

ADENOVIRUSURI ÎN BOALA CELIACĂ LA COPIL

Adenoviruses in celiac disease in children

Samașca Gabriel¹, Pîrvan Alexandru², Miu Nicolae², Andreica Mariana²,
Cristea Victor¹, Dejica Doru¹

¹Catedra de Imunologie; ²Catedra de Microbiologie; ³Catedra Pediatrie II
Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu“, Cluj-Napoca

REZUMAT

Introducere: Boala celiacă sau intoleranța la gluten, este declanșată uneori de infecții virale, produse de Adenovirus 12 și virusul hepatitic C. Sunt autori care afirmă că această boală devine activă după astfel de infecții. Agentul viral acționează prin diferite mecanisme patogenetice, precum mimetism molecular, care are ca rezultat modularea toleranței imunitare a organismului gazdă. Înțelegerea relației dintre agenții infecțioși și răspunsul imun poate ajuta la precizarea unui diagnostic precoce și, de asemenea, la prevenirea bolii celiace. Scopul acestui studiu este de a determina prezența anticorpilor serici a altor subtipuri de IgA adenovirus (IgA-AcAd) la pacienții cu boală celiacă și a vedea dacă se poate stabili o relație de asociere între aceste două elemente.

Material și metodă: Studiul nostru s-a efectuat pe un lot de 80 de copii diagnosticați cu boală celiacă, tratați și netratați, la care pe parcursul anului 2010 am evidențiat IgA-AcAd, prin ELISA.

Rezultate: Din totalul pacienților, la 25 de pacienți (31,2%), majoritatea de sex feminin, cu vârsta între 6 și 9 ani, s-au evidențiat IgA-AcAd. O asociere semnificativă statistic între boala celiacă și IgA-AcAd ($p=0.002$) poate fi semnalată la pacienții cu boală celiacă tratată, care au avut valori ale IgA anticorpilor antitransglutaminază tisulară între 0-100 U/ml.

Concluzii: Activitatea IgA-AcAd în boala celiacă la copil există, fiind în strânsă relație și cu apariție în regresia bolii celiace.

Cuvinte cheie: boală celiacă, IgA adenovirus, asociere

ABSTRACT

Introduction: Celiac disease or gluten intolerance is often triggered by viral infections, caused by hepatitis C virus and Adenovirus 12. There are authors who say that the disease becomes active after such infections. Viral agent acting through different pathogenic mechanisms, such as molecular mimicry, which results in modulation of immune tolerance of the host organism. Understanding the relationship between infectious agents and the immune response may help predict an early diagnosis and also to prevent celiac disease. The purpose of this study is to determine the presence of serum antibodies to other subtypes of IgA adenovirus (IgA-AcAd) in patients with celiac disease and see if it can establish a relationship of association between these two elements.

Material and methods: Our study was conducted in a group of 80 children diagnosed with celiac disease, treated and untreated, which we highlighted in 2010, IgA-AcAd by ELISA.

Results: Of the total patients, 25 patients (31.2%), mostly female, aged between 6 and 9 years, were found with IgA-AcAd. A statistical significant association between celiac disease and IgA-AcAd ($p = 0.002$) can be reported in patients with treated celiac disease, which had values of IgA tissue transglutaminase antibodies between 0-100 U/ml.

Conclusions: There is an IgA-AcAd activity in celiac disease in children, being in close relationship and with occurrence in celiac disease regression.

Key words: celiac disease, IgA, adenovirus, association

Adresa de corespondență:

Dr. Samașca Gabriel, Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu-Hațieganu“, Str. Câmpeni, Nr. 2-4, Cod Postal 400217, Cluj-Napoca

e-mail: Gabriel.Samasca@umfcluj.ro

INTRODUCERE

Adenovirusurile sunt virusuri cu ADN dublu catenar, simetrie icosaedrică, neînvelite și de dimensiuni mici și mijlocii (90-100 nm) (1). Există 55 serotipuri care pot produce îmbolnăviri la om (2).

Legătura dintre adenovirus și boala celiacă datează din anul 1984 când Kagnoff și colab. (3) au vorbit de un posibil rol al adenovirusului uman serotip 12 (Ad12), izolat din tractul intestinal, în patogeneza bolii celiace, fapt demonstrat de o regiune de omologie a gliadinei A cu secvența de aminoacizi cu proteina 54 kD E1B a acestuia. 3 ani mai târziu într-un studiu efectuat pe pacienți cu boală celiacă din Marea Britanie și S.U.A. aceiași autori (4) relevă faptul că 89% din pacienții cu boală celiacă netratată au prezentat în antecedente o infecție cu Ad12 și nu au găsit nici o prevalență crescută pentru o infecție cu alt adenovirus uman, adenovirus 18, sau un alt virus enteric, Echovirus 11, printre subiecții cu boală celiacă. În anul 1989 Howdle și colab. (5), pe un lot de 23 pacienți cu boală celiacă și 10 subiecții normali au căutat să măsoare anticorpii specifici la proteina E1B-58-kDa a Ad12, prin radioimunoprecipitare urmată de separarea pe geluri de poliacrilamidă dar nu au găsit nici o dovadă a prezenței acestei proteine.

Totuși cercetările au mers mai departe și un an mai târziu Mantzaris și colab. (6), pornind de la faptul că celulele mononucleare din sângele periferic de la pacienții cu boală celiacă tratată sunt cunoscute pentru a elibera factor de inhibiție al migrației leucocitelor în prezența proteinei E1B a Ad12, au comparat răspunsul nefracționat al celulelor mononucleare din sângele periferic, cu o populație purificată de celule T. Celulele mononucleare celiace și limfocitele T au arătat activitate identică în inhibarea migrației leucocitelor, oferind astfel dovezi suplimentare pentru posibila implicare a Ad12 în patogeneza bolii celiace. Aceiași autori (7), pe un lot de 22 pacienți cu boală celiacă tratată, 8 pacienți cu boală celiacă netratată și 22 subiecți sănătoși nu au observat nici un răspuns la peptidele virale la pacienții netratați comparativ cu cei tratați ($p > 0,1$) dar au observat un răspuns semnificativ statistic la pacienții cu boală celiacă tratată, diferit de subiecții de control sănătoși ($p < 0,001$), care a fost dependent de concentrația de peptide virale. Implicarea Ad 12 în dezvoltarea bolii celiace a fost studiată mult pe probele de biopsie duodenală (8) dar fără o dovadă a implicării Ad 12 în patogeneza bolii celiace. Mahon și colab. (9), în ADN-ul din probele de biopsie duodenală de la 18 pacienți cu boală celiacă și

24 de subiecți sănătoși, au analizat Ad 12 prin polymerase chain reaction (PCR) pentru proteina E1B-58 kDa și au obținut rezultate pozitive la 4 din cei 18 pacienți cu boală celiacă și la 2 din cei 24 de pacienți subiecți sănătoși. Vesey și colab. (10), în probele de biopsie duodenală de la pacienții cu boală celiacă, 19 copii și 19 adulți, prin PCR au găsit implicarea Ad 12 la două din cele 19 biopsii de la adulți în timp ce la copii nu a fost găsită nici o implicare a acestuia. Lawler și colab. (11) au detectat un nivel relativ ridicat al Ad 12 la probele de biopsie duodenală de la subiecții adulți normali, 5 din 16. Astăzi toate aceste studii sunt reiterate (12), ca dovadă a importanței înțelegerii relației dintre agenții virali și auto-imunitate.

În România, studii asupra implicării adenovirusului în patogeneza bolii celiace nu au fost efectuate. Scopul nostru a fost de a determina prezența IgA-AcAd, utilizat în mod uzual în laboratoarele clinice, în boala celiacă netratată și tratată la copil și de a căuta astfel o dovadă a implicării și a altor subtipuri de adenovirus în patogeneza bolii celiace.

MATERIAL ȘI METODĂ

Pacienți

Lotul pe care s-a efectuat studiul a cuprins 80 de pacienți cu boală celiacă. Studiul s-a desfășurat pe parcursul anului 2010 iar probele au fost păstrate la -20°C până la testare. Pacienții au fost testați în cadrul Laboratorului Clinic de Imunologie și Gastroenterologie din cadrul Spitalului Clinic de Urgență pentru Copii Cluj-Napoca pentru evidențierea IgA-AcAd prin ELISA.

Diagnosticul bolii celiace s-a făcut pe baza screeningului serologic cu IgA anticorpii anti-transglutaminază tisulară (IgA-TgA) și cu IgA anticorpii anti-endomisium (IgA-EmA) urmat de confirmarea rezultatelor pozitive ale acestora prin examenul histopatologic al biopsiei duodenale, standardul de aur în diagnosticul bolii celiace, respectiv pe baza prezenței vilozităților intestinale aplatizate.

În lotul studiat, distribuția pe sexe a fost: 34% băieți și 66% fete.

Metodă

Pentru determinarea IgA-AcAd s-au folosit kituri ELISA produse de r-biopharm (Germania). Anticorpi IgA furnizează informații despre o posibilă colonizare a mucoaselor cu adenovirusuri. Un titru ridicat de

IgA, prin urmare, indică o infecție acută. În cazuri izolate, titrurile de IgA pot, de asemenea, persista o perioadă lungă de timp. Kitul utilizat a prezentat sensibilitate 100% și specificitate 98%. Serurile lipemice, hemolitice și icterice au fost evitate în cursul testării. Metoda a prezentat un cut-off de 16 U/ml, probele cu concentrație mai mare ca aceasta fiind considerate pozitive. Probele au fost testate în conformitate cu recomandările producătorului, pe analizorul automat Elisa Chem Well 2910 Awareness Technology Inc. Rezultatele obținute, cantitative, au fost validate după verificarea controlului intern al calității.

Placa ELISA pentru determinarea IgA-AcAd conține extract proteic de antigen hexonic purificat, specific de grup, ceea ce permite detectarea anticorpilor împotriva unor subtipuri diferite. Anticorpilor din probele pacienților se leagă de antigene și sunt determinați în timpul celei de-a 2-a etape de incubare, folosind anticorpi anti-umani marcați cu enzimă (conjugat). Enzima transformă substratul în color (H₂O₂/TMB), la un produs final albastru. Reacția enzimatică este oprită prin adăugarea de acid sulfuric iar culoarea mixturii trece de la albastru la galben. Măsurarea finală se efectuează la 450 nm pe un fotometru, folosind o lungime de undă de referință ≥ 620 nm.

Kiturile pentru determinarea bolii celiace prin reacții imunoenzimice, respectiv IgA-TgA, și prin reacții de imunofluorescență indirectă, respectiv IgA-EmA, au fost furnizate de Inova Diagnostics Inc. (San Diego, SUA).

Analiza statistică

Cuantificarea asocierii datelor s-a făcut prin testul exact al lui Fisher. Testele aplicate au fost semnificative statistic la un nivel de semnificație ales $p < 0.05$. Analiza statistică a urmărit lucrul pe grupe de vârstă sub 4 ani, între 4-10 ani, peste 10 ani și evaluarea pacienților în funcție de stadiul bolii celiace: pacienți cu valori negative ale IgA-TgA, pacienți cu valori sub 100 U/ml ale IgA-TgA și pacienții cu valori peste 100 U/ml ale IgA-TgA.

REZULTATE

I. Caracteristicile demografice ale subiecților

Pacienții au provenit din Centrul Regional pentru Managementul Bolii Celiace la Copil Cluj, organizat în structura Spitalului Clinic de Urgență pentru Copii Cluj-Napoca, Clinica Pediatrie II, pentru județele: Cluj, Satu Mare, Maramureș, Bihor, Sălaj, Bistrița, Mureș, Harghita, Covasna, Brașov, Sibiu și Alba.

II. Prevalența activității virale serologice a Ad-IgA

Prin determinarea valorii serice a IgA-AcAd per ansamblul lotului nostru am constatat o prezență a acestuia la 31,2% dintre pacienți, dintre care 25% au avut o activitate moderată a IgA-AcAd iar 6,25% au avut o activitate accentuată a IgA-AcAd (Figura 1).

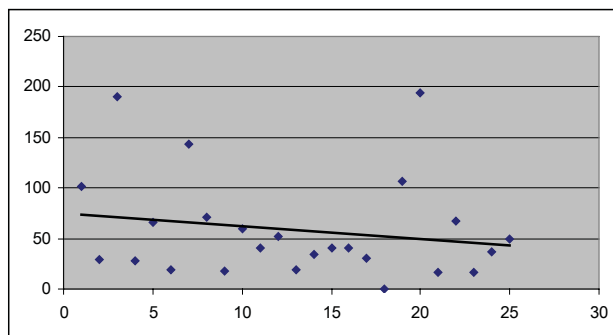


FIGURA 1. Rezultatele dozării IgA-AcAd
Legendă: x-pacienți; y-valori ale IgA-AcAd (U/ml).

III. Analiza valorilor pozitive

Analiza valorilor pozitive ale IgA-AcAd relevă faptul că acestea apar la pacienții de sex feminin, vârsta de apariție fiind între 6-9 ani. Se observă o scădere a procentului de IgA-AcAd pe măsura înaintării în vârstă (Figura 2).

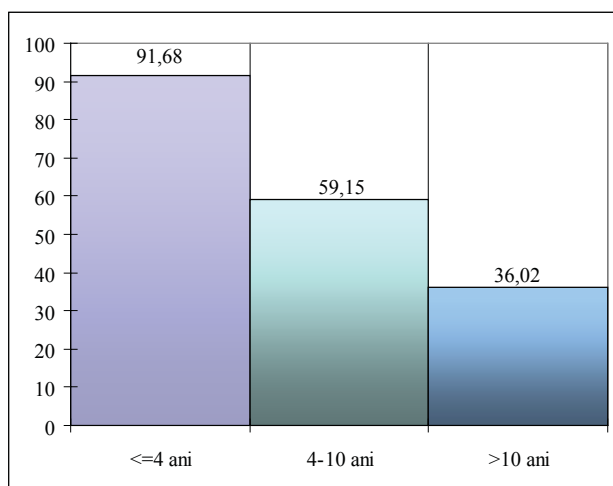


FIGURA 2. Distribuția valorilor pozitive ale IgA-AcAd în corelație cu vârsta pacienților
Legendă x-grupe de vârstă; y-valoarea medie a IgA-AcAd (U/ml). Se observă că pe măsura înaintării în vârstă activitatea IgA-AcAd scade ($p=0.001$).

De asemenea se observă o valoare medie a IgA-AcAd de 64.4 U/ml la pacienții cu valori negative ale IgA-TgA, 36.2 U/ml la pacienții cu valori sub 100 U/

ml ale IgA-TgA și 72.4 U/ml la pacienții cu valori peste 100 U/ml ale IgA-TgA (Figura 3).

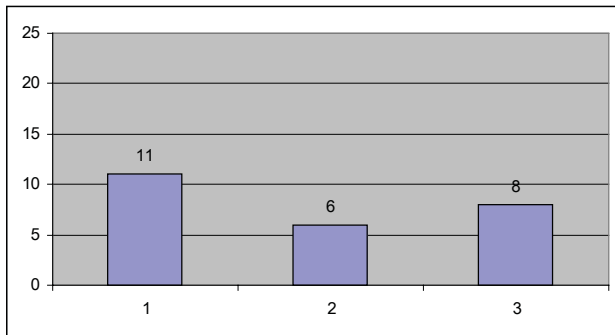


FIGURA 3. Distribuția pacienților pozitivi pentru IgA-AcAd în corelație cu stadiul bolii celiace

Legendă x- (1) lot pacienți cu IgA-TgA negativi, (2) lot pacienți cu IgA-TgA < 100 U/ml, (3) lot pacienți cu IgA-TgA > 100 U/ml; y-total pacienți pozitivi pentru IgA-AcAd.

IV. Corelația manifestărilor serologice virale ale Ad-IgA cu boala celiacă

Analiza corelațiilor lotului per ansamblu ne relevă valori ale testului exact al lui Fisher $p=0.64$ între IgA-AcAd și IgA-TgA și $p=0.13$ între IgA-AcAd și IgA-EmA.

Analiza corelațiilor IgA-AcAd în funcție de de valorile IgA-TgA ne relevă:

- lipsa corelațiilor la pacienții cu valori negative ale IgA-TgA;
- valori ale testului exact al lui Fisher $p=0.4$ între IgA-AcAd și IgA-TgA și $p=0.002$ între IgA-AcAd și IgA-EmA la pacienții cu valori < 100 U/ml ale IgA-TgA;
- valori ale testului exact al lui Fisher $p=0.52$ între IgA-AcAd și IgA-TgA și $p=0.45$ între IgA-AcAd și IgA-EmA la pacienții cu valori > 100 U/ml ale IgA-TgA.

Analiza relației între IgA-AcAd și IgA-EmA la pacienții cu valori sub 100 U/ml ale IgA-TgA ne relevă faptul că din cei 6 pacienți cu boală celiacă cu valori pozitive încadrate în această grupă, 5 pacienți au prezentat boală celiacă veche fiind monitorizați pentru respectarea regimului fără gluten dar cu lipsa semnelor clinice pentru o infecție cu adenovirus.

DISCUȚII

Analiza statistică a corelațiilor IgA-AcAd cu teste serologice specifice bolii celiace ne relevă valori semnificative statistic $p=0.002$, cu IgA-EmA, la pacienții

cu valori sub 100 U/ml ale IgA-TgA. Asocierea subtipurilor de adenovirus analizate cu boala celiacă, în cursul tratamentului fără gluten, nu a mai fost raportată anterior.

De ce s-a făcut analiza valorilor IgA-AcAd în funcție de valorile IgA-TgA sub 100 U/ml și peste 100 U/ml? Reactivitatea de peste 100 unități a IgA-TgA a fost întotdeauna legată de modificările histologice ale biopsiilor intestinale, respectiv cu faza activă a bolii celiace (13), astfel încât unele studii recente recomandă renunțarea la efectuarea biopsiei intestinale la pacienții cu niveluri ridicate ale IgA-TgA (14). Astfel, în studiul nostru, în lipsa asocierilor la pacienții cu valori peste 100 U/ml, am exclus prezența adenovirusului în faza activă a bolii celiace.

Adenovirusurile cel mai frecvent pot cauza boli respiratorii, dar, în funcție de serotip, acestea pot provoca, de asemenea, diverse alte boli, cum ar fi gastroenterita, conjunctivita, cistita, boli și erupții cutanate (15). De ce este important studiul adenovirusurilor? Producătorul kitului ne recomandă utilizarea acestuia în scopul de confirmare a unui caz suspectat de infecție cu adenovirus sau pentru clarificarea statutului imun. În lipsa semnelor clinice mai sus amintite, la pacienții noștri cu valori peste 100 U/ml la care am găsit asocieri semnificative statistic cu IgA-AcAd ($p=0.002$), am mers pe ideea utilizării adenovirusului pentru clarificarea statusului imun al pacienților. Implicarea agenților infecțioși în patogeniza multor boli autoimune prin diferite mecanisme patogene, cum ar fi mimetism molecular, prin care rezultă modularea toleranței imunitare a gazdei, a rămas multă vreme la nivel speculativ (16). Astăzi, adenovirusul a fost recunoscut ca o cauză semnificativă de morbiditate la persoanele imunocompetente care trăiesc în condiții de trai aglomerate și de mortalitate la gazdele imunocompromise (17). Pacienții cu sistemul imunitar compromis sunt mai predispuși la complicații severe de infecție cu adenovirus (18). Cum se explică fenomenul? Boala celiacă este cunoscută ca o dereglare a răspunsului imun la gluten. Datorită secvenței de omologie E1B-58-kDa a adenovirusului cu gliadina-A, HLA-DQ recunoaște ca self adenovirusul care duce la o accentuare a dereglării răspunsului imun, fenomen însoțit de complicații severe, mai sus amintite, practic organismul se autodistruge (16).

Ca posibile atitudini practice de viitor. Plot și colab. (19) arătau că implicarea anumitor infecții cum ar fi *Toxoplasma gondii*, *Treponema pallidum*, virusul rubeolei, virusul citomegalic sau virusul Epstein-Barr poate genera un mediu imunologic care să defavorizeze pe viitor apariția unor condiții autoimune, cum ar fi boala celiacă. Pe de altă parte, relativ recent au fost descoperite unele gene legate de apărarea sistemului

imunitar uman împotriva virusurilor (20) și astfel de prevenire a apariției bolii celiace dar autorii subliniază faptul că o cercetare mai aprofundată este necesară pentru a stabili relațiile de cauzalitate ale bolii celiace cu mecanismele lor funcționale.

CONCLUZII

Acest studiu arată o prezență crescută 31,2% a IgA-AcAd, lipsa corelațiilor dintre faza activă a bolii celiace

și adenovirusuri și o relație de asociere semnificativă statistic ($p=0.002$) între IgA-AcAd și pacienții cu boala celiacă cu regim fără gluten, respectiv cu faza de regresie și vindecare a bolii celiace. Lipsa semnelor clinice, respectiv a manifestărilor IgA-AcAd la pacienții cu valori ale TgA-IgA < 100 U/ml, ne relevă faptul ca acesta ar putea fi folosit ca marker al exacerbărilor autoimune în cursul tratamentului fără gluten al bolii celiace.

BIBLIOGRAFIE

1. **Martin, Malcolm A.; Knipe, David M.; Fields, Bernard N.; Howley, Peter M.; Griffin, Diane; Lamb, Robert.** Fields' virology. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins. 2007 pp 2395.
2. **Harrison, S. C.** "Virology. Looking inside adenovirus". *Science* 2010; 329(5995): 1026–1027.
3. **Kagnoff MF, Austin RK, Hubert JJ, Bernardin JE, Kasarda DD.** Possible role for a human adenovirus in the pathogenesis of celiac disease. *J Exp Med* 1984; 160(5):1544-1557.
4. **Kagnoff MF, Paterson YJ, Kumar PJ, Kasarda DD, Carbone FR, Unsworth DJ, Austin RK.** Evidence for the role of a human intestinal adenovirus in the pathogenesis of coeliac disease. *Gut* 1987; 28(8):995-1001.
5. **Howdle PD, Blair Zajdel ME, Smart CJ, Trejdosiewicz LK, Blair GE, Losowky MS.** Lack of a serologic response to an E1B protein of adenovirus 12 in coeliac disease. *Scand J Gastroenterol* 1989; 24(3):282-286.
6. **Mantzaris GJ, Karagiannis JA, Priddle JD, Jewell DP.** Cellular hypersensitivity to a synthetic dodecapeptide derived from human adenovirus 12 which resembles a sequence of A-gliadin in patients with coeliac disease. *Gut* 1990; 31(6):668-673.
7. **Mantzaris GJ, Priddle JD, Jewell DP.** T lymphocyte responses to a synthetic peptide from the human intestinal adenovirus 12 in coeliac disease. *J Clin Lab Immunol* 1990; 31(2):75-79.
8. **Carter MJ, Willcocks MM, Mitchison HC, Record CO, Madeley CR** Is a persistent adenovirus infection involved in coeliac disease? *Gut* 1989; 30(11):1563-1567.
9. **Mahon J, Blair GE, Wood GM, Scott BB, Losowsky MS, Howdle PD.** Is persistent adenovirus 12 infection involved in coeliac disease? A search for viral DNA using the polymerase chain reaction. *Gut* 1991; 32(10):1114-1116.
10. **Vesy CJ, Greenson JK, Papp AC, Snyder PJ, Qualman SJ, Prior TW.** Evaluation of celiac disease biopsies for adenovirus 12 DNA using a multiplex polymerase chain reaction. *Mod Pathol* 1993; 6(1):61-64.
11. **Lawler M, Humphries P, O'Farrelly C, Hoey H, Sheils O, Jeffers M, et al.** Adenovirus 12 E1A gene detection by polymerase chain reaction in both the normal and coeliac duodenum. *Gut* 1994; 35(9):1226-1232.
12. **Plot L, Amital H.** Infectious associations of Celiac disease. *Autoimmun Rev* 2009; 8(4):316-319.
13. **Abrantes-Lemos CP, Nakhle MC, Damiao AO et al.** Performance of two commercial ELISAs for detecting IgA anti-human and anti-guinea pig tissue transglutaminase antibodies. *Clin Lab* 2010; 56:29-35.
14. **Vivas S, Ruiz de Morales JG, Riestra S et al.** Duodenal biopsy may be avoided when high transglutaminase antibody titers are present. *World J Gastroenterol* 2009; 15:4775-4780.
15. **Wold WSM, Horwitz MS.** Adenoviruses. In: **Fields BN, Knipe DM, Howley PM,** eds. Fields Virology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 2007: 2395-2436.
16. **Barbeau WE, Novascone MA, Elgert KD.** Is celiac disease due to molecular mimicry between gliadin peptide-HLA class II molecule-T cell interactions and those of some unidentified superantigen? *Mol Immunol* 1997; 34(7):535-541.
17. **Nazir SA, Metcalf JP.** Innate immune response to adenovirus. *J Investig Med* 2005; 53: 292-304.
18. **American Academy of Pediatrics.** Adenovirus Infections. In: Pickering LK, Baker CJ, Kimberlin DW, Long SS, eds. 2009 Red Book: Report of the Committee on Infectious Diseases. 28th ed. Elk Grove Village, IL: American Academy of Pediatrics; 2009: 204-206.
19. **Plot L, Amital H, Barzilai O, Ram M, Nicola B, Shoenfeld Y.** Infections may have a protective role in the etiopathogenesis of celiac disease. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1173:670-674.
20. **Dubois PC, Trynka G, Franke L, Hunt KA, Romanos J, Curtotti A et al.** Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression. *Nat Genet* 2010; 42(4):295-302.