증례보고
Lab Med Online
Vol. 10, No. 3: 242-246, July 2020
https://doi.org/10.3343/lmo.2020.10.3.242

진단면역학 LMO

Multiple Allergen Simultaneous Test-Immunoblot Assay에서 Cross-reactive Carbohydrate Determinant 특이 항체에 의한 위양성 반응 방지: 증례 보고

Inhibition of Cross-Reactive Carbohydrate Determinant–Specific IgEs Reduce False Positive Reponses to Multiple Allergen Simultaneous Test–Immunoblot Assay: A Case Study

송다영[1,2] · 이준희[1,2] · 김성민[3] · 전선희[3] · 이경훈[1,3] · 송상훈[1,2] · 송정한[1,3]
Da Young Song, M.D.[1,2], Joon Hee Lee, M.D.[1,2], Sung Min Kim, M.T.[3], Sun-Hee Jun, M.T.[3], Kyunghoon Lee, M.D.[1,3], Sang Hoon Song, M.D.[1,2], Junghan Song, M.D.[1,3]

서울대학교 의과대학 검사의학교실[1], 서울대학교병원 진단검사의학과[2], 분당서울대학교병원 진단검사의학과[3]
Department of Laboratory Medicine[1], Seoul National University College of Medicine, Seoul; Department of Laboratory Medicine[2], Seoul National University Hospital, Seoul; Department of Laboratory Medicine[3], Seoul National University Bundang Hospital, Seongnam, Korea

Cross-reactive carbohydrate determinants (CCDs) are simple carbohydrates linked to amino acid chains; they are found in pollens, vegetable foods, insect, and Hymenoptera venoms and are broadly cross-reactive with CCD-specific IgE antibodies. A man in his fifties was evaluated using a multiple allergen simultaneous test–immunoblot assay. On the PROTIA Allergy-Q 64 inhalant panel (ProteomeTech, Korea), reactions to 37 of 59 antigens were observed except mammalian antigens, and cross-reactivity owing to anti-CCD antibodies was suspected. After ProGlycAn CCD-blocker (ProGlycAn, Austria) treatment, the patient exhibited no response to CCD allergens, and the number of allergens showing positive reactions was reduced to 15. We further tested a total of 7 samples from patients who were suspected to have CCD-related cross-reactivity. For these 8 patients, the average number of positive reactions to allergens was reduced from 33 (range 24-36) to 8 (range 0-19) after CCD-blocker treatment. We concluded that CCD-blocker treatment in sample with anti-CCD antibodies can reduce the false positive reponse and provide more specific information about allergens.

Key Words: Cross-reactive carbohydrates, Cross-reactive carbohydrate determinats, Allergens, Epitopes, False positives, IgE

서 론

알레르기 원인 항원의 식별은 알레르기 피부바늘따끔검사(allergen skin prick test)가 대표적인 생체 내 시험과 항원 특이 IgE 항체를 측정하는 시험관 내 검사로 나눌 수 있다. 이 중 특이성이 상대적으로 높은 항원 특이 IgE 항체 검사는 총 말초 호산성 과립구 수와 함께 알레르기 질환의 진단과 중증도 평가를 위해 측정한다[1]. 혈청 내 특이 IgE 항체 검사는 검사 종류의 원리에 따라 방사면역측정법, 효소면역측정법, 면역형광염색법, 화학발광면역분석법으로 나뉘며, 검체 당 측정하는 항원 개수에 따라 singleplex와 multiplex로 나눌 수 있다[2]. 한편 cross-reactive carbohydrate determinants (CCD)는 당화 과정에서 아미노산에 부착되는 탄수화물 구조로, CCD 결정기를 가진 당화단백질은 꽃가루, 식물, 벌목과의 독, 곤충과 같은 항원에 흔히 분포하는 것으로 알려져 있다[3, 4]. 많은 CCD 항원은 상동적인 구조로 되어 있으며 α-1,3-fucose와 β-1,2-xylose가 대표적이다(Fig. 1). 이 공통적인 항원은 생체 내 생성된 CCD 특이적인 항원과 광범위한 반응을 일으킬 수 있다[5]. 하지만 CCD 결정기는 임상적인 증상과 거의 관련이 없으며, 결과적으로 원인 알레르기항원의 파악을 방해할 수 있다[6, 7]. 기존 연구에 따르면 Kim 등의 초록 보고 외에 임상 검사실에서 항-CCD 항체에 대한 국내 보고가 드물어, 저자들은 이에 대해 보고 및 해석

Corresponding author: Junghan Song, M.D., Ph.D.
https://orcid.org/0000-0003-0576-9938
Department of Laboratory Medicine, Seoul National University Bundang Hospital, 82 Gumi-ro 173beon-gil, Bundang-gu, Seongnam 13620, Korea
Tel: +82-31-787-7691, Fax: +82-31-787-4015, E-mail: songjhcp@snu.ac.kr

Received: July 4, 2019
Revision received: September 16, 2019
Accepted: September 16, 2019

This article is available from https://www.labmedonline.org
© 2020, Laboratory Medicine Online
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

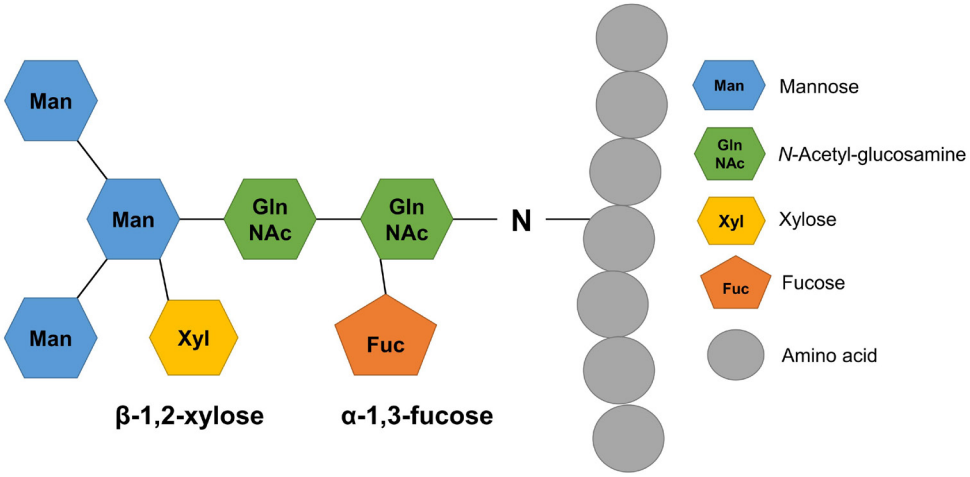

Fig. 1. Prototypical structure of cross-reactive carbohydrate determinant.

하는 것이 국내 검사실 내에 환기가 필요하다고 판단하여 immunoblot assay 방법을 이용한 Multiple Allergen Simultaneous Test (MAST) 검사에서 CCD 특이 IgE 항체로 인한 교차 반응이 관찰된 환자 예를 소개하고자 한다.

증 례

50대 남성이 간질성 폐 질환으로 외래에서 추적 관찰 중 악화되는 기침을 호소하여 원인 알레르기항원을 찾기 위해 MAST 검사를 시행했다. 분당서울대병원에서 시행하고 있는 PROTIA Allergy-Q 64 inhalant panel (ProteomeTech, Seoul, Korea)에서 이 환자의 검체는 59개 중 37개의 알레르기항원에서 양성을 보였다. 2개의 항목에서 class 1 (weak positive), 16개의 항목에서 class 2 (moderate), 14개의 항목에서 class 3 (moderately strong), 5개 항목에서 class 4 (strong) 양상을 보였다. 구체적으로, CCD 항원에 양성 반응을 보이며, 식물 및 곤충류에 광범위한 양성반응을 보이고, 포유류 항원에는 반응하지 않는 특징적인 결과를 보여 저자들은 항-CCD 항체로 인한 교차 반응을 의심하였다. 항-CCD 항체의 존재를 입증하기 위하여 ProGlycAn CCD-blocker (ProGlycAn, Vienna, Austria) 처리를 시행하였다. PROTIA Allergy-Q 64 inhalant panel에서 사용되는 검체량은 50 µL인데 제조사가 권고하는 대로 100단위 부피의 환자 검체당 2단위 부피의 CCD-blocker를 첨가 하기 위해 용기내의 사용하지 않는 검체량(dead volume)을 고려하여 환자 검체 100 µL 당 2 µL의 CCD-blocker를 첨가하였다. 이 후 실온에서 30분 동안 롤러에서 혼합하여 재검하였으나, 여전히 CCD 항원과 함께 처리 전과 같은 항목에서 양성 반응을 보였다. 항-CCD 항체가 충분히 처리되지 않았을 가능성을 고려하여 CCD-blocker 농도를 2배 처리 한 결과, CCD 항원은 class 0 (not found)으로 반응이 없었으며, 양성 반응이 보이는 항원은 총 15개로 감소하였다. CCD-blocker 처리 후 양성반응은 8개의 class 1, 6개의 class 2, 1개의 class 4로 분포하였다. 환자 검체를 제조사에서 제공한 diluent로 희석 후 재검한 결과 여전히 36개의 항원에서 양성 반응이 관찰되었다.

근무일 기준 13일 동안 MAST inhalant panel 검사가 의뢰된 236 검체 중 CCD 항원 양성이면서 식물, 곤충, 벌목과 독에 반응하고 포유류 관련 알레르기항원에 반응하지 않는 총 7명 환자의 검체에 대해 CCD-blocker 처리 실험을 추가로 진행했다. 증례 보고 환자를 포함하여 총 8개의 검체는 공통으로 CCD 항원에 class 2에서 4의 강도로 양성 반응을 보였고, CCD-blocker 처리 이후 CCD 항원과 반응을 보이지 않았다(Table 1). 이들 검체는 총 59개의 알레르기항원 중 평균 33개(범위 24-36)의 항원에서 양성 반응을 보였고, CCD-blocker 처리를 하였을 때 평균 8개(범위 0-19)의 항원에서 양성 반응을 보였다. 정상 일반인의 검체에서도 class 1 (weak) 반응을 보일 수 있는 점을 고려하여 class 2 (moderate) 이상의 양성 반응을 보이는 검체 또한 조사하였는데, 평균 30개(범위 22-35)의 항원에서 반응을 보였고, CCD-blocker 처리를 하였을 때 평균 5개(범위 0-16)의 항원에서 양성 반응을 보였다. 알레르기항원마다 항-CCD 항체의 교차 반응의 영향을 보기 위해 CCD-blocker 처리 전후로 반응을 보인 환자 검체의 개수 차이를 비교했다. 반응 여부의 역치는 class 1 (weak)과 class 2 (moderate)로 나누어서 기술하였다. 항-CCD 항체와 교차 반응을 일으키는 알레르기항원은 초기 검사에서 양성 반응을 보이다가 CCD-blocker 처리 후 음전된 알레르기항원으로 판단할 수 있다. CCD-blocker 처리의 여부와 알레르기항원과의 반응 여부가 상관없는 경우 CCD 교차 반응을 보이지 않은 알레르기항원으로 간주할 수 있다. CCD-blocker를 처리한 후 일부 알레르기항원에서 오히려 반응이 상승하는 것도 관찰할 수 있었다.

Table 1. Comparison of the number of positive reactions before and after CCD-blocker treatment as measured using a PROTIA Allergy-Q 64 inhalant panel in 8 patients

Allergen	No. of patients showing class ≥ 1 (weak) reactivity			No. of patients showing class ≥ 2 (moderate) reactivity*		
	Pre-CCD-blocker treatment	Post-CCD-blocker treatment	Difference	Pre-CCD-blocker treatment	Post-CCD-blocker treatment	Difference
CCD	8	0	8	8	0	8
Olive	8	0	8	8	0	8
Common pigweed	8	0	8	8	0	8
Wheat	8	0	8	7	0	7
Alder	8	0	8	7	0	7
White ash	8	1	7	8	0	8
Peanut	8	1	7	8	1	7
Maple leaf sycamore	8	1	7	8	1	7
Acacia	8	1	7	8	1	7
Sesame	8	1	7	6	0	6
Common ragweed	8	2	6	8	1	7
Cultivated rye	8	2	6	8	1	7
Sweet vernal/Orchard grass/Common reed/Bent grass	8	2	6	8	1	7
Willow	8	2	6	8	1	7
Oak	8	2	6	8	2	6
Cockroach	8	2	6	7	3	4
Cotton wood	8	3	5	8	1	7
Plantain	8	3	5	8	2	6
Timothy grass	8	4	4	8	1	7
Russian thistle	8	4	4	8	1	7
Bermuda grass	8	5	3	8	3	5
Dandelion	7	0	7	6	0	6
Goldenrod	7	1	6	6	0	6
White pine	7	1	6	6	1	5
Hazel	7	1	6	5	1	4
Japanese hop	7	2	5	7	2	5
Mugwort	6	0	6	4	0	4
Ox-eye daisy	6	0	6	2	0	2
Peach	6	1	5	5	1	4
Bee venom	6	2	4	6	1	5
Birch	5	1	4	4	1	3
Hevea latex	4	0	4	3	0	3
Apple	3	0	3	3	0	3
Dermatophagoides pteronyssinus	3	3	0	3	4	-1
Dermatophagoides farinae	3	3	0	3	4	-1
House dust	3	3	0	1	3	-2
Soy bean	2	0	2	2	0	2
Acarus siro	2	2	0	2	3	-1
Shrimp	2	2	0	2	3	-1
Japanese cedar	1	0	1	0	0	0
Horse	1	0	1	0	0	0
Milk	1	1	0	1	1	0
Tyrophagus putrescentiae	1	1	0	1	1	0
Cat epithelium & dander	1	3	-2	1	1	0
Egg white	0	0	0	0	0	0
Alternaria alternata	0	0	0	0	0	0
Cladosporium herbarum	0	0	0	0	0	0
Aspergillus fumigatus	0	0	0	0	0	0

(*Continued to the next page*)

https://doi.org/10.3343/lmo.2020.10.3.242

Table 1. Continued

Allergen	No. of patients showing class ≥ 1 (weak) reactivity			No. of patients showing class ≥ 2 (moderate) reactivity*		
	Pre-CCD-blocker treatment	Post-CCD-blocker treatment	Difference	Pre-CCD-blocker treatment	Post-CCD-blocker treatment	Difference
Penicillium notatum	0	0	0	0	0	0
Candida albicans	0	0	0	0	0	0
Mackerel	0	0	0	0	0	0
Wasp venom	0	0	0	0	0	0
Crab	0	0	0	0	0	0
Mouse/Rat	0	0	0	0	0	0
Rabbit	0	0	0	0	0	0
Guinea pig	0	0	0	0	0	0
Wool, sheep	0	0	0	0	0	0
Hamster	0	0	0	0	0	0
Dog dander	0	1	-1	0	0	0
Median [Q1–Q3]	6 [0-8]	1 [0-2]	4 [0-6]	4 [0-8]	0 [0-1]	3 [0-7]

*Considering that samples from normal patients can result in class 1 (weak) reactivity, allergens rated as class 2 (moderate) or higher reactivity were considered positive.
Abbreviation: CCD, cross-reactive carbohydrate determinant.

고 찰

알레르기 반응으로 간주하는 현상은 보통 제1형 과민 반응은 IgE를 매개로 한다[8]. 환자의 과거력과 함께 알레르기 질환을 유발할 수 있는 직접적인 원인을 찾는 방법으로 혈청 항원 특이 IgE 검사를 시행하고 있으며, 특히 연령이 어리거나, 피부묘기증, 습진 혹은 두드러기 등으로 피부 반응을 확인하기 어려운 경우, 항히스타민제를 복용하는 경우 등에서 피부바늘따끔검사 대신 쓰일 수 있다[9]. 또한 이 검사는 시험관 내 시험의 특성상 환자가 시험 도중 알레르기를 나타낼 위험이 없고, 검사 과정이 간단하다는 장점이 있다[10]. 한편 알레르기 분과에 의뢰된 무작위적인 검체의 23%에서 CCD 항원과 교차 반응이 보고된 것을 고려하였을 때, 아직 이 교차 반응의 정확한 빈도수가 파악되지 않은 국내 검사실에서 결과 보고 시 주의가 필요할 것으로 사료된다[11]. ImmunoCAP ISAC system (Phadia, Uppsala, Sweden)의 경우 대부분 *Escherichia coli*가 생성하는 재조합 항원을 사용하여 천연 추출물을 이용하는 MAST 방법보다 교차 반응이 적을 것으로 기대되지만, 일부 항원은 정제된 천연 추출물을 사용하기 때문에 이 교차 반응으로부터 완전히 자유로울 수는 없다[4].

CCD 항원과 반응이 양성이면서 포유류를 제외한 식물, 곤충류, 벌목과 독 관련 항원에서 전반적인 양성 반응이 관찰될 때, 항-CCD 항체로 인한 교차 반응을 의심할 수 있으며, 이때 CCD-blocker 처리를 고려할 수 있다. PROTIA Allergy-Q 64 inhalant panel의 26번 CCD 항원은 fucose와 xylose를 모두 포함하고 있는 MUXF type의 bromelain에서 추출한 항원이다. 항-CCD 항체로 인한 교차 반응은 ProGlycAn CCD-blocker, CCD-Blocking-Solution (Mediwiss Analytic GmbH, Moers, Germany), Anti-CCD Absorbent (EUROIMMUN, Lübeck, Germany) 등의 시판된 시약으로 억제할 수 있다. 이 CCD-blocker들은 CCD 항원을 가진 당화단백질로 구성되어 있고, 이 당화단백질들은 환자 혈청 내 항-CCD 항체를 흡착한다. CCD-blocker 처리로 임상적으로 의의가 없는 항-CCD 항체로 인한 위양성 반응을 없앰으로써 알레르기 원인 항원에 대한 정보를 정확하게 제공할 수 있을 것으로 기대한다. 본 증례에서는 CCD-blocker 처리 후 15개의 항원에서 양성 반응을 보였으나, 8개의 항원에서 class 1 (weak) 반응을 보였다. 정상인의 검체에서도 class 1 반응이 관찰될 수 있음을 감안할 때[12], 검사 결과상 특이성이 있다고 판단되는 항원은 최대 7개 정도로 원인 알레르기항원 파악을 하는데에 도움을 줄 수 있었다. 이 연구에서 확인한 특이한 점은, 삼나무는 다른 식물들과 다르게 한 환자에서 class 1 강도를 보였던 것을 제외하고 교차 반응을 보이지 않았다는 것이다. 이는 삼나무의 펩타이드 구조가 CCD 교차 반응을 일으키는 것과 다를 것으로 이전의 연구에서 추측된 바 있다[13]. 벌목과의 독은 CCD 결정기를 가진 대표적인 항원으로 진양성 결과와 교차 반응으로 인한 양성 반응을 구분해야 하는데[14], PROTIA Allergy-Q 64 inhalant panel에서 꿀벌독은 63%에서만 교차 반응을 보였고, 말벌독은 8개의 검체에서 모두 교차 반응을 보이지 않은 것은 흥미로운 점이다. 또한 Table 1 결과에서 확인할 수 있듯이 우리나라에서 빈도가 높은 것으로 보고된 진드기, 집먼지, 고양이털, 개털의 경우 CCD-blocker 처리 전후가 차이가 없거나 혹은 양성률이 오히려 높아지는 결과로 미루어 보아 CCD 교차 반응이 일어나지 않는 것을 이번 연구로 확인하였다. 이는 CCD-blocker 처리로 한국인에서 알레르기 주요 원인 항원에 대한 민감도를 높여 보고할 수 있을 것

으로 기대할 수 있다. 앞으로 CCD-blocker 처리가 MAST 검사를 시행하는 검사실에서 활발하게 사용되기 위해서는, 추가 처리에 대한 시약 비용, 소요 시간, 노동력, 판독 등 추가적인 비용에 대해 추후 논의가 필요할 것이다.

요 약

교차 반응 탄수화물 결정 물질(cross-reactive carbohydrate determinant, CCD)은 아미노산 단백질 사슬에 부착된 단순 탄수화물이며, 식물, 곤충류, 벌목 독 등에서 발견된다. CCD 항원은 생체 내 생성된 항-CCD 항체와 광범위한 반응을 일으킬 수 있다. 50대 남성이 immunoblot 방법을 이용한 Multiple Allergen Simultaneous Test를 시행했다. PROTIA Allergy-Q 64 inhalant panel (ProteomeTech, Korea)에서 포유류와 관련된 알레르기항원을 제외한 59개 중 37개의 항원에서 양성 반응을 보여, 항-CCD 항체로 인한 교차 반응을 의심하였다. ProGlycAn CCD-blocker (ProGlycAn, Austria) 처리 후에는 CCD 항원과의 반응이 없었고 양성 반응을 보이는 알레르기항원의 수는 15개로 감소했다. 검체를 희석 처리만을 했을 때 교차 반응이 여전히 나타났다. 총 7명의 항-CCD 항체로 인한 교차 반응이 의심되는 환자를 추가로 CCD-blocker 처리를 시행했다. 이들 8명의 검체는 평균적으로 33개(범위 24-36개)의 알레르기항원이 양성으로 나타났으며, CCD-blocker 처리 후 양성 결과를 나타내는 알레르기항원 수는 평균 8개(범위 0-19개)로 감소했다. 항-CCD 항체로 인한 교차 반응이 의심되는 검체에서 CCD-blocker를 처리하는 것은 위양성 반응을 감소시켜 알레르기 원인 항원에 대한 특이적인 정보를 제공할 수 있을 것으로 기대한다.

이해관계

저자들은 본 연구와 관련하여 어떠한 이해관계도 없음을 밝힙니다.

REFERENCES

1. Steiss JO, Strohner P, Zimmer KP, Lindemann H. Reduction of the total IgE level by omalizumab in children and adolescents. J Asthma 2008;45:233-6.
2. Kim M, Kim EK, Lee J, Park J, Kim T. Understanding of allergen-specific IgE test. Korean J Med 2018;93:452-6.
3. Grzywnowicz M, Majsiak E, Gawel J, Miśkiewicz K, Doniec Z, Kurzawa R. Inhibition of cross-reactive carbohydrate determinants in allergy diagnostics. Adv Exp Med Biol 2018;1116:75-9.
4. Altmann F. Coping with cross-reactive carbohydrate determinants in allergy diagnosis. Allergo J Int 2016;25:98-105.
5. van Ree R. Carbohydrate epitopes and their relevance for the diagnosis and treatment of allergic diseases. Int Arch Allergy Immunol 2002;129:189-97.
6. Altmann F. The role of protein glycosylation in allergy. Int Arch Allergy Immunol 2007;142:99-115.
7. Altmann F. Basophil activation test is better but not good enough for the diagnosis of hymenoptera venom allergy: the problem of cross-reactive carbohydrate determinants. Clin Exp Allergy 2010;40:1290-2.
8. Bennich HH, Ishizaka K, Johansson S, Rowe DS, Stanworth DB, Terry WD. Immunoglobulin E: a new class of human immunoglobulin. Immunology 1968;15:323-4.
9. Pipkorn U. Pharmacological influence of antiallergic medication on in vivo allergen testing. Allergy 1988;43:81-6.
10. Chung HL. Clinical significance of serum IgE. Korean J Pediatr 2007;50:416-21.
11. 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.
12. Kim YS and Kim Y. Research on allergy-causing materials of allergy diseases. Korean J Clin Lab Sci 2007;39:201-9.
13. Yokoi H, Yoshitake H, Matsumoto Y, Kawada M, Takato Y, Shinagawa K, et al. Involvement of cross-reactive carbohydrate determinants-specific IgE in pollen allergy testing. Asia Pac Allergy 2017;7:29-36.
14. Biló BM, Rueff F, Mosbech H, Bonifazi F, Oude-Elberink J; EAACI Interest Group on Insect Venom Hypersensitivity. Diagnosis of Hymenoptera venom allergy. Allergy 2005;60:1339-49.

https://doi.org/10.3343/lmo.2020.10.3.242