište pacijenata

Spol	1 – 8 godina	9 – 16 godina	17 – 30 godina	>30 godina	Ukupno
Muški	13	5	0	4	22
Ženski	9	9	2	1	21
Ukupno	22	14	2	5	43

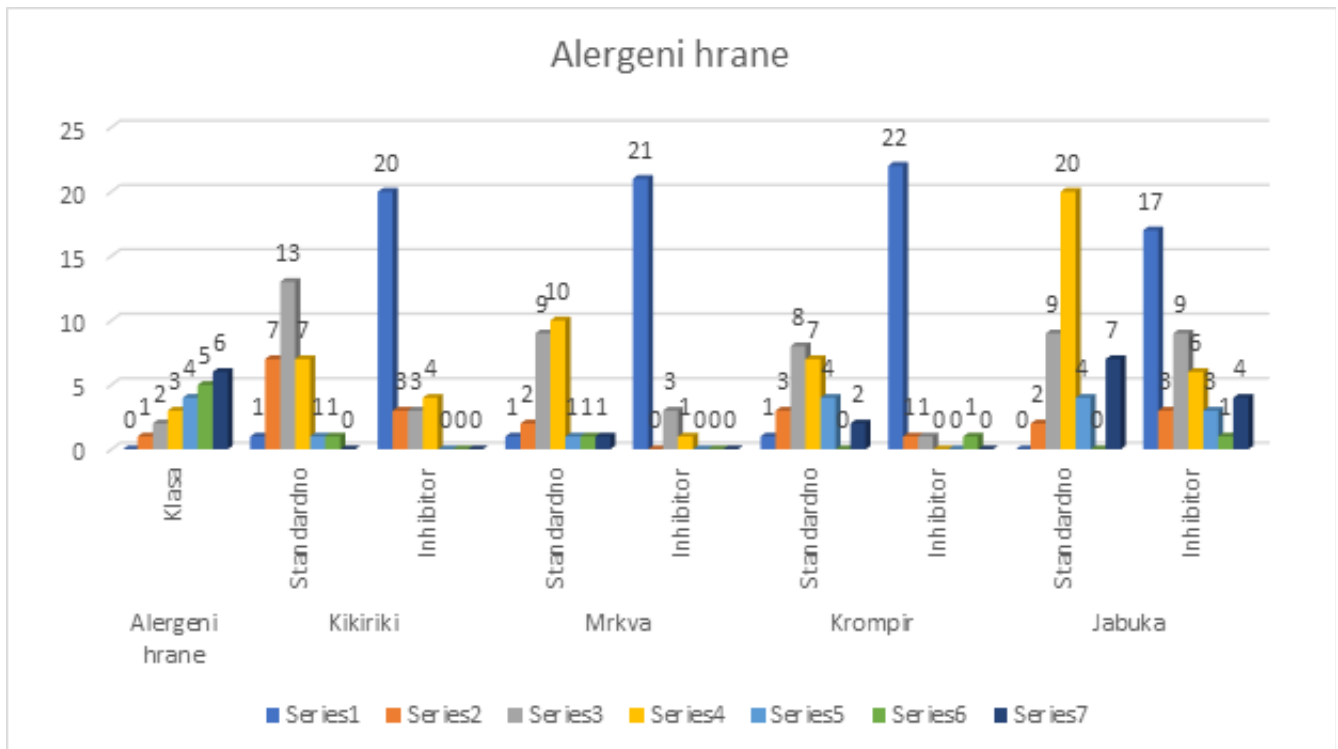
$$\chi^2=5,65 (p=0,1)$$



Grafikon 1. Spol i godište pacijenata

Tabela 2. Alergeni hrane (prikaz najčešće reagovanih alergena hrane, sortirani po rezultatima klasa , dobivenih bez (stupac „standardno,“) i sa (stupac „inhibitorno,“) dodatkom CCD blokera)

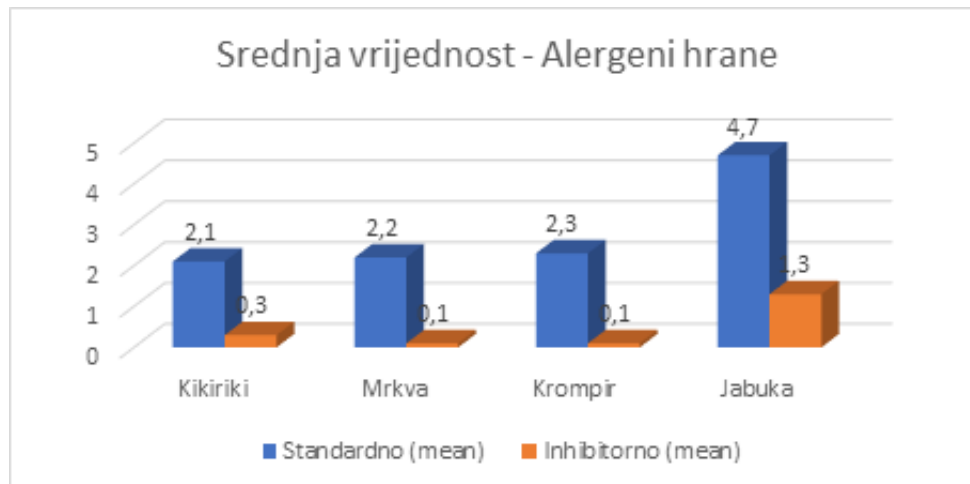
Klasa		0	1	2	3	4	5	6
Kikiriki	Standardno	1	7	13	7	1	1	0
	Inhibitirno	20	3	3	4	0	0	0
Mrkva	Standardno	1	2	9	10	1	1	1
	Inhibitirno	21	0	3	1	0	0	0
Krompir	Standardno	1	3	8	7	4	0	2
	Inhibitirno	22	1	1	0	0	1	0
Jabuka	Standardno	0	2	9	20	4	0	7
	Inhibitirno	17	3	9	6	3	1	4



Grafikon 2. Alergeni hrane

Tabela 3. alergenih hrane - prikaz najčešće reagovanih alergena hrane, sortirani po rezultatima srednjih vrijednosti klasa, dobivenih bez (stupac „standardno,“) i sa (stupac „inhibitorno,“) dodatkom CCD blokera)

Alergeni hrane	Standardno (mean)	Inhibitorno (mean)
Kikiriki	2,1	0,3
Mrkva	2,2	0,1
Krompir	2,3	0,1
Jabuka	4,7	1,3



Grafikon 3. srednja vrijednost - alergen hrane

Na osnovu rezultata T testa možemo zaključiti da se razlika u vrijednostima klasa prije i nakon dodavanja blokera pokazala statistički signifikantnom ($T=3,34$ $p=0,01$)

Tabela 4. Inhalatorni alergeni (prikaz najčešće reagovani inhalatorni alergeni, sortirani po rezultatima klasa dobivenih bez (stupac „standardno,“) i sa (stupac „inhibitorno,“) dodatkom CCD blokera)

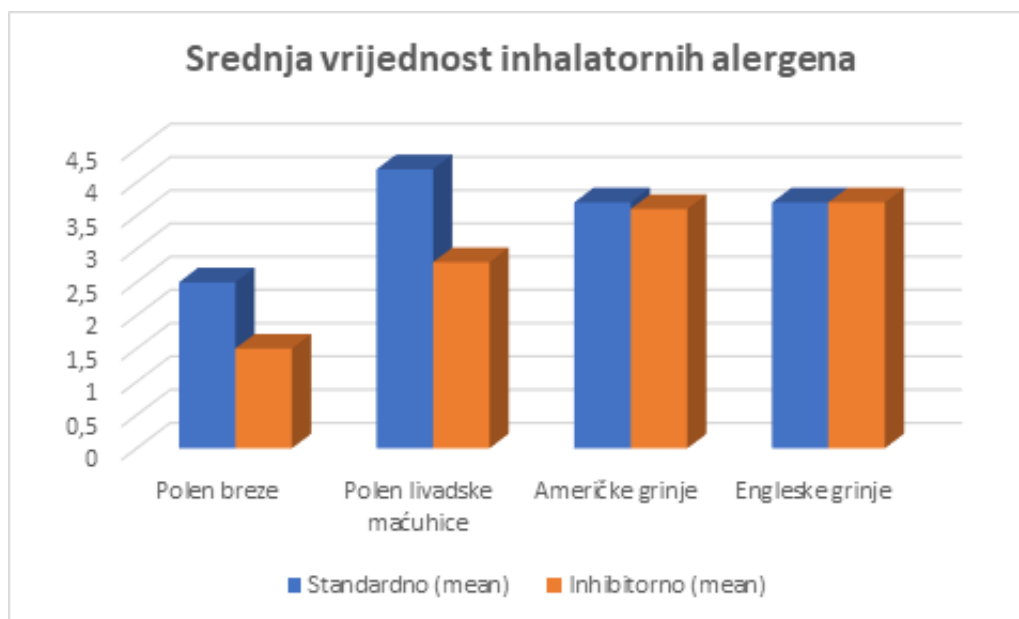
Inh.Alergeni	Klasa	0	1	2	3	4	5	6
Polen breze	Standardno	0	5	9	9	2	0	2
	Inhibitorno	15	0	3	5	2	0	2
Polen livad. maćuhice	Standardno	0	0	3	4	5	0	14
	Inhibitorno	8	0	0	4	0	0	12
Grinje američke	Standardno	0	0	2	1	0	1	16
	Inhibitorno	0	1	1	0	1	1	16
Grinje evropske	Standardno	0	0	1	2	0	1	16
	Inhibitorno	0	0	2	1	0	1	17



Tabela 5. prikaz najčešće reagovanih inhalatornih alergena, sortirani po rezultatima srednjih vrijednosti klasa , dobivenih bez (stupac „standardno,“) i sa (stupac „inhibitorno,“) dodatkom CCD blokera)

Inhalatorni alergeni	Standardno (mean)	Inhibitorno (mean)
Polen breze	2,5	1,5
Polen livadske maćuhice	4,2	2,8
Američke grinje	3,7	3,6
Evropske grinje	3,7	3,7

Na osnovu rezultata T testa razlika se nije pokazala statistički značajnom u odnosu na vrijednosti klasa prije i nakon davanja blokatora (T=1,0 p=0,35)



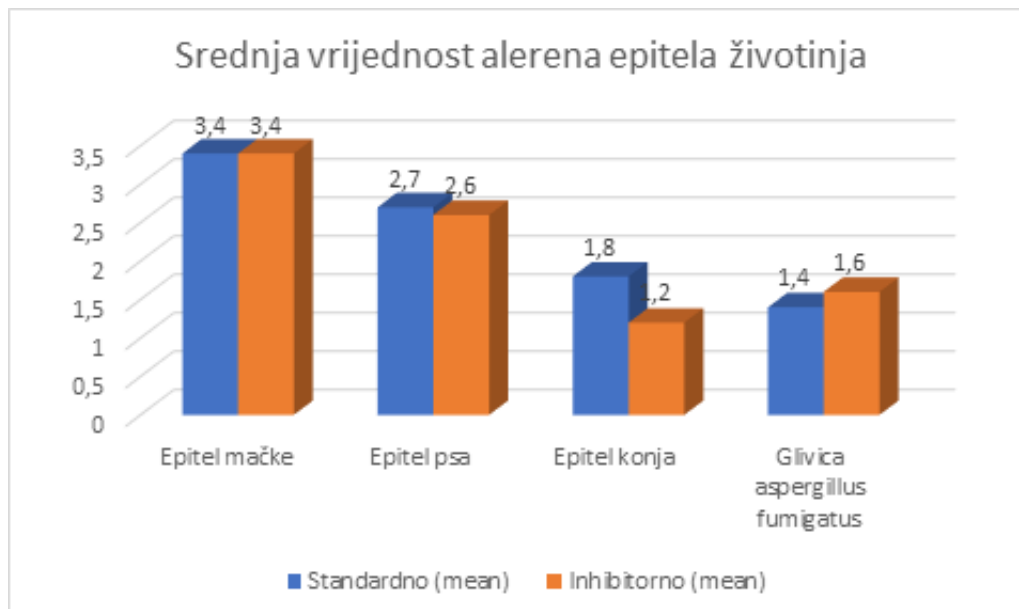
Grafikon 4. srednja vrijednost rezultata klasa – inhalatorni alergen



Tabela 6. Alergeni epitela domaćih životinja i gljivice - prikaz najčešće reagovani alergeni, sortirani po rezultatima srednjih vrijednosti klasa, dobivenih bez (stupac „standardno,“) i sa (stupac „inhibitorno,“) dodatkom CCD blokera)

Alergeni epitela životinja	Standardno (mean)	Inhibitorno (mean)
Epitel mačke	3,4	3,4
Epitel psa	2,7	2,6
Epitel konja	1,8	1,2
Aspergillus fumigatus	1,4	1,6

Na osnovu T test razlika se nije pokazala statistički značajnom u vrijednostima alergena epitela životinja prije i nakon davanja blokatora ($T=0,18$ $p=0,85$)



Grafikon 5. srednja vrijednost rezultata klasa – alergeni epitela domaćih životinja i aspergillus fumigatus



Alergeni	Klasa	IgE [kU/l]					
		0	1	2	3	4 + 5	100
f17 Lješnik	3	6.0					
f13 Kikiriki	3	5.3					
f16 Orah	2	0.92					
f20 Badem	2	3.4					
f02 Mlijeko	0	<0.15					
f01 Bjelanjak jajeta	0	<0.15					
f75 Žumanjak jajeta	0	0.25					
f78 Kazein	0	<0.15					
f35 Krompir	4	42					
f85 Celer	2	3.4					
f31 Mrkva	3	7.7					
f25 Paradajz	3	9.8					
f03 Bakalar	0	<0.15					
f24 Škampi	0	<0.15					
f95 Breskva	3	14					
f49 Jabuka	3	15					
f14 Soja	0	0.32					
f04 Pšenično brašno	3	3.8					
f10 Susam	3	9.3					
f05 Raženo brašno	3	5.2					

Klasa	Koncentr. IgE [kU/l]	Interpretacija	Klasa	Koncentr. IgE [kU/l]	Interpretacija
0	<0.35	Nema detekcije specifičnog IgE.	4	17.5 - <50	Visok titar specifičnog IgE.
1	0.35 - <0.7	Veoma slab titar specifičnog IgE.	5	50 - <100	Veoma visok titar specifičnog IgE.
2	0.7 - <3.5	Slaba titar specifičnog IgE.	6	>= 100	Ekstremno visok titar specifičnog IgE.
3	3.5 - <17.5	Jasan titar specifičnog IgE.			

Slika 7. prikaz slučaja, nalaz testa na alergene hrane prije dodavanja CCD blokera

Alergeni	Klasa	IgE [kU/l]					
		0	1	2	3	4 + 5	100
f17 Lješnik	0	<0.15					
f13 Kikiriki	0	<0.15					
f16 Orah	0	<0.15					
f20 Badem	0	<0.15					
f02 Mlijeko	3	6.5					
f01 Bjelanjak jajeta	0	<0.15					
f75 Žumanjak jajeta	0	0.15					
f78 Kazein	0	<0.15					
f35 Krompir	0	<0.15					
f85 Celer	0	<0.15					
f31 Mrkva	0	<0.15					
f25 Paradajz	0	<0.15					
f03 Bakalar	0	<0.15					
f24 Škampi	0	<0.15					
f95 Breskva	0	<0.15					
f49 Jabuka	0	<0.15					
f14 Soja	0	0.15					
f04 Pšenično brašno	0	<0.15					
f10 Susam	0	<0.15					
f05 Raženo brašno	0	<0.15					

Klasa	Koncentr. IgE [kU/l]	Interpretacija	Klasa	Koncentr. IgE [kU/l]	Interpretacija
0	<0.35	Nema detekcije specifičnog IgE.	4	17.5 - <50	Visok titar specifičnog IgE.
1	0.35 - <0.7	Veoma slab titar specifičnog IgE.	5	50 - <100	Veoma visok titar specifičnog IgE.
2	0.7 - <3.5	Slaba titar specifičnog IgE.	6	>= 100	Ekstremno visok titar specifičnog IgE.
3	3.5 - <17.5	Jasan titar specifičnog IgE.			

Slika 8. prikaz slučaja, nalaz testa na alergene hrane prije dodavanja CCD blokera



DISKUSIJA

Od 2013 godine služba za laboratorijsku dijagnostiku u Općoj bolnici Tešanj radi in vitro testiranje alergija koristeći multiparametarske Polycheck imunoblot testove od deset i dvadeset inhalatornih i alergena hrane epitela domaćih životinja i gljivica kao i njihovih kombinacije alergena. Kroz rad se neizbježno susrećemo sa „sumnjivim“ pozitivnim rezultatima, sumnjajući na unakrsnu reakciju ugljikohidrata (CCD) i poduzimajući mjere za njihovo rješenje. Kao lijek za rješenje tog problema nametala se upotreba anti - CCD blokera. Zbog visoke cijene prvih blokera odustaje se od njihove nabavke a kliničarima se kao uputa i objašnjenje na sumnjivi nalaz pišemo komentare i preporuke za dalje korake pacijenta (primjer komentara: zbog prisustva više pozitivnih rezultata klase 1-3 na specifične alergene iz hrane, postoji mogućnost da su oni posljedica interferencije po tipu CCD a ne stvarne prisutnosti specifičnih IgE koji bi upućivali na senzitivaciju. Preporučujemo pacijentu kod osnovane sumnje na alergijsku reakciju tipa I na pojedine alergene hrane uraditi i PRICK testiranje prije konačne dijagnoze). Od 2020 godine CCD blokera su po cijeni daleko pristupačniji te ih uvodimo u rutinsku obradu sumnjivih rezultata. U narednoj smo godini kod 388 uzorka ispitali preosjetljivost na inhalatorne i alergene hrane a kod 43 pacijenta izrazili sumnju na reaktivnost CCD. Izdvojeni uzorci su podvrgnuti CCD testu inhibicije i ponovo testirani a rezultati upoređeni sa prethodnim. Vrijednosti rezultata in vitro alergo testiranja su standardizovane vrednuju po klasama od 0 do 6.

Tako klasa 0 ima koncentraciju IgE (kU/l) manje od 0,35 kU/l, a rezultat intepetira kao negativan ili ne postojanje detekcije IgE, vrijednost klase 1 je 0,35 – 0,7 kU/l, i interpretira kao veoma slabo pozitivan, klasa 2 je 0,7 – 3,5 kU/l i označava kao slabo pozitivna, klasa 3 iznosi od 3,5 – 17,5 kU/l i vrednuje kao jasan titar specifičnog IgE, klasa 4 od 17,5 – 50 kU/l a označava kao visok titar, klasa 5 je od 50 – 100 kU/l je veoma visoki titar, dok klasa 6 iznosi više od 100 kU/l a interpretira kao ekstremno visoki titar specifičnog IgE.

U ovoj studiji ukupan broj ispitanih pacijenata je 43, muški je bilo 22, a ženski 21. uglavnom su dominirala djeca i to u starosnoj dobi od 1 – 8 godina 22 pacijenta, a od 9 – 16 godina bilo 14 pacijenata. Uz primjetan podatak da djeca do puberteta dominiraju dječaci a nakon puberteta u većem broju su zastupljene djevojčice. U starijim dobnim skupinama je zabilježen manji broj pacijenata. Razlika se nije pokazala statistički značajnom u odnosu spola i životnog doba pacijenata ($p>0,05$).

Kod testiranja alergena hrane uticaj anti – CCD blokera je bio vrlo izražen što je vidljivo kod pojedinih alergena hrane koje su najčešće reagovali i statistički obradili (kikiriki, mrkvu, krompir i jabuku). Uticaj anti CCD na rezultate prije i nakon dodavanja blokera je vidljiva jer kikiriki je prije dodavanja blokera bio pozitivan u klasi 1 sedam uzoraka a u klasama od 2 do 6 pozitivan kod 27 pacijenata, a nakon obrade sa blokerom negativnih je bilo 20, u u klasama od 2 – 3, 7 uzoraka. Slične ili gotovo iste rezultate smo dobili kod obrade alergena mrkve i krompira sa skoro identičnim rezultatima od ukupno 24 pozitivna uzorka koji su se kretali od klase 1 sa 2, a u klasama od 2 - 6 utvrđeno je 22 pozitivna rezultata. Nakon dodavanja blokera negativnih rezultata je bilo 20, a ostatak od 4 uzorka se kretao u nižim klasama, tj. 2 – 3 klase. Rezultati testova kod alergena na jabuku su pokazali nešto višu reaktivnost. Jabuka je od 43 uzorka pozitivno reagovala kod 32 i to u klasi 1, 2 uzorka, a u klasama 2 – 6 kod 30 uzoraka od čega 7 uzoraka sa ekstremno visokim titrom. Nakon obrade sa blokerom kod alergena jabuke dobili smo sljedeće rezultate, negativnih testova je bilo 17, u klasi 1 pronađena su 3 pozitivna uzorka a u klasama od 2 do 6 reagovala su 23 uzorka. Ukupna srednja vrijednost za pojedine alergene hrane (kikiriki, mrkva i krompr) prije dodavanja blokera iznosila je od 2,1 do 2,3 klase, a nakon obrade seruma sa blokerom od 0.1 do 0.3 klase,. Kod jabuke je vidljiva veća reaktivnost i učinak na rezultate i prije i nakon obrade sa blokerom tj. prije blokera prosjek klase je bio 4,7, a nakon uticaja blokera prosjek klase je iznosio 1,3. Rezultati hrane su nam bili veoma bitni zbog mogućnosti da interpretacija re-



zultata pozitivnog alergo testa na hranu sa uticajem CCD može dovesti do zabrane bez potrebe određene vrste ili pak više namirnica, ili uključivanje određene terapije u ovom slučaju nepotrebne.

Kod usporedbe rezultata alergo testova prije i nakon dodavanja blokera kod inhalatornih alergena utvrdili smo sljedeće. Kao najčešće reagujući vanjski inhalatorni alergeni pokazali su polen breze kao i polen lovadske maćuhice. Kod polena breze ukupno je pozitivnih prije dodavanja blokera bilo 27, a najčešće klase su bile 2 i 3, nakon dodavanja blokera 15 testova je bilo negativno i to uglavnom iz klasa 1,2, i 3, dok su više klase ostale ne promjenjene. Kod livadske maćuhice ukupan broj pozitivnih rezultata je 26, i to sa 12 pozitivnih testova u klasama između 2 i 5, dok je ekstremno visok titar bio kod 14 pacijenata. Nakon obrade serumma sa blokerima imali smo 8 negativnih rezultata, u trećoj klasi 4, dok je u klasi 6 stanje bilo skoro ne promjenjeno t. dobili smo 12 pozitivnih testova. Srednja vrijednost klasa za vanjske inhalatorne alergene je kod polena breze prije dobrade sa blokerom je 2,5 dok nakon obrade sa blokerom iznosi 1,5. Prosječna vrijednost klasa kod alergena na livadsku maćuhicu je 4,2 prije blokera, a nakon obrade sa blokerom je vrijednost je iznosila 2,8. Za oba primjera rezultati ne pokazuju statističku značajnost u odnosu na vrijednost klasa prije i nakon davanja blokera.

Kod unutrašnjih inhalatornih alergena najčešći reagujući alergeni su kako evropske tako i američke. Na grinje ukupno je bilo pozitivno 20 uzoraka sa izuzetno visokom reaktivnošću, jer su od 20 pozitivnih 16 reagovala sa ekstremno visokim titrim specifičnog IgE antitijela prije i nepromjenjenim rezultatima poslije obrade sa blokerom sa prosjekom klasa u četvrtoj grupi.

Dakle, na osnovu dobivenih rezultata na inhalatorne vanjske alergene možemo zaključiti da učinak anti CCD blokatora je vidljiv ali ne toliko oliko je kod alergena hrane. Kod inhalatornih unutrašnjih alergena prije svega kod grinja, rezultati prije i poslije obrade sa blokerima su identični pa možemo zaključiti da CCD antitijela ne djeluju unakrsno kod pozitivnih rezultata na grinje.

Alergeni epitela životinja i gljivica također nisu pokazale statističku značajnost jer rezultati alergena epitela mačke, psa i konja kao i na *aspergillus fumigatus* nisu pokazale promjene klasa rezultata prije i nakon obrade seruma sa blokerima, što je pokazala i usporedba prosjeka dobivenih rezultata klasa.

Dobiveni rezultati su potvrdili je da kod rada in - vitro alergo testova na multiparametarskoj imunoblot platformi jasno vidljiv uticaj anti CCD u nastanku više lažnih pozitivnih rezultata a što upućuje na opravdanu sumnju u interferenciji i nagonu na djelovanje ka rješavanju tih sumnji.

Rezultati do kojih smo došli su nam takođe pomogli kod daljnog odabira uzoraka za tretman sa CCD blokerima, koji su se pokazali kao uspješan put u rješavanju problema interferencije rezultata pod uticajem CCD antitijela a posebno kod alergena hrane. Takođe u radu smo dobili i rezultate koji iskaču iz očekivanih vrijednosti odnosno kod kojih testirani CCD blokator nije uspio postići dovoljnu inhibiciju, što navodi na sumnju na uticaj i drugih faktora na sam krajnji rezultat testa (prisutnost dvostruke preosjetljivosti ili inhibiciju uzrokuju faktori koji nisu CCD-ovi) i nameće zadatak laboratorijama, kliničarima i istraživačima da taj problem istraže što detaljnije. Činjenica da CCD-ovi predstavljaju samo jedan potencijalni izvor pogreške u in-vitro dijagnozi alergije, postoje i neki drugi faktori koji mogu imati uticaj kao što je slaba specifičnost IgE, konkurencija IgE ili drugih "imitatora alergije". Međutim problem CCD-a, kvantitativno gledano glavni uzrok neskladnih izvještaja o alergijama.



ZAKLJUČAK

Eliminacija CCD-specifičnih IgE antitijela pomoću sintetičkog CCD blokatora drastično je smanjila broj lažno pozitivnih rezultati in vitro testova bez ugrožavanja osjetljivosti na relevantne IgE interakcije. Stoga, CCD-blokator predstavlja vrijedan alat za povećanje specifičnosti testa rutinske in vitro dijagnoze alergije.

Zaključak: Uklanjanje učinka IgE usmjerenog protiv CCD-a inhibicijom dovodi do značajnog smanjenja lažno pozitivnih in vitro rezultati ispitivanja bez smanjenja osjetljivosti prema relevantnim senzibilizacijama. Primjena CCD blokatora može biti vrijedna gdje god se koriste prirodni ekstrakti alergena ili komponente.

LITERATURA

1. prim. dr. sc. Sanja Popović-Grle Klinika za plućne bolesti Jordanovac Alergijske bolesti – uzroci i posljedice MEDIX • SRPANJ 2007. • GOD . XIII • BROJ71
2. Dodig s. laboratorijska dijagnostika alergija. Paediatr Croat 2012; 56 (suppl 1): 90-6.
3. Batišta I, Stipić Marković A, Čvorišćec B. Dijagnostika alergijskih bolesti in vitro. Biochem Med 1996, 6: 213-21.
4. [ML Sanz](#)¹, [ja Prieto](#), [BITI García](#), [Oehling](#) Dijagnostička pouzdanost određivanja specifičnog IgE Zavad za alergologiju i kliničku imunologiju, Medicinski fakultet, Sveučilišna klinika Navarra, Pamplona, Španjolska
5. polichek uputstva za rad www.polycheck.de
6. Jill Tate, Greg Ward Department of Chemical Pathology, Queensland Health Pathology Service, Princess Alexandra Hospital, Woolloongabba, Queensland 4102, Australija) Interferencije u imunotestovima , (Clin Biochem Rev 2004; 105-120)
7. Brehler R., Grundmann S., Stöcker B. Unakrsne determinante ugljikohidrata i alergija na otrov Hymenoptera. *Curr. Opin. Klinika za alergije. Immunol.* 2013.; 13 :360–364. doi: 10.1097/ACI.0b013e328362c544.
8. Tretter V., Altmann F., Kubelka V., März L., Becker WM Fukoza α 1,3 povezana s jezgrom glikoproteinskih n-glikana stvara važan epitop za ige kod osoba s alergijom na pčelinji otrov. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1993.; 102 : 259–266. doi: 10.1159/000236534. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
9. Antonicelli L., Bilò MB, Bonifazi F. Epidemiologija alergije na himenoptera. *Curr. Opin. Klinika za alergije. Immunol.* 2002; 2 :341–346. doi: 10.1097/00130832-200208000-00008. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]



10. Maurer HR Bromelain: Biokemija, farmakologija i medicinska uporaba. *stanica. Mol. Život Sci.* 2001; 58 : 1234–1245. doi: 10.1007/PL00000936. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
11. Miriam Hils 1†, Florian Wölbing1†, Christiane Hilger Tilo Biedermann1,4 *Povijest ugljikohidrata u vrsti I Alergija
12. Augustin R, Hayward BJ. Alergeni peludi trava: IV. izolacija nekih od glavnih alergena *phleum pratense* i *dactylis glomerata* i njihovi spektri osjetljivosti u bolesnika. *Imunologija.* (1962) 5:424.
13. Holley JW, Willén K. Metoda faktorske analize za proučavanje intrakutanih kožnih reakcija. *Alergija.* (1969) 24:284–93. doi: 10.1111/j.1398-9995.1969.tb03744.x
14. Berrens L. Kemijska klasifikacija atopijskih alergena: pokušaj integracije. *Int Arch Allergy Immunol.* (1971) 41:186–98. doi: 10.1159/000230517
15. Ishihara H, Takahashi N, Oguri S, Tejima S. Kompletna struktura ugljikohidratnog dijela bromelaina iz stabljike. Primjena glikopeptidaze badema za proučavanje strukture glikopeptida. *J Biol Chem.* (1979) 254:10715–9.
16. Aalberse R, Koshte V, Clemens J. Imunoglobulin E antitijela koja križno reagiraju s biljnom hranom, polenom i otrovom Hymenoptera. *J Allergy Clin Immunol.* (1981) 68:356–64. doi: 10.1016/0091-6749(81)90133-0 23. Weber A, Schröder H,
17. Thalberg K, Marz L. Specifična interakcija IgE antitijela s ugljikohidratnim epitopom fosfolipaze otrova medonosne pčele A2. *Alergija.* (1987) 42:464–70. doi: 10.1111/j.1398-9995.1987.tb00364.x 24. Tretter V, Altmann F, Kubelka V, März L, Becker
18. Renz H, Biedermann T, Bufe A, Eberlein B, Jappe U, Ollert M, Petersen A, Kleine-Tebbe J, Raulf-Heimsoth M, Saloga J, Werfel T, Worm M. AWMF-Leitlinie In vitro alergijska dijagnostika. *Al lergo J.* 2010.; 19: 110-128.
19. Jappe U, Raulf-Heimsoth M. Značaj križno-reaktivnih determinanti ugljikohidrata (CCD) za dijagnozu alergije. *alergologija.* 2008.; 31: 82- 90. CrossRef
20. Jin C, Focke M, Leonard R, Jarisch R, Altmann F, Hemmer W. Ponovno ocjenjivanje uloge hijaluronidaze u alergiji na otrov žutog omotača. *J Allergy Clin Immunol.* 2010.; 125: 184-190.



GOOD LABORATORY PRACTICE FOR POTENTIAL INTERFERENCES OF RESULTS ON SPECIFIC IgE FOR CERTAIN ALLERGENS

Kotorić N.

ABSTRACT

Allergy diagnosis by determination of allergen-specific IgE is complicated by clinically irrelevant IgE antibodies, the most prominent example of which is IgE against cross-reactive carbohydrate determinants (CCD) that occur on allergens from plants and insects. Although they have no clinical significance, in the diagnosis of allergies in vitro, the appearance of these antibodies makes it difficult to interpret positive results. Inhibition of CCDs has been proposed as a remedy. In this paper, we presented our experiences in solving problems caused by CCDs in allergy diagnostics and the intention to confirm or reject suspicious results as false positives. Since 2010, the laboratory diagnostics service at Tešanj General Hospital has been doing in vitro allergy testing. During our work, we inevitably encountered “suspicious” positive results, suspecting the cross-reaction of carbohydrates and taking measures to solve them. Since 2021, we have been introducing CCD blockers into the routine processing of suspicious results. In the same year, we examined hypersensitivity to inhalant and food allergens in 388 samples, and in 43 we expressed suspicion of CCD reactivity. Separated samples were subjected to CCD inhibition test and retested and the results were compared with the previous ones. This paper is the result of our experience with “colorful” results for specific IgE and their treatment with CCD blockers. A statistically significant difference was found in the values of food allergens by a class before and after the administration of the blocker. However, in the case of inhalant allergens and allergens of fungi and animal epithelium, no statistically significant difference was found in the class values before and after administration of the blocker. Elimination of CCD-specific IgE antibodies using a synthetic CCD blocker drastically reduced the number of false-positive in vitro test results without compromising sensitivity to relevant IgE interactions. Therefore, the CCD-blocker represents a valuable tool to increase the specificity of the routine in vitro allergy diagnosis test.

Corresponding author:

Nermin Kotorić

Email: kotoric.nermin@hotmail.com

Tel. 00387 061 692 852