

FACTORI GENETICI ÎN SEPSISUL COPILULUI

Prof. Dr. Sorin Buzinski

Spitalul de Copii Braşov, Facultatea de Medicină, Universitatea Transilvania, Braşov

REZUMAT

Amprenta genetică deţine o pondere importantă în apariţia, evoluţia şi prognosticul infecţiilor. Sunt prezentate polimorfismele pentru un singur nucleotid (SNPs) al genelor care codează proteinele cu rol principal în recunoaşterea patogenilor (Toll-like receptors: TLR2, TLR4, TLR5) sau în răspunsul inflamator (TNF α , IL6, IL10) şi care determină gravitatea şi tipurile de infecţii. Configuraţia alelică reprezintă un element important de risc pentru corioamniotită, prematuritate, sepsis şi deces, dar poate fi un factor de creştere a rezistenţei la infecţii comune. Imunodepresia postseptică influenţează decesul tardiv al copiilor care au suferit de şoc infecţios.

Cuvinte cheie: polimorfism genetic, infecţii, risc de deces

FACTORI GENETICI ÎN SEPSISUL COPILULUI

Sepsisul reprezintă o manifestare a răspunsului inflamator sistemic generat de o infecţie. În forma sa severă produce disfuncţie organică generalizată, tulburări de perfuzie periferică, hipotensiune, compromiterea energogenezei tisulare şi deces. În infecţiile severe ale prematurului rata deceselor se situează între 20-50% (1). La adulţi mortalitatea în sepsisul sever variază în SUA între 20-70%, cu o încărcătură financiară de 50.000 de dolari per bolnav (2). Ipoteze recente consideră că modul de prezentare clinică, răspunsul la tratament, sechelele postinfecţioase, evoluţia severă şi mortalitatea sunt influenţate de variaţiile individuale ale fondului genetic (3-7). În practica clinică unii copii prezentaţi în serviciile UPU cu pneumonie comunitară prezintă forme uşoare şi pot fi trataţi la domiciliu, pe când alţii afectaţi de aceiaşi germeni prezintă insuficienţă respiratorie severă şi şoc septic. În condiţii de tratament similar majoritatea bolnavilor care prezintă sepsis evoluează favorabil, însă un procent mic dar semnificativ se agravează (uneori neaşteptat) cu insuficienţă multiplă de organe şi deces. Factorii de evoluţie nefavorabilă consideraţi au fost virulenţa germenilor, accesul tardiv la tratament, patologia asociată, însă suspiciunea vizând

calitatea îngrijirilor a fost frecvent invocată. Primele semne de întrebare privind cauzele profunde ale acestor evoluţii au fost iniţiate de Sorensen şi col (8-9). Folosind datele din Registrul Danez de Adopţii, autorii au constatat că subiecţii adoptaţi prezintă un risc de 5 ori mai mare de decese prin infecţii dacă părintele biologic a murit de o infecţie înainte de a împlini 50 de ani. Date concordante asupra gemenilor monoziгоţi arată că există o componentă genetică ce îi expune în mod similar la infecţii şi deces (10). În anumite afecţiuni ca tuberculoza, lepra, infecţia cu *Helicobacter pylori*, infecţia cronică cu virusul hepatitei B, ca şi răspunsul fenotipic la vaccinări, se manifestă o mare concordanţă la gemenii monoziгоţi faţă de perechile dizigote (11). Prin studiile aprofundate asupra genomului uman (**whole genome association study**) s-a evidenţiat variabilitatea enormă genetică a populaţiilor, numeroase gene fiind polimorfice prin mici diferenţe în secvenţa lor de nucleotide (16). În corelaţie cu datele de epidemiologie genetică s-au desfăşurat studii de biologie moleculară centrate pe polimorfismul pentru un singur nucleotid (SNPs) ca explicaţie pentru creşterea riscului vital în cursul infecţiilor. Polimorfismul genetic influenţează atât susceptibilitatea, cât şi rezistenţa la infecţii.

Adresa de corespondenţă:

Prof. Dr. Sorin Buzinski, Spitalul de Copii Braşov, Facultatea de Medicină, Universitatea Transilvania, Str. Nicopole Nr. 45, Braşov
e-mail: sbuzinski@yahoo.com

Cunoașterea factorilor genetici cu impact major în apariția și evoluția sepsisului poate ajuta clinicianul să înțeleagă modalitatea de evoluție a sepsisului în secțiile de terapie intensivă neonatală, pediatrică sau de adulți, aplicând măsuri terapeutice diferențiate. Trebuie menționat că majoritatea datelor asupra SNPs au fost colectate de la adulți sau copii; acestea pot să nu fie integral concordante cu cele ale prematurilor datorită reglării în dezvoltare a exprimării genelor (12). Din această cauză studiile efectuate la nou-născuții la termen sau prematuri, deși puține la număr, prezintă o valoare informațională ridicată.

SISTEMUL IMUN ÎNNĂSCUT LA NOU-NĂSCUȚI ȘI COPII

Sistemul imun fetal se dezvoltă într-un mediu steril și protejat, coexistând cu sistemul imun matern. Nou-născutul se bazează în relația sa cu mediul pe sistemul imun înăscut. Competența imună crește prin dezvoltarea progresivă a răspunsului imun adaptativ. Imunitatea înăscută neonatală este funcțională **înainte** de expunerea microbiană prin (13, 14): barierele de suprafață (piele, mucoase), celule imune „santinela”, sistemul de recunoaștere a patogenilor, proteine cu acțiune proinflamatorie, proteine/peptide de apărare a gazdei și prin imunoglobuline primite de la mamă. Imunoglobulinele de tip IgG sunt transportate activ prin placentă, concentrațiile lor la nou-născutul la termen fiind comparabile sau chiar crescute față de nivelul din sângele matern. La prematuri, nivelul imunoglobulinelor transferate este scăzut direct proporțional cu vârsta gestațională. Răspunsurile prin sistemul imun înăscut funcțional la toate vârstele, permit gazdei să **recunoască patogenii** și să producă un **răspuns inflamator** rapid care include producția de citochine, chemochine și molecule efectoare (15). Cele 2 componente funcționale ale sistemului imun înăscut utilizează un mare număr de receptori, proteine accesorii, molecule semnal și factori transcripționali implicați în sinteza proteică. Baza moleculară a acestor procese o constituie expresia unor gene care conduc la sinteza unor proteine ce determină răspunsul la antigen. Predispoziția genetică în sepsis se manifestă atât în faza de recunoaștere a antigenului, cât și în faza de răspuns a organismului, fiind diferențiate polimorfisme ale genelor care codează proteinele implicate în recunoașterea patogenilor și polimorfisme genetice ale factorilor răspunsului inflamator. **Altfel spus, susceptibilitatea pentru infecții este controlată genetic** (11).

Detalierea genetică a acestor polimorfisme depășește granițele pediatriei și reduce posibilitatea

de a avea o privire globală asupra acestui subiect și așa complicat.

ETAPELE RĂSPUNSULUI INFLAMATOR

Identificarea patogenilor invadatori se bazează pe receptorii de recunoaștere de la suprafața celulelor (1,17-19) numiți Toll-like receptors (TLR). După cuplarea TLR cu molecule ale agentului infecțios se produc semnale celulare semnificative care duc la activarea factorului nuclear NFκB. Acesta prin accesul la „biblioteca” ADN permite activarea transcripției genelor care produc citochine și alți efectori imunitari care inițiază mecanismele de acțiune antimicrobiene. Se intensifică, de asemenea, producția de proteine ale complementului și de coagulare. Într-o etapă ulterioară intervin citochinele antiinflamatoare care readuc la nivelul bazal nivelul citochinelor și inițiază repararea tisulară. Sepsisul sever rezultă din deplasarea balanței dintre citochine antagoniste în favoarea celor proinflamatorii sau prin stimularea masivă și prelungită exercitată de agentul infecțios.

SENZORII RĂSPUNSULUI INFLAMATOR

TLRs sunt distribuiți pe suprafața macrofagelor, a celulelor dendritice și a neutrofilelor. Spre deosebire de receptorii celulelor B și T care sunt într-o continuă schimbare, TLRs nu se modifică, fiind conservați evolutiv pentru recunoașterea antigenilor bacterieni ca lipopolizaharidul (LPS), flagelina bacteriană, ARN-ul viral sau secvențe din ADN-ul viral. LPS, componentul major al peretelui celular al germenilor Gram negativi este stimulatorul cel mai puternic al răspunsului imun înăscut (6). TLR2 și TLR4 joacă un rol central în recunoașterea componentelor germenilor gram-pozitivi și gram-negativi (5).

TLR2 recunoaște compușii bacteriilor Gram + ca peptidoglican, acid lipoteichoic și unele lipoproteine. Polimorfismele TLR2 constituie un factor de risc în infecțiile cu aceste bacterii, așa cum arată unele studii asupra unor bolnavi cu infecții severe cu *Staphylococcus aureus* (16). Studii experimentale asupra enterocolitei necrozante au pus în evidență creșterea expresiei TLR2, TLR4 și a factorului NFκB în epiteliul intestinal înainte de constituirea leziunilor histologice (14).

TLR4 produce semnale pentru un răspuns proinflamator în infecțiile cu germeni Gram-, factorul inductor fiind prezența LPS. Polimorfismele TLR4 au fost corelate cu sepsisul/șocul septic cu germeni Gram- și mortalitate ridicată la nou-născuți și pre-

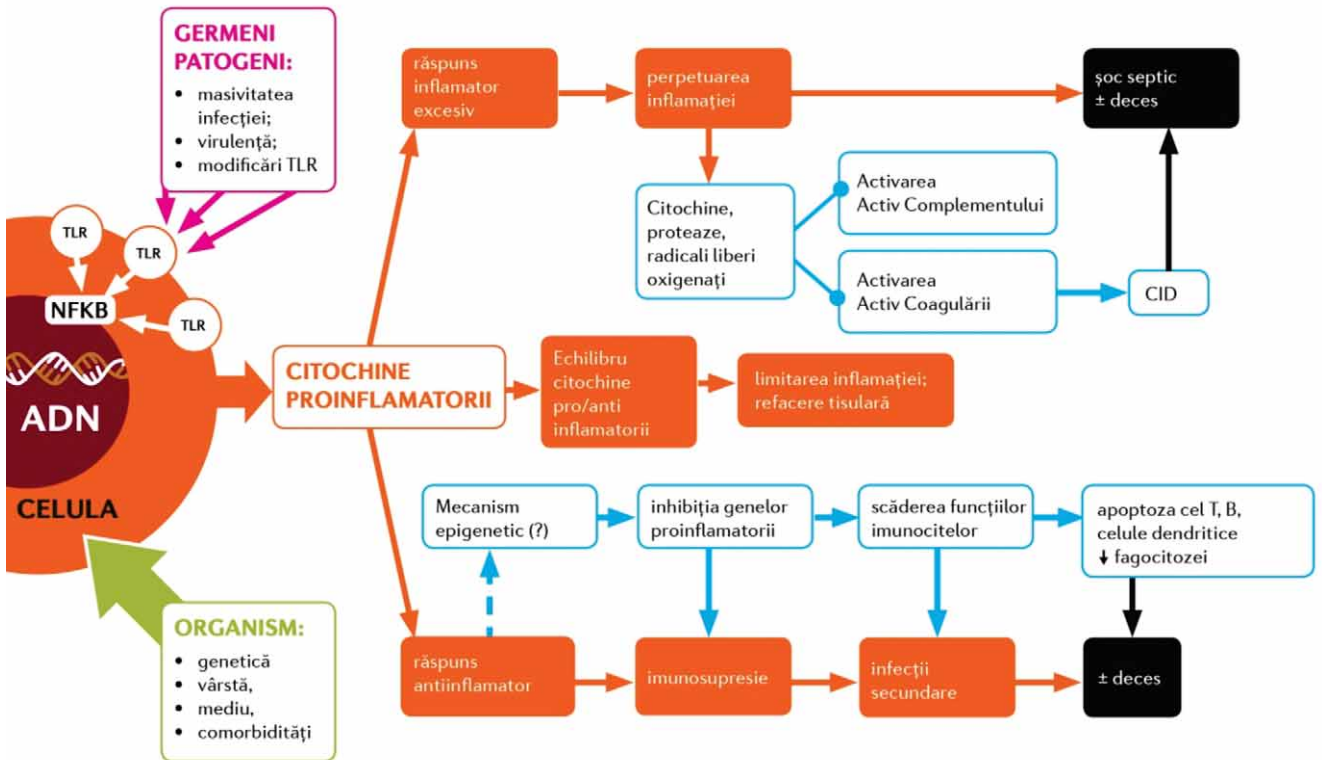


FIGURA 1. Răspunsul organismului în șoc septic. (Angus și col, modificat) (43)

maturi. Se notează susceptibilitatea crescută pentru infecțiile cu bacterii Gram-, frecvența ridicată a șocului septic și gravitatea răspunsului inflamator sistemic (5). TLR4 are capacitatea de a recunoaște proteine specifice ale virusului sincițial respirator (33).

TLR5 recunoaște flagelina bacteriană; contribuie la activarea NFκB și eliberarea de citochine proinflamatorii. Într-un studiu pe 535 de prematuri, Maziad și col (17) au examinat rolul SNPs al genelor care mediază răspunsul imun la infecții bacteriene. Între alte configurații genetice, SNP pentru TLR5

s-a corelat cu infecții cu E coli sau Ps aeruginosa, ambii germenii flagelați.

CONFIGURAȚIA TLRs LA NOU-NĂSCUȚI ȘI PREMaturi

Evoluția severă a infecțiilor în perioada neonatală poate fi atribuită inexistenței memoriei imunologice, a unei imunități adaptative competente și datorită heterogenității genetice, la care se adaugă prematuritatea, malformațiile cardiace sau suferința neurologică (34).

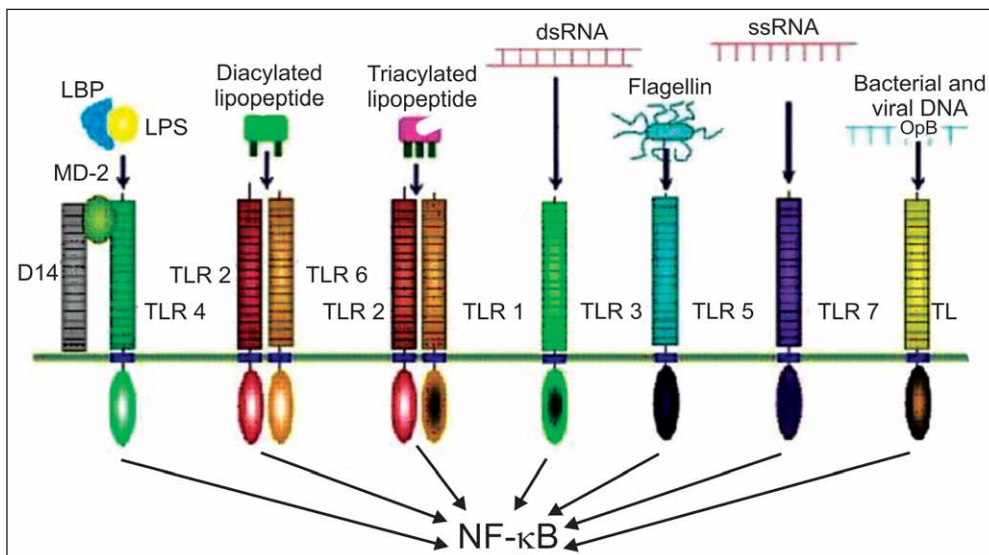


FIGURA 2. TLRs și activarea lor diferențiată în funcție de moleculele specifice microbiene

Studiile asupra monocitelor la VLBW au pus în evidență scăderea expresiei pe suprafața monocitelor a TLR4, diminuarea activării factorului nuclear NFκB și a producției de citochine. Polimorfismul TLR5 ar putea avea un rol în producerea nașterilor premature alături de alte polimorfisme ca TLR2, TLR4, TLR10 prin favorizarea corioamniotitei (17,20). Infecția „in utero” favorizată de aceste polimorfisme este un factor de risc important pentru sepsisul cu debut precoce, în jur de 80% dintre nașterile premature sub 30 de săptămâni fiind legate de infecții intrauterine.

TABELUL 1. Efecte ale unor polimorfisme genetice în sepsisul neonatal

Autori	Polimorfisme	Efecte în sepsisul neonatal
Ahrens și col (21)	TLR4, D14, NOD2, IL6	IL6, modificări predictive pentru sepsis cu Gr+; allelele NOD2 și IL6, incidența ridicată sepsis la VLBW
Lorenz și col, 2002 (22)	TLR4	Risc crescut sepsis Gr-; risc naștere prematură
Zhang și col, 2007 (23)	TLR2, TLR4	TLR2 corelație cu sepsis cu Gr+; TLR4 cu sepsis Gr-
Krediet și col, 2007 (24)	TLR2, TLR4	TLR2 răspuns imun aberant la naștere
Kollman și col, 2009 (45)	TLRs, IL-1β, IL6, IL-23, IL-10	Capacitate scăzută pentru răspuns față de adult
Maziad și col, 2010 (17)	TLRs, CD14, IL-6, IL-10, IL-1β, TNF-α	Genele TLR2, TLR5, PLA2, IL-10 asociate cu sepsis Variații TLR2, PLA2, infecții Gr+, IL-10 infecții Gr-

Microorganismele care produc infecții vaginale sau ale lichidului amniotic declanșează producția citochinelor și a peptidelor antimicrobiene care sunt implicate în nașterea prematură și/sau ruperea precoce a membranelor. Deși infecțiile sunt un factor declanșator important, modificarea cascadei inflamatorii prin polimorfisme ale genelor TLR4, IL-1β, IL4, IL-10, IL-1ra, TNF-α, poate fi considerată una din premisele genetice ale nașterii premature (19).

VARIAȚII GENETICE ALE GENELOR IMPLICATE ÎN RĂSPUNSUL GAZDEI LA PATOGENI

Recunoașterea patogenilor implică intervenția coordonată a unui număr de citochine și chemochine care determină un răspuns dual:

- creșterea citochinelor proinflamatorii ca TNF-α, IL-1, IL-6;
- ulterior, eliberarea citochinelor antiinflamatorii ca IL-10, IL-17, IL-23.

TNF-α joacă un rol cheie în patogenia răspunsului inflamator acut. Pe lângă efectul declanșator

al cascadei inflamației, i s-a atribuit un rol important în apariția hipotensiunii arteriale, stagnerii capilare, detresei respiratorii de tip adult, insuficienței multiorganice din șocul avansat (1,6,16). Au fost identificate unele SNPs ale genelor care codează TNF-α având ca rezultat creșterea producției acestora din macrofage după stimulare cu LPS „in vitro” (25). În condiții experimentale concentrația TNF-α crește de 24 de ori la 2 ore de la inoculare de LPS cu eliberare subsecventă de citochine proinflamatorii (26). Studiile clinice au arătat ca prezența alelei TNF-α-308A, asimilată ca **genotip hipersecretor**, crește riscul de deces de 3,7 ori la adulții cu șoc septic față de cei care nu au această variantă (27). Aceste rezultate au fost confirmate în meningococemia copilului, pneumonia comunitară la adulți, dar și în boala Kawasaki, malaria cerebrală, infecții severe la bolnavii cu HIV (6). Prezența polimorfismului bialelic pentru TNF-α la bolnavii adulți în șoc septic postchirurgical s-a soldat cu o mortalitate extrem de ridicată (92% vs 62%) (28). (Tabelul 2)

IL-6 este o citochină atât proinflamatorie, cât și antiinflamatorie, în funcție de momentul când intervine în lanțul de modificări ale procesului infecțios. Ca citochină proinflamatorie, IL-6 mediază apariția febrei și a reactanților de fază acută, stimulează efectele limfocitelor B și T. Prin acțiunea sa imunomodulatoare asigură tranziția de la populațiile de leucocite la cele de monocite, adică trecerea de la imunitatea înăscută la cea câștigată. Prezența unor alele (IL6-174G) în stare homozigotă s-a dovedit predictivă pentru apariția sepsisului cu germeni Gram +. IL-6 a fost implicată în sepsisul meningococic, unde intervine ca factor major în disfuncția miocardică (31). Într-un studiu pe nou-născuți VLBW purtători ai alelei IL6-174G care au primit tratament profilactic cu teicoplanin (targocid), rata infecțiilor bacteriene cu germeni Gram+ a fost de 2,4% față de grupul netratat la care incidența s-a ridicat la 16,6% (18,21). Aceste date sugerează că screeningul pentru alela IL6-174G poate fi considerată o bază pentru profilaxia selectivă la nou-născuții cu risc ridicat.

IL-10, citochina antiinflamatorie produsă de monocite, diminuează expresia unor citochine ca TNF-α, IL-1α, IL-1β, IL-6, IL-8 și a celulelor T helper (1), scade răspunsul inflamator și contribuie la protecția organismului față de efectele distructive ale mediatorilor inflamației (16). Superexpresia IL-10 induce imunosupresie în sepsisul bacterian și crește mortalitatea prin inhibiția clearance-ului microbial (6).

Au fost descrise numeroase polimorfisme ale altor factori implicați în răspunsul inflamator local

și sistemic: Mannose Binding Lectin, IL-1/IL-1RA, Bactericidal Permeability Increasing Protein (BPI), Heat Shock Proteins (HSP), Angiotensin I Converting Enzyme, Interferon-gamma, Proteina C, fibrinogen, Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) (1,4,6,13,16,19,21) (Tabelul 2.)

TABELUL 2. Sumar al principalelor polimorfisme genetice implicate în sepsis (4-6, 16)

Gena	Polimorfism	Frecvența alelelor	Consecințe
TLR2	-16933 T/A		Bacteriemie, sepsis, șoc septic Germei Gram + (St aureus)
TLR4	299 A/G, 399 T/I	5%	Sepsis, șoc septic germei gr – Răspuns inflamator sever
TLR5	392 A/T	7,5%	Infecții E coli, Ps aeruginosa Favor corioamniotita, nașteri premature
TNF α	TNF α 308A	18%	Susceptibilitate și mortalitate în șocul septic, meningocemie, prognostic neg în infecții severe
IL-6	-174GG alte polimorfisme	43%	Nivele scăzute rol protector la bolnavii septici Sepsis la prematuri, disfuncție miocardică în meningococcemie
IL-10	592A	33%	Niveluri scăzute → creșterea mortalității în sepsis

IMUNOSUPRESIA POSTINFECȚIOASĂ

Pentru contracararea expunerii susținute la germeni și produsele acestora, ca LPS, sistemul imun a dezvoltat imunosupresia postseptică, mecanism care permite celulelor hematopoetice să devină temporar slab reactive la acest tip de stimuli. Răspunsul compensator antinflamator contracarează efectele periculoase ale sepsisului, dar face bolnavii mai susceptibili la diferite infecții pe o perioadă extinsă de timp. Toleranța la LPS necesită reprogramarea răspunsului TLR4, represia de durată a genelor TNF- α și IL-1 β , schimbări de structură a factorului NF κ B, probabil prin mecanisme epigenetice (2,30). Copiii care au supraviețuit sepsisului sever prezintă un risc crescut de deces pe următorii câțiva ani. Excluzând din studiu prematurii și grupul de vârstă 0-1 lună, Czaja și col (32) au trecut în revistă peste 7.000 de cazuri cu sepsis sever, dintre care 6,8% au decedat în cursul primei internări sau la următoarele în intervalul de 28 de zile. Aproape jumătate dintre copii au fost reinternați cel puțin o dată în următoarele luni; la peste 30% diagnosticul

principal a fost legat de infecții respiratorii. 6,5% dintre aceștia au decedat în cursul reinternărilor. Riscul de deces se menține foarte ridicat în următorii 2 ani. Cauzele acestor decese pot fi multifactoriale, însă pe prim plan poate fi considerată reprogramarea răspunsului imun. La adulții internați în serviciile de terapie intensivă, mortalitatea la 28 de zile crește de la 10% în sindromul răspunsului inflamator sistemic, la 20% în sepsis, 20-40% în sepsis sever și 40-60% în socul septic. Impactul asupra evoluției ulterioare este deosebit de sever, estimându-se o reducere cu 50% a speranței de viață în următorii 5 ani (41). Într-un studiu efectuat la vârstnici referitor la efectele sepsisului asupra supraviețuirii îndepărtate, Quartin și col (42) constată un risc de 26% de deces de cauze non-septice într-un interval de 1 an și scăderea speranței de viață estimate de la 8 la 4 ani.

FACTORI CARE OFERĂ REZISTENȚA LA INFECȚII

Numeroase observații clinice au arătat că unele persoane sunt rezistente la infecțiile uzuale. Numai câțiva elevi dintr-o clasă sau școală, contacti streptococ β -hemolitic Gr A vor dezvolta reumatism articular acut sau glomerulonefrită acută. Puțini copii în cadrul portajului cu N meningitidis vor prezenta boala meningococică invazivă. Sunt cunoscuți sau în curs de investigare factorii care conferă rezistența în malarie, hepatita B și C, tuberculoză, infecția HIV, lepră. Astfel, în **infecția cu virusul hepatitic B** răspunsul este foarte variabil, numai o parte din bolnavi dezvoltând hepatita cronică. Protecția este oferită de haplotipuri din clasa II HLA care asigură prezentarea particulelor virale și clearanceul acestora, așa cum arată studii efectuate pe populația asiatică (35). S-a demonstrat că prezența genotipului IL28B indus de infecția virală asigură clearance-ul spontan al **virusului hepatitei C** alături de IFN α și IFN λ , care exercită un efect anti HCV (3). Numai 5-10% dintre subiecții infectați cu **M tuberculosis** dezvoltă boala; accidentele vaccinale cu germeni virulenți s-au soldat cu un număr de îmbolnăviri, dar o parte dintre copii au fost protejați în mod natural. Sunt cunoscute unele din cauzele acestor variații individuale legate de fondul genetic prin intervenția limfocitelor CD4, DC8 care produc IFN- γ . Polimorfisme genetice ale TNF α , IL-12 și IL-6 ar fi implicate, de asemenea, în rezistența la infecția tuberculoasă (39). Studii detaliate asupra **infecției HIV** au clarificat rolul receptorului membranal CCR5, care permite intrarea mediatorilor răspunsului inflamator în mediul celular. Intrarea virusului

HIV în interiorul celulei se produce prin cuplarea cu acest receptor. Mutația CCR-Δ32 blochează penetrarea virusului prin modificarea morfologiei receptorului (36). Homozigoții CCRΔ-32 sunt imuni la AIDS, iar heterozigoții dezvoltă mai lent boala. Este interesant de menționat ca 14-20% din populația nord-europeană deține această mutație (0-5% pentru populația africană și asiatică). Portajul acestei modificări genetice ar proveni din rezistența selectivă pentru virusul variolic și alte boli virale ca hepatita C (37), malaria și alte boli bacteriene. Unii autori au considerat prezența genei CCR-Δ32 ca un rezultat al adaptării imunologice a populației prin marile epidemii din cursul istoriei (38).

SELECȚIA NATURALĂ ȘI GENELE DE SUSCEPTIBILITATE PENTRU INFECȚII

Pediatria este prima ramură a medicinei care trebuie să răspundă asupra competenței imune a bol-

navilor în cazul infecțiilor amenințătoare de viață. Din nefericire, din cauza lipsei unor studii genetice aplicate clinic, până acum aceste răspunsuri nu au fost date. Evoluția prematurilor cu sepsis/șoc septic poate reprezenta o primă barieră de selecție naturală, deși existența amprentei genetice în evoluția sepsisului poate fi demonstrată în toate etapele vieții. Studii de epidemiologie genetică sugerează că variațiile genetice ale populațiilor sunt determinate de co-evoluția germenilor și a aparatului imunitar de răspuns. Bolile infecțioase au exercitat de-a lungul timpului o presiune selectivă majoră, de aceea genele implicate în răspunsul imun sunt cele mai numeroase și diverse din genomul uman. (40) Aceasta indică că există avantaje evolutive pentru a avea răspunsuri imune la o gamă cât mai largă de patogeni. Combinații de alele „bune“ sau „rele“ pot fi factori determinanți pentru supraviețuire.