

TARTU ÜLIKOOL
Arstiteaduskond
Üld-ja molekulaarpatoloogia instituut

LIINA SALUR

**Esimest tüüpi diabeediga assotsieeruvate
enteroviiruste vastaste antikehade esinemine
rasedatel ja ühes vastsündinute kohordis:
immunogeneetiline uuring.**

Magistritöö biomeditsiini erialal

Juhendaja: Prof. Raivo Uibo

TARTU 2006

SISUKORD

LÜHENDID	3
1. SISSEJUHATUS	5
2. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
2.1. Diabeet	7
2.1.1 T1DM patogenees	7
2.1.2. T1DM geneetiline eelsoodumus	9
2.2. Viiruste roll T1DM tekkes	12
2.3. Enteroviirused	13
2.3.1. Enteroviirused ja immuunvastus	14
2.3.2. Enteroviirused ja T1DM	15
3. TÖÖ EESMÄRGID	18
4. MATERJALID JA MEETODID	19
4.1. Uuritavad isikud	19
4.2. ELISA	20
4.3. Viiruse neutralisatsiooni test	21
4.4. HLA tüpiseerimine	22
4.5. Esmahaigestumus T1DM	24
4.6. Statistiline analüüs	24
5. TULEMUSED	25
5.1. Enteroviiruste vastaste antikehade esinemine lastel	25
5.2. Enteroviiruste vastaste antikehade esinemine rasedatel	26
5.3. HLA-DQ alleelide esinemine ja võrdlus enteroviiruste vastaste antikehade olemasoluga	27
5.4. Rahvusvaheline võrdlus	28
6. ARUTELU	31
7. JÄRELDUSED	35
8. KASUTATUD KIRJANDUS	36
SUMMARY	43
TÄNUAVALDUSED	46
LISAD	47

LÜHENDID

AH	aminohape
AK	antikehad
APC	antigeeni esitlev rakk
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BB	<i>BioBreeding</i>
BSA	veise seerumi albumiin
CD	diferentseerumise klaster
CAV	coxsackie A viirus
CI	usaldusvahemik
CBV	coxsackie B viirus
CTL	tsütotoksiline T lümfotsüüt
CTLA	tsütotoksilise T lümfotsüüdi antigeen
DNA	desoksüribonukleiinhape
EDTA	etüleendiamiintetraatsetaat
EIÜ	ensüümimmunoloogiline ühik
ELISA	ensüümvahendatud immunosorbentmeetod
EV	echoviirus
GABA	γ -aminobutüraat
GAD	glutamaadi dekarboksülaas
GADA	glutamaadi dekarboksülaasi vastased antikehad
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
HRP	mädarõika peroksüdaas
IAA	insuliini autoantikehad
IA-2	türosiini fosfataasi vastased antikehad
ICA	saarekeste vastased antikehad
IFN	interferoon
Ig	immunoglobuliin
IL	interleukiin
MHC	peamine koesobivuskompleks

<i>INS</i>	insuliini geen
NK	loomulik tappurakk
NA	neutralisatsiooni analüüs
OPD	o-fenüüldiamiin dihidrokloriid
NOD	<i>nonobese diabetic mice</i>
OR	šansside suhe
PBS	fosfaatpuhverdatud soolalahus
PV	polioviirus
PCR	polümeraasi ahelreaktsioon
RNA	ribonukleinhape
SD	standardhälve
TCR	T-raku retseptor
Th	T-abistajarakk
T1DM	1. tüüpi diabeet
T2DM	2. tüüpi diabeet
TNF	tuumor nekroosifaktor
VNTR	<i>variable number of tandem repeat</i>

1. SISSEJUHATUS

Diabeedi ennetamine, selle haiguse tekkemehhanismide uurimine on muutunud meditsiinis üheks aktuaalseimaks teemaks haiguse jätkuva esinemise tõttu kogu maailmas. Eeskätt väärivad sel puhul tähelepanu 1. tüüpi e. insuliinisõltuv diabeet (T1DM) ja 2. tüüpi e. insuliinist mittesõltuv diabeet (T2DM), kui enamlevinud diabeedi vormid.

T1DM on organspetsiifiline geneetiliselt determineeritud autoimmuunhaigus, kus insuliini produtseerivad pankrease β -rakud hävitatakse rakuliste immuunmehhanismide poolt. Haiguse progresseerumise kiirus on erinev ja β -rakkude häving algab tavaliselt aastaid enne haiguse diagnoosimist (Knip 2003). Juba selles faasis on leitavad haigusspetsiifilised autoantikehad, mille hulka kuuluvad pankrease saarekeste rakkude vastased antikehad (ICA), antikehad glutamaadi dekarboksülaasi (GADA), türosiini fosfataasi (IA-2) ja insuliini (IAA) vastu. T1DM diagnoosimisel esineb peaaegu 90% haigetest üks või mitu nimetatud autoantikeha (Notkins ja Lernmark 2001).

T1DM patogenees on multifaktoriaalne, kus olulist osa kannavad koesobivusgeenid, mis asuvad 6 kromosoomi lühikese öla HLA-DQ lookuses. Kuna ainult 10% vastavaid riskialleele omavatest inimestest haigestub diabeeti, peab olema ka mingi haigust vallandav keskkonnafaktor. Seda teooriat kinnitab ka haiguse esinemissageduse geograafiline variatsioon ning fakt, et haigestumussagedus on tõusnud viimasel kümnendil kiiremini kui varem (Ronningen et al 2001, Knip 2005).

Tõepoolest, senised uuringud rõhutavad välisfaktorite olulist osa T1DM tekkes. Mitmel põhjusel on otsitud seost T1DM ja laste vaksineerimise vahel (Hummel et al 2000, DeStefano et al 2001, Hviid et al 2004). Esiteks on vaksineerimine laialt levinud arenenud maades, kus samal ajal on tõusnud diabeeti haigestunute arv. Teiseks on leitud, et loomudelitel mõned vaktsiinid soodustavad diabeedi teket, teised aitavad haigestumist vältida. Oluline roll diabeedi tekkes võib olla ka lapseas põetud nakkustel. Nii on leitud tugev seos enteroviiruste, eeskätt coxsackie B viiruse (CBV) ja sellega seotud immuunreaktsioonide ning T1DM vahel (Knip 2003). Enteroviirused tekitavad tugeva immuunvastuse ja võivad nakatada pankreast ja β -rakke tekitades lokaalse põletiku. Diabeeti haigestumise hetkel on PCR meetodil leitud 42%-l uuritutest veres coxsackie viiruse RNA-d, kusjuures

samavanustel tervetel uuritud seda ei leitud (Horwitz et al 2004). Rakuline immuunvastus CBV antigeenile on tugevam diabeeti põdevatel lastel (Juhela et al 2000) ja enteroviiruste antikehade tiiter on oluliselt tõusnud nendel rasedatel, kelle järeltulijatel tekib aja jooksul diabeet (Hyöty et al 1995). Teisalt on kõrge diabeedi esinemissagedusega maades (näiteks Soomes ja Rootsis) vähenenud enteroviirusinfektsioonide arv (Viskari et al 2000). Seega on võimalik, et viirusinfektsioonide vähenemine ja üldine immunoloogilise kaitse langus üldpopulatsioonis võib tõsta teatud (näiteks geneetiliselt eelsoodustatud) isikute vastuvõtlikkust reale enteroviirustele ja soodustada nende poolt tekitatud komplikatsioonide sagedust (näit. pankrease insuliini tootvate β -rakkude kahjustus). Kui lapse esmane kokkupuude infektsiooniga toimub peale ema antikehade kadumist lapse organismist või esinevad emal antikehad vaid üksikute serotüüpide vastu ja madalas tiitris, pole lapsele tagatud piisav kaitse. Siin on leitud sarnasust poliomieliidi (poliomüeliidi viirus kuulub enteroviiruste hulka) levikuga 19-nda sajandi alguses, kui haigusjuhtude üldarvu vähenedes kasvas paralüüsidega assotsieerivate juhtude arv (Viskari et al 2004).

Käesolevas töös uurisime rea T1DM-ga seostuvate enteroviiruste vastaste antikehade esinemissagedust Eestis ja nende võimalikku seost diabeedi suhtes oluliste HLA alleelidega. Saadud tulemusi kõrvutati rahvusvahelise ühisprojekti EPIVIR raames saadud uurimisandmetega.

2. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

2.1. Diabeet

Diabeedi (*diabetes mellitus*) diagnoosi alla kuulub hulk hüperglükeemiaga kulgevaid haigusi, mis tekivad insuliini puuduliku sekretsiooni või insuliinresistentsuse tõttu. Haiguse patogeneetilised mehhanismid on erinevad ja sageli esineb ühel patsiendil nii insuliini sekretsiooni häireid kui ka insuliinresistentsust ning pole selge, kumb neist ja kas ainult, üks on hüperglükeemia põhjuseks. Diabeedi enim levinud vormideks on 1. tüüpi (tüüp 1a-autoimmuunne ja tüüp 1b-idiopaatiline) ja 2. tüüpi diabeet. Kui traditsiooniliselt on peetud 1. tüüpi diabeeti (T1DM) laste ja noorte diabeedi vormiks, siis nüüd diagnoositakse üha enam pankrease beeta-rakkude autoimmuunse kahjustusega kulgevat vormi ka täiskasvanutel. Diabeeti haigestumine kasvab terves maailmas, seda eelkõige 2. tüüpi (T2DM) arvelt, mis on seotud elustiili muutumisega: on vähenenud füüsiline aktiivsus, suurenenud stressi osakaal, toitumise traditsioonide muutumisega tekkinud ülekaaluliste arvu tõus ja kolesterooli taseme tõus veres (Eissa ja Gunner 2004). Enamik T1DM esmashaigestumuse epidemioloogilisi uuringuid põhinevad alla 15 aasta vanuses haigestunud patsientide andmetel ja Eestis tehtud uuringu kohaselt on esmashaigestumus tõusnud 10,1-lt (1983-1990) 12,3-ni (1991-1998) 100000 inimaasta kohta (Podar et al 2001). Aastatel 1999-2003 ulatus see näitaja samas vanusegrupis juba 14,9-ni (Tillmann 2004).

2.1.1 T1DM patogenees

Kuigi diabeeti on palju uuritud loomudelitel (NOD hiired ja BB rotid), on vähe teada T1DM patogeneesist inimestel. Andmeid on saadud kõhunäärme biopsia materjalist (teostamine küllalt komplitseeritud) ja autopsia materjalist haigetelt, kes surid kas ägedasse ketoatsidoosi varsti pärast haiguse diagnoosimist või peale pikaajalist põdemist. Mõlemal juhul on tegemist ilmselt kuid või aastaid kulgenud protsessiga ning protsessi vallandajat ja täpset kulgu on raske kindlaks teha. Immunoloogilised muutused pankreases on nii humoraalset kui ka rakulist tüüpi.

Morfoloogiliselt on tegemist põletikuga, kus lümfotsüüdid ja makrofaagid on infiltreerunud pankrease saarekestesse ja mille tulemusena insuliini tootvad β -rakud hävinevad. Infiltmaat koosneb CD8+ ja CD4+ T rakkudest ja B rakkudest, kusjuures domineerivad CD8+ rakud. Infilttraadis on leitud ka NK-rakke ja dendriittrakke (Notkins ja Lernmark 2001, Leslie et al 1999, Robles 2001). Oma osa on ka proinflammatoorsetel tsütokiinidel (TNF- α , IL-1, IL-6 ja IFN- γ), samuti Fas-FasL vahelisel toimel, perforiinil ja gransüümil (Atkinson ja Eisenbarth 2001, Santamaria 2003). Makrofaagide ja aktiveeritud T rakkude poolt produtseeritud tsütokiinid aitavad autoreaktiivsetel T rakkudel aktiveeruda ja ellu jääda ning on otseselt vastutavad koekahjustuse eest ja /või soodustavad autoantigeenide esitlust. Ilmselt on kogu protsessi tekkes ja kulus oluline roll mitmesugustel regulaatorsetel rakkudel (Hauben et al 2005).

Autoimmuunsete protsesside esinemisest T1DM puhul annavad märku haigete veres leiduvad mitmesugused pankrease koe vastased autoantikehad. Autoantikehade osa T1DM tekkimisel ei ole selge, kuigi juba aastaid enne diabeedi kliinilist diagnoosimist võib leida veres suhkurtõvele iseloomulikke autoantikehi (Kukko et al 2003, LaGasse et al 2002, Kimpimäki et al 2002). Autoantigeene on leitud mitmeid, kuid enim uuritud on 65kDa glutamaadi dekarboksülaas (GAD65), insuliin ja türosiini fosfataas (IA-2).

ICA on autoantikehade kogum, mis reageerib pankrease endokriinrakkude tsütoplasmas esinevate antigeenidega (GAD65, IA-2) (Baekkeskov et al 1982, 1990) ja mida määratakse kaudsel immunofluorestsents meetodil.

GAD-il on kaks isovormi: üks molekulmassiga 65,000 (GAD65) ja teine molekulmassiga 67,000 (Bu et al 1992). GAD on ensüüm, mis katalüüsib neurotransmitter γ -aminobutüraadi (GABA) sünteesi. GAD kõrgeim tase on ajus, märkimisväärselt on GAD ekspresseeritud pankrease saarekestes, käbinäärmes, gonaadides, neerudes, neerupealistes. Inimese pankrease Langerhansi saarekestes ekspresseerub ainult GAD65, aga tema funktsioon selles koes pole teada. GAD65 autoantikehad on kõige stabiilsemad diabeedi autoantikehad. Neid leitakse rohkem haigete vanemas vanusegrupis ja nad iseloomustavad aeglasema kuluga diabeeti (Notkins ja Lernmark 2001, Kulmala et al 2001). Esineb ka seos HLA DQB1*0302 alleeli, DQB1*02/0302 genotüübi ja GAD65 vahel (Kulmala et al 2001).

IA-2, mida tähistatakse ka ICA512, kuulub türosiini fosfataasi perekonda ja selle geen asub 2q35 kromosoomil (Leslie et al 1999). Proteiin on ekspresseeritud neuroendokriinkoes ja on leitud pankrease saarekeste α ja β rakkudes. IA-2 autoantikehade tiiter langeb haiguse edenedes, neid esineb rohkem lastel ja teismelistel (Notkins ja Lernmark 2001, Kulmala et al 2000).

Insuliin on ainuke β -rakkudele spetsiifiline diabeediga seotud antigeen. See on lühike, 51-st aminohappest koosnev proteiin, mida kodeerib geen kromosoomil 11p15 (Palmer 1987). Erinevate autoantikehade esinemissagedus on praktiliselt võrdne, vähem esineb insuliini vastaseid autoantikehi (IAA). IAA on aga tavaliselt esimesed autoantikehad, mis leitakse diabeedi preventatsiooniuuringutes osalevatel lastel, kuid nad kaovad pankrease kahjustuse süvenemisel ka kõige kiiremini (Kimpimäki et al 2002).

Autoantikehade tekkemehhanism nii nagu T1DM teke pole lõplikult selgitatud, kuid ilmselt on siin oluline roll välisfaktoritel, eeskätt enteroviirustel (vt. allpool).

2.1.2. T1DM geneetiline eelsoodumus

Kuus protsenti T1DM diabeeti põdevate laste vendadest- õdedest haigestub diabeeti 30-ndaks eluaastaks, kusjuures populatsiooni haigestumissagedus samas vanuses on 0,6%. Kui lapse vanemad on diabeetikud, tõuseb haigestumise risk 3-6%. Riski suurus sõltub ka vanema soost. Kui T1DM on isal, siis lapse risk haigestuda on 1-9%, haige ema korral 1-4% (Hawa 2002). Miks see nii on, pole täpselt teada. Pakutud on erinevaid põhjuseid: diabeeti põdevatel emadel esineb rohkem raseduse iseeneselikku katkemist; haige ema organism suudab kaitsta oma loodet diabeedi vastu tugevamini; diabeeti soodustavatel ema geenidel on isa omadest väiksem mõju (Hawa 2002).

Kirjanduse andmetel on T1DM haigestumist soodustavaid geene palju (15-20) (Bach 2001, Gorodezky et al 2006). Vastavad geenid on polümorfed ja koosnevad paljudest üksteisest funktsionaalsete karakteristikute poolest erinevatest alleelivariantidest. Kõige enam mõjutab T1DM teket HLA (Human Leukocyte Antigen) geenide kompleks. Kui geneetilised faktorid mõjutavad diabeedi teket umbes 50 % ulatuses, siis HLA osa võiks olla sellest 25% (Bach et al 2001, Gorodezky et al 2006). HLA on 6. kromosoomi lühikese öla (6p21) 3500 Kb suurune

segment, mis koosneb paljudest geenidest. Erinevad HLA alleelid määravad indiviidi võime immuunvastuseks (sh. võime toota antikehi), vastuvõtlikkuse või resistentsuse nakkushaigustele, mitmetele autoimmuunhaigustele ja allergiatele. Indiviid saab kummaltki vanemalt ühe HLA geenikompleksi. Üks HLA geenikompleks sisaldab endas mitmeid geeni lookusi: I klassi geenide lookus (sisaldab B, C, A lookusi), II klassi geenide lookus (sisaldab DP, DQ ja DR lookusi) ning III klassi geenide lookus (sisaldab komplemendi komponente, kuumashoki valke ja TNF). Enamik HLA gene on kõrge polümorfsuse astmega kodeerides suurt hulka erinevaid allelele. Diabeedi tekkes mängivad suuremat rolli HLA II klassi DR ja DQ alleelid (Ide ja Eisenbarth 2003, Emery et al 2005). DR ja DQ on kaheaahelalised (α, β). Need alleelid võivad diabeedi teket soodustada, avaldada kaitsvat mõju või osutada diabeedi suhtes neutraalseteks. Diabeeti soodustavad DQA1*0301-DQB1*0302, DQA1*0501-DQB1*0201 ja DQA1*0301-DQB1*0201. Kaitset pakuvad DQA1*0101-DQB1*0602, DQA1*0501-DQB1*0301 ja DQA1*0301-BQB1*0301. DQA1 ja DQB1 alleelide kaitsev või diabeeti soodustav mõju sõltub teatud aminohapete asetsusest DQ α või β ahelas (Khalil et al. 1990, Todd et al 1987). Näiteks kui DQ β ahelas asub 57-ndal kohal aspartaathape, on tegemist kaitsva alleeliga (*0601,*0602,*0603,*0503,*0301,*0303,*0401), kui agaalaniin, on tegu diabeedi teket soodustavate alleelidega (*0201, 0302) (Todd et al 1987). DQ α ahela puhul on tähtis 52 positsioonil olev AH. Kui seal asub arginiin, on tegu diabeedi suhtes koormatud alleelidega (*0301, *0501, *0401), kui seriin või histidiin, kaitsvatega (*0101, *0102, *0103, *0201) (Khalil et al 1990). Kuna HLA-DQA1 ja DQB1 vahel esineb tugev aheldunud pärandumine, võib piirduda enamikel juhtudel DQB1 alleeli määramisega. Näiteks kui esineb HLA-DQB1*0302 alleel, võib eeldada, et esineb ka DQA1*0301, mis mõlemad on riskialleelid. Samuti on DQB1*0602 enamasti assotsieerunud DQA1*0102, kuid ka DRB1*15 ja DRB5*0101 alleelidega. Selle tugevalt kaitsva haplotüübi edasine tüpiseerimine ei annaks meile täiendavat informatsiooni. Oluliseks võib osutada aga DQA1 alleeli määramine DQB1*02 korral. Põhja-Euroopa valge rassi esindajatel on DQB1*02 seotud kas DQA1*0201 (DR7 haplotüüp, mis on kaitsev või neutraalne) või DQA1*0501 (DR3 haplotüüp, mis on riskialleel (Ilonen et al 2002)). Kuigi erinevates populatsioonides on sarnased kaitsvad ja riskialleelid, on seoste tugevus erinev. Näiteks esineb DQA1*05-DQB1*02 (DR3) haplotüüp sagedamini Kreekas kui Soomes ja see omab Kreekas

tugevamat haigestumisriski (Ilonen et al 2002). Suhkurtõvele tähenduslike HLA alleelide esinemist eestlastel on uurinud dr. Bela Adojaan, kelle andmetel on HLA-DQB1 alleelidest madalaima insuliinsõltuva suhkurtõve riskiga HLA-DQB1*0602/0603 ja kõige kõrgema riskiga HLA-DQB1*0302 ja HLA-DQB1*0201. Kõige sagedasem alleelide kombinatsioon T1DM patsientide seas oli HLA-DQB1*0201-DQA1*0501 (50%), järgnes HLA-DQB1*0302-DRB1*0401 (43%) (Adojaan 1998). Hilisemas uuringus oli HLA-DQB1*02/0302 esinemissagedus T1DM patsientidel 25,7% versus kontrollidel 3,6% ja kaitsvaid allele diabeetikutel 22,9% ja kontrollidel 63,3% (Haller et al, saadetud avaldamiseks).

Kuidas täpselt HLA II klassi molekulid determineerivad diabeedi teket, ei ole päris selge. Kõige enam levinud hüpoteesi kohaselt toimub protsess läbi nende peptiidide, mida nad endaga seovad ja esitlevad T-rakkudele kas siis mõjutades T rakkude selektsiooni tuumuses või antigeenide presentatsiooni perifeerias (Moustakas ja Papadopoulos 2002).

Lisaks HLA II klassi geenidele on analüüsitud ka I ja III klassi geenide osa diabeedi tekkes (Undlien et al 2001, Ide ja Eisenbarth 2003). Siin on asi veel keerulisem kuivõrd erinevates populatsioonides on sarnastel alleelidel erinev risk.

Väljaspool HLA lookusi on T1DM assotseeruvatest geenidest enim uuritud insuliini geeni (INS) ja *CTLA-4* (*cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*) geeni. Insuliini geen (11p15) koosneb 3 eksonist. Geeni piirkonnas esineb 10 polümorfismi, mis kõik on omavahel tugevalt aheldunud ja millest VNTR (*Variable number of tandem repeats*) omab ilmselt suurimat rolli (Bell et al 1984). VNTR on geeni promooter piirkonnas asuv mikrosatelliit. Vastavalt korduste arvule jaotatakse VNTR alleelid 3 klassi: I klass-26-63 kordust, II klass umbes 80 kordust ja III klass 140-200 kordust (Ide ja Eisenbarth 2003). VNTR III klassi alleelid on seotud insuliini mRNA kõrgema ekspressiooniga tuumuses (Bennet et al 1997).

CTLA-4 asub kromosoomil 2q33, koosneb neljast eksonist ning osaleb T-raku ja antigeeni esitava raku (APC) interaktsioonis T-raku aktivatsiooni pidurdajana ja on seotud perifeerse tolerantsuse säilitamisega (Brunet et al 1987). 1. eksonis olev ühenukleotiidne polümorfism A/G annab CTLA-4 signaalpeptiidis aminohappelise vahetuse-Thr/Ala (Nistico et al 1996). Eestis on uuritud insuliin-2221 MspI C/T ja CTLA-4 +49 A/G polümorfismi juhtkontrolluuringus Saaremaa populatsioonis (Haller et al 2004). Uuringus leiti seos insuliini-2221 MspI C alleeli, CTLA-4 G alleeli ja T1DM vahel.

2.2. Viiruste roll T1DM tekkes

Viirused on obligatoorsed intratsellulaarsed mikroorganismid, mis paljunevad raku sees ja kasutavad selleks peremeesraku nukleiinhappeid ja valgusünteesi. Immuunvastus viirustele kujuneb välja loomuliku ja omandatud immuunsuse mehhanismide kaudu. Loomuliku immuunsuse mediaatorid on fagotsütaarsed rakud (makrofaagid, granulotsüüdid), NK rakud, komplemendi süsteem, interferoonid ja aktiivse faasi valgud, mis ei suuda küll tekitada kestva immuunsust, kuid on vajalikud immuunvastuse varajases faasis (Abbas 2003). Omandatud immuunsuse mediaatoriteks on lümfotsüüdid (B ja T rakud), mille aktivatsiooni käigus tekivad viirusest infitseeritud raku ründavad tsütotoksilised lümfotsüüdid ja viiruse vastased antikehad (Janeway et al 2001).

Humoraalne immuunsus. B rakkude poolt produtseeritud antikehad neutraliseerivad viiruse virulentsust, soodustavad fagotsütoosi ja komplemendi aktivatsiooni. Antikehad (AK) jaotatakse viide klassi: IgM, IgD, IgG, IgA ja IgE ning edasi nelja IgG subklassi ja kahte IgA subklassi. Igal klassil ja subklassil on kindel lokaliseerimine ja funktsioon (Janeway et al 2001). Nakatumise järgselt ilmub esimesena IgM. Seda leidub peamiselt veres ja tema ülesandeks on aktiveerida komplement klassikalisel teel. IgM aitab eeskätt aglutineerida mikroorganisme ja nende antigeene (Janeway et al 2001). IgG1 ja IgG3 neutraliseerivad viiruseid ja opsoniseerivad neid fagotsütoosiks. IgG1, IgG2 ja IgG3 tüüpi antikehad aktiveerivad komplemendi süsteemi. IgG AK läbivad ka platsenta (Janeway et al 2001). IgA antikehi leitakse valdavalt epiteelkihi lamina propria ja sekretoorne IgA on seotud limaskestade immuunsüsteemiga (Janeway et al 2001). IgE antikehad seonduvad nuumrakkudele. Nad on seotud allergiliste reaktsioonidega ja parasiitide kahjutustamisega (Janeway et al 2001).

Viirusinfektsiooni käigus toimub antikehade afiinsuse küpsemine ja tõus. Mida tugevam on B raku seondumine antigeeniga, seda suurem on tõenäosus, et B rakk jääb ellu ja paljuneb. Selle tulemusena tekib konkreetse viiruse suhtes spetsiifiline kõrge afiinsusega B rakkude populatsioon. Antikehad ei ole võimelised tungima nakatunud raku ja ei suuda võidelda latentsete ja otseselt rakust raku levivate viirustega. Antikehad seonduvad ekstratsellulaarsete viiruslike antigeenidega, milleks võivad olla rakul paiknevad viirusvalgud või vabalt vereringes tsirkuleerivad intaksed viirused. Antikeha seondumine viirusosakesega pärsib viiruse adhesiooni peremeesorganismi

rakumembraanile ja edasist penetratsiooni. Isegi kui antikehadega kaetud viirus suudab tungida rakku, on sageli takistatud tema desintegratsioon ja nukleiinhappe vabanemine kapsiidist (Janeway et al 2001).

B-lümfotsüütidel on viirusinfektsiooni korral mitu rolli. Lisaks otsesele viirust äratundvale funktsioonile ja antikehade produktsioonile, on nad võimelised viirust internaliseerima, töötleva ja esitlema koos MHC molekulidega, mis on äratuntavad T-lümfotsüütidele. Samaaegselt toimub ka tsütokiinide produktsioon, mis võimendab spetsiifilisi ja mittespetsiifilisi kaitsereaktsioone. Veel on arvatud, et viirusinfektsiooni järgselt võivad viiruse vastased AK põhjustada anti-idiotüüpsete AK moodustumise. Need sekundaarsed AK võivad olla autoreaktiivsed, kui esmased AK-d moodustusid peremeesorganismi valguga sarnase viiruse osa vastu (Jun 2003).

Rakuline immuunsus. Antigeenide äratundmine CD4+ rakkude poolt on omandatud immuunsuse tähtis osa. CD4+ rakke e. T abistaja rakke (Th) jaotatakse kaheks: Th1 ja Th2. Iga CD4+ rakk võib diferentseeruda Th1 või Th2 rakuks. Protsessi mõjutavad tsütokiinid IL-12 ja IL-4, kostimulatoorsed molekulid, antigeeni konsentratsioon ja iseloom ning APC rakkude tüüp. Th1 rakud sekreteerivad IL-2 ja IFN- γ , mis aktiveerivad CD8+ rakke ja makrofaage. B rakkude aktivatsioon ja diferentseerumine plasmarakkudeks toimub Th2 rakkude poolt sekreteeritud tsütokiinide (IL-4, IL-5, IL-6 ja IL-13) abil (Abbas 2003). Arvatakse, et diabeet tekib, kui Th rakkude tasakaal muutub Th1 kasuks (Karlsson et al 2000, Cohen 1997).

Kõik viirused paljunevad ainult rakkude tsütoplasmas. Raku sees olevad viirused on antikehadele kättesaamatud. CD8+ T rakud tunnevad ära viiruse poolt nakatunud raku tänu oma T raku retseptorile (TCR) ja hävitavad raku. Nad viivad raku membraani perforiine, mis võimaldab gransüümil vahendada apoptoosi. Samuti võib apoptoos toimuda Fas-FasL (Fas ligandi) abil (Atkinson ja Eisenbarth 2001). Kui viirus satub ekstratsellulaarsesse ruumi, on ta kättesaadav antikehadele. CD8+ rakkude poolt produtseeritud tsütokiinidel IFN- γ , tuumor nekroosi faktor α (TNF- α) ja TNF- β on tähtis osa mikroobide vastases kaitses (Abbas 2003).

2.3. Enteroviirused.

Enteroviirused on Pikornaviiruste sugukonda kuuluvad väikesed RNA-d sisaldavad viirused, diameetriga umbes 30 nm. Välisümbris virionil puudub. RNA(+)

üksikspiraal kujutab endast üht gigantset mRNA-d. Virioni koostises on 4 polüpeptiidi (VP1, VP2, VP3 ja VP4). Välisümbrise puudumise tõttu on nad mittetundlikud rasvalahustajatele, on resistentsed pH küllalt suurte kõikumiste suhtes (pH 3-10) (Modlin 2005). Enteroviirusi on üle 60 serotüübi ja sinna kuuluvad polioviirused, echoviirused, coxsackie A ja B viirused ning nn. "uued" viirused (alates 1970. aastast avastatud serotüüpe tähistatakse numbritega 68-72). Enteroviirused on laialt levinud viirused, mille ülekande toimub peamiselt fekaal-oraalsel teel. Enamus enteroviirusinfektsioone kulgevad asümptomaatiliselt, kuid vastsündinuil ja immuunsupresseeritud inimestel võivad põhjustada eluohtlikke infektsioone (müokardiit, entsefaliit, meningiit pneumoonia). Viirus paljuneb neelu ja soole lümfoïdkoes ja seejärel levib sekundaarsetesse lümfoïdorganitesse põhjustades vireemia. Vireemia käigus võib ta levida erinevatesse organitesse nagu kesknärvisüsteem, süda, pankreas ja nahk (Haverkos et al 2003). Infektsioonide sagedus sõltub aastaegadest, geograafilisest asendist, vanusest ja populatsiooni sotsiaal-majanduslikest faktoritest nagu asustustihedus ja elustandard (Modlin 2005).

2.3.1. Enteroviirused ja immuunvastus

Enteroviirusinfektsiooni leviku takistamisel on oluline osa antikehade poolt vahendatud immuunmehhanismidel. Konkreetse viiruse tüübi vastu tekivad kõigepealt IgM tüüpi antikehad, mis püsivad veres 6-8 nädalat. IgG tüüpi AK tekivad hiljem ja persisteerivad aastaid peale infektsiooni. Reinfektsioon sama või sarnase enteroviiruse tüübiga võib tekitada nn. sekundaarset tüüpi IgG antikehade tiitri tõusu. Tsirkuleerivatel antikehadel on oluline roll vältimaks viiruse levimist märklaudorganisse. Seedetrakti infektsioon põhjustab sekretoorset tüüpi IgA (sIgA) antikehade tekke. Suukaudse poliomüeliidi elusvaktsiini manustamise järgselt soole ja nina-neelu limaskestades tekkivad IgA AK püsivad vähemalt 15 aastat (Modlin 2005). Taasnakatumisel kõrge sIgA tiiter väldib või vähendab viiruse levikut, aga madal tiiter on seotud viiruse ägedama orofarüingealse paljunemisega ja viiruse levimisaeg pikeneb. Serotüübispetsiifilised nn. neutraliseerivad AK annavad eluaegse kaitse ja immuunsuse vastava viiruse vastu (Moore 1984).

2.3.2. Enteroviirused ja T1DM

Viimasel paaril aastakümnel on mitmetel uurijate kollektiividel õnnestunud demonstreerida enteroviiruste seost T1DM tekkega (Lönnrot et al 1999, Viskari et al 2000, Sadeharju et al 2003). Viirusinfektsioon põhjustab märklaudorganismis lokaalse immuunvastuse tekke koos tsütokiinide vabanemisega, mis peatavad viiruste paljunemise ja aitavad neid hävitada. Kuid põletiku tsütokiinid võivad vallandada ka autoimmuunseid reaktsioone geneetiliselt determineeritud isikutel. Võimalikud mehhanismid T1DM puhuse autoimmuunsuse tekkeks on mitmesugused. Teoreetiliselt võivad viirused põhjustada β -rakkude hävinemist kahel teel: nad võivad hävitada β -rakud otseselt või vallandada autoimmuunse reaktsiooni β -rakkude vastu. Viiruste replikatsioon saarekestes häirib β -rakkude funktsioneerimist otseselt. Samuti võivad tekkida viirus spetsiifilised tsütotoksilised T rakud (CTL), mis hävitavad viirusega nakatunud β -rakud.

Autoimmuunne reaktsioon võib tekkida läbi molekulaarse mimikri või endogeensete antigeenide ekspresseerimise (“*bystander*” aktivatsioon). Transgeensetel hiirtel, kellel on välja lülitatud IFN- α ja IFN- γ produktsioon, muutuvad β -rakud tundlikuks viirusinfektsioonile ja sellele järgneva naturaalsete tappurrakkude (NK) rünnaku suhtes. Rakud hävivad apoptoosi tagajärjel juba enne T ja B rakulist immuunvastust. Rakulise immuunvastuse käigus tekivad viirusspetsiifilised CTL-d, mis hävitavad viirusega nakatunud β -rakud. Koe hävinemise käigus vabanevad autoantigeenid ja tekib puhkavate autoreaktiivsete T rakkude restimulatsioon (Fairweather 2002). Molekulaarse mimikri kasuks räägib fakt, et paljude enteroviiruste mittestruktuuraalse 2C proteiini PEVKEK piirkond omab ühist aminohappelist järjestust GAD65-ga. See kutsus esile ristreageerivate CTL tekke. (Flippi ja von Herrath 2005). On näidatud ka T-rakkude ristreageerimist GAD ja P2C vahel peale NOD hiirte immuniseerimist peptiidiga. Horwitz ja kaasautorid (Horwitz et al 1998) väidavad, et B10.H2g7 hiirtel, mis kannavad NOD MHC allelele, kuid puuduvad muud T1D suhtes tundlikud faktorid, ei teki CBV4 infektsiooni korral diabeeti. BDC2.5 transgeensete hiirte, kellel ekspresseerub saarekeste antigeenile spetsiifiline T raku retseptor, mis ei ristreageeru CBV4 P2C proteiiniga, nakatamisel tekkis diabeet 70%-l.

Antigeense stimulatsiooni korral aktiveeruvad T-mälurakud efektiivsemalt kui naiivsed rakud ja on näidatud, et korduvad infektsioonid erinevate viirustega võivad

aktiveerida antud viirusega mitteseotud T mälurakke (Nahill et al 1993, Selin et al 1994). Võib tekkida segu (“*pool*”) sellistest mitte-autoreaktiivsetest ja autoreaktiivsetest T mälurakkudest. Lisaks võib viirus, millel on kehaomase antigeeniga ühine epitoop, põhjustada autoreaktiivsete T rakkude selektiivse akumulatsiooni. Seega võib korduv viirusinfektsioon (tekitaja võib olla erinev) viia autoimmuunsete reaktsioonide tekkele geneetiliselt diabeedi suhtes tundlikel indiviididel. Kui piisav kahjustus β -rakkudele on juba aset leidnud, on võimalik, et juhuslik viirus enne T1DM haigestumist võib vallandada kaskaadi, mis viib lõplikule β -rakkude hävimisele ja T1DM tekkele. Viirus ei pea üldse olema seotud eelnevate infektsioonidega ega toimuma ristreageerumist. “Korduv-tabamuse” teooria on leidnud kinnitust ka mitmel hiiremudelil (Evans et al 1996). Seega ei ole autoagressiivne vastus tekkinud *de novo* enne diabeedi diagnoosimist ja autoagressiivsete T rakkude kogum sisaldab aktiveeritud rakke, mis on juba varem antigeenide poolt stimuleeritud. Praegu pole teada, kas need järjestikused infektsioonid peavad omama sarnaseid antigeenseid komponente või/ja põletikulisi jooni olemaks haiguse patogeneesis olulised.

Diabeedi tekkes on suur osa antigeeni esitlevatel rakkudel (APC). β -rakkude hävinemisel tekkinud kehaomased antigeenid esitletakse autoreaktiivsetele T rakkudele. Selleks, et protsess saaks edukalt kulgeda, on vajalik piisav autoreaktiivsete T rakkude eellaste olemasolu. (Horwitz et al 2004). Viirusinfektsioonid, mis on võimelised aktiveerima APC või moduleerima aktiveeritud APC funktsiooni, on võimelised mõjutama autoreaktiivsete T rakkude värbamist ja paljunemist. Lisaks mõjutab viiruse tropism ja võime β -rakke hävitada autoagressiivset vastust läbi antigeeni esitlemise APC poolt. (Flippi ja von Herrath 2005). Hiiremudelil leiti, et tähtis on ka infektsiooni tekkimise aeg ja serotüüp. Kui 8 nädala vanuseid hiiri nakati CBV4 viirusega, haigestumus diabeeti sages. See ei toimunud aga nooremate hiirte puhul. Seevastu hiirte nakatamisel CBV3 viirusega vähenes haigestumus diabeeti sõltumata hiirte vanusest (4 ja 8 näd.). CBV4 infitseerib β -rakke, CBV3 atsinuse rakke (eksokriinne pankreas). Sellisel juhul saarekete antigeene ei esitleta. Pankreatiidi käigus tekkivad antigeenid võivad pärssida autoimmuunvastust, kuna põletikuline kahjustus toimub saarekestest eemal.

Enteroviiruste seos diabeediga annab alust arvata, et enteroviiruste (sh. eriti diabetogeense CBV4) vastaste antikehade esinemine elanikkonnas võib otseselt olla

seotud diabeedi tekkeriskiga. Seejuures võib mitmesugustest teguritest (sh. vaksineerimisest ristreageerivate polioviirustega) olenevalt ema (raseda) ja vastsündinu ning väikelapse kaitse enteroviirusinfektsioonide suhtes olla erinev. Neile aspektidele pole seni olulist tähelepanu pööratud.

3. TÖÖ EESMÄRGID

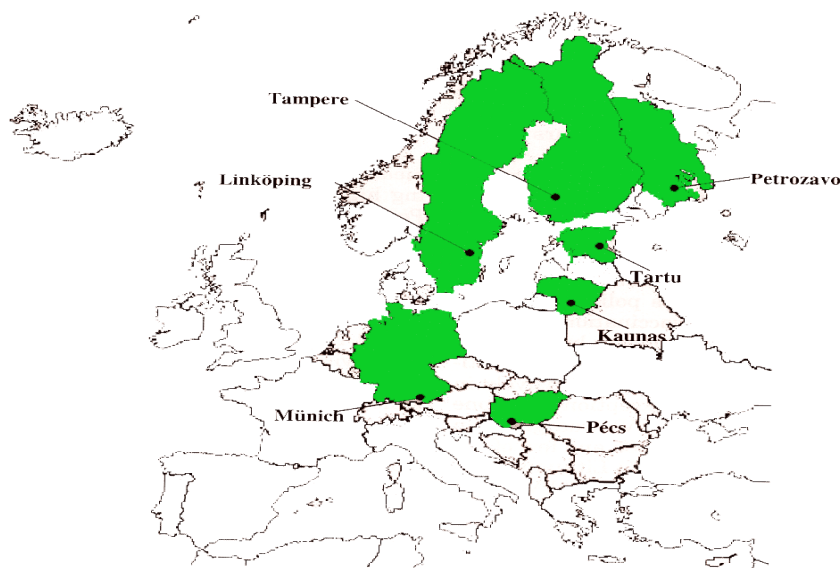
Käesoleva töö eesmärkideks olid:

1. Analüüsida enteroviirusinfektsioonide esinemist Eesti rasedatel ja lastel, kasutades selleks ELISA meetodil määratavaid enteroviiruste vastaseid antikehi.
2. Analüüsida ema poolt saadud enteroviiruste vastaste antikehade osa lapse kaitsmisel infektsiooni eest.
3. Uurida diabeedi suhtes erineva tekkeriskiga HLA-DQB1 alleelide esinemist ja nende võimalikku seost enteroviiruste vastaste immuunreaktsioonide tekkega.
4. Võrrelda enteroviirusinfektsioonide esinemist erinevate maade populatsioonides ning selle korreleerumist 1. tüüpi diabeedi esinemissagedusega vastavates regioonides.

4. MATERJALID JA MEETODID

4.1. Uuritavad isikud

Töö moodustab osa rahvusvahelisest kaheksat Euroopa riiki haaravast koostööprojektist (EPIVIR), mida on finantseerinud Euroopa Liit.



Eesti uurimismaterjal koguti käesoleva töö autori poolt perioodil 2000. a. maist kuni 2003. a. augustini. Nabaväädiveri saadi 123-lt järjestikku sündinud Võru maakonna vastsündinult (56 M ja 67 N), kellest 83-l võeti lisaks veri 6-kuuselt, 68-l 12-kuuselt ja 53-l 24 kuuselt. Lisaks uuriti 100 rasedusega arvel olnud naist (50 Tartust ja 50 Võru maakonnast) vanuses 17,5-41,3 (keskmise 28,1+8,1 SD) aastat, kellelt veri võeti 11.-30. rasedusnädalal (keskmiselt 16. nädalal) rutiinse arstliku kontrolli käigus. Osalejatele selgitati uuringu eesmärke, osalemise vabatahtlikkust ja kogutud isikuandmete konfidentsiaalseks jäämist. Kõigilt rasedatelt saadi kirjalik nõusolek. Lastelt vere võtmisel täideti küsimustik, kus uuriti, kas ja millal on laps vaktsineeritud ja kas laps on kodune või viibib osa päevast lastekollektiivis, samuti laste arvu peres. Uuring on heaks kiidetud Tartu Ülikooli Eetikakomitee poolt.

Rahvusvahelise uuringu raames koguti samadel põhimõtetel rasedate seerumeid Soomes (n=104, keskmine vanus 28,8±4,7 SD aastat), Rootsis (n=128, keskmine vanus 29,7±4,0 SD aastat), Saksamaal (n=110, keskmine vanus 32,9±4,6 SD aastat), Ungaris (n=100, keskmine vanus 27,5±4,7 SD aastat), Iisraelis (n=377,

keskmise vanus 29,1±5,0 aastat), Leedus (n=154, keskmine vanus 26,5±5,1 SD aastat) ja Venemaa Karjala piirkonnas (n=103, keskmine vanus 25,9±5,5 SD aastat). Seerumid koguti aastatel 1999-2001 ja uuring oli heaks kiidetud iga maa kohalike eetikakomiteede poolt.

4.2. ELISA

Enteroviiruste vastaste IgG ja IgA tüüpi antikehade määramiseks kasutati ELISA senikirjeldatud meetodit (Sadeharju et al 2001). Antigeenina kasutati puhastatud coxsackie B4 viiruse (CBV4), polioviiruse tüüp 1 (PV1) valke ja sünteetilist enteroviiruse peptiidi (KEVPALTAVETGAT-C), mis on ühine epitoop kõigile teadaolevatele enteroviirustele (Oberste et al 1999). Antigeenid saadi Tampere Ülikooli viroloogidelt ja neid oli eelnevalt termiliselt töödeldud (30 min. +56°C), et tõsta antigeeni epitoopide reaktsioonivõimelisust. Enteroviiruse peptiidi mikrotiiterplaadile sidumise soodustamiseks oli peptiid konjugeeritud veise seerumi albumiiniga (BSA). Mikrotiiterplaadi (Nunc Maxisorp, Taani) kannud kaeti antigeeniga kontsentratsioonis 2,5µg/ml (enteroviiruse peptiid), 2,2µg/ml (CBV4) ja 2,1µg/ml (PV1) karbonaatpuhvris (pH 9,6) ja inkubeeriti üle öö toatemperatuuril ning pesti seejärel neli korda fosfaatpuhverdatud keedusoolalahuses (PBS, pH 7,4), millele oli lisatud 0,05% Tween20. Seejärel blokeeriti 0,1% BSA+PBS 30 minutit toatemperatuuril. Peale pesu inkubeeriti iga seerumit paarilahjenduses 1:2000 (IgG) või 1:100 (IgA) 1% BSA+PBS+0,05%Tween20 lahuses 60 minutit +37°C temperatuuril. Järgnes pesu, misjärel plaati inkubeeriti 30 minutit +37°C juures inimese IgG või IgA vastaste mädarõika peroksidaasiga (HRP) konjugeeritud küüliku antikehadega (P214, P216, Dako, Taani) lahjendusel 1:3000 1% BSA+PBS+0,05%Tween20 lahuses. Substraadina kasutati o-fenüüldiamiin dihidrokloriidi (OPD) (Sigma, Saksamaa) tsitraatpuhvris (pH 5,5), lisandina H₂O₂. Optilised tihedused mõõdeti mitmekanalisel fotomeetril Multiscan MCC/340 (Labsystems, Soome) lainepikkusel 492 ja tulemused väljendati ensüümimmunoloogilistes ühikutes (EIÜ).

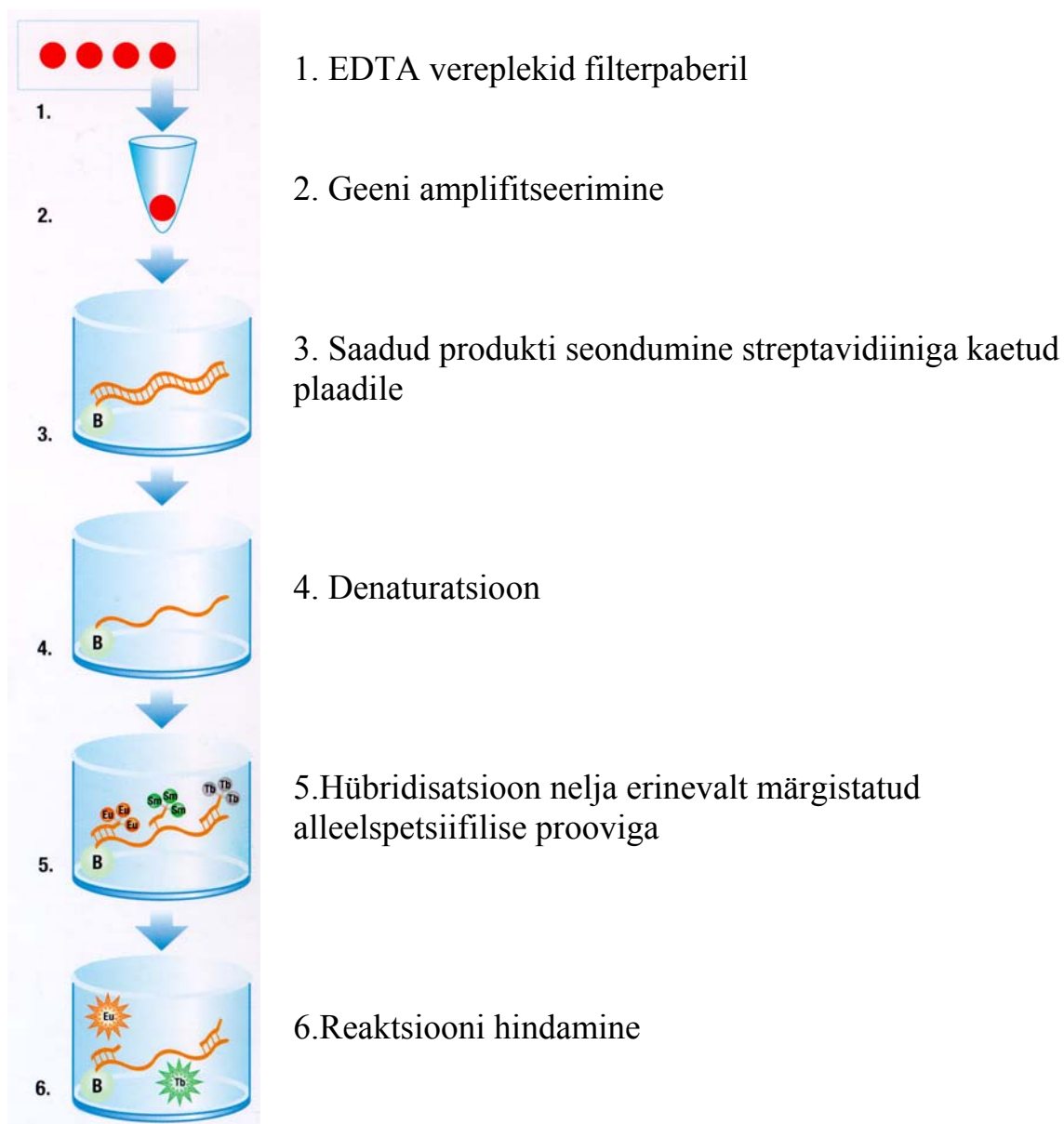
$$EIÜ = \frac{\text{uuritava seerumi OD} - \text{neg. kontrollseerumi OD}}{\text{pos. kontrollseerumi OD} - \text{neg. kontrollseerumi OD}} \times 100$$

Positiivseks kontrollseerumiks oli kõrge tiitriga enteroviiruse vastaste antikehadega lapse seerum. Negatiivseks kontrollseerumiks oli valitud populatsiooni keskmisele OD-le vastav seerum. Kontrollseerumid saadi Tampere Ülikoolist. Positiivsuse piiriks võeti 15 EIÜ (Viskari et al 2004).

4.3. Viiruse neutralisatsiooni test.

Soomes määrati Eesti, Soome ja Karjala naistel neutraliseerivad AK coxsackie B4 ja B5 (CBV4, CBV5), echovirus 9 (EV9) ja coxsackie viirus A9 (CAV9) vastu klassikalisel neutralisatsiooni analüüsil (NA) (Roivainen et al 1998). Viiruseid (American Type Culture Collection (ATCC) referentstüved) mõjutati seerumi lahjendustega (1:4 ja 1:256) 1 tund +36°C juures, millele järgnes inkubatsioon toatemperatuuril üle öö. Seejärel lisati viirus kuuekannulisele plaadile (Nunclon, Nunc, Taani) kasutades rakukultuurina Aafrika rohepärdikute neeruparenhüümist pärit monokihti. Viiruse hulka mõõdeti tekkinud laikude järgi peale 46 tunnist inkubeerimist +36°C juures. Seerum loeti positiivseks, kui seerum blokeeris rohkem kui 80% viirusest.

4.4. HLA tüpiseerimine



Eesti uuritavatel määrati suhkurtõve suhtes olulised HLA-DQB1 alleelid hübridisatsiooni meetodil (Sjöroos et al 1995). EDTA katsutisse kogutud verest tehti plekid filterpaberile (Schleicher ja Schuell, Saksamaa). Plekist eraldati spetsiaalse lõikuriga 3 mm diameetriga paberdisk 96 kannulise termotsükleri plaadi kannu. (Thermowell™ 96 well plate, model M, Costar, U.S.A). Igal plaadil oli ka negatiivne kontroll ilma DNA proovita. HLA-DQB1 geeni spetsiifilise piirkonna teine ekson amplifitseeriti kasutades kahte praimerit, millest üks oli biotinüleeritud (CyberGene AB, Rootsi). Saadud produkt kanti üle streptavidiiniga kaetud plaadile (DELFIATM, Wallac Oy, Soome), kus toimus streptavidiini-biotiini seondumine, DNA

denatureerimine ja hübridiseerimine lantanoididega (euroopiumi Eu, samaariumi Sa ja terbiumiga Tb) märgistatud alleelspetsiifiliste proovidega. Hübridisatsiooni kontrollina kasutati teadaolevate alleelidega kolme isiku proove ja negatiivse kontrollina steriilset vett. Iga PCR produkt kanti nelja erinevasse kannu ja hübridiseeriti kahe erineva lahusega. Esimene lahus sisaldas euroopiumiga märgistatud *0602, *0603 proovi (AD0127), samaariumiga märgistatud *0603, *0604 proovi (AD0128) ja terbiumiga märgistatud kõiki siiani tuntud DQB1 alleele sisaldavat proovi (AD0129). Teine lahus sisaldas euroopiumiga märgistatud *030201 proovi (AD0130), samaariumiga märgistatud *0301 proovi (AD0131) ja terbiumiga märgistatud *0201 proovi (AD0132) (kõik proovid DELFIA®, Wallac Oy, Soome). Signaalid loeti Wallac VICTOR™ fluoromeetri abil ja tulemused väljendati osakeste üldarvuna sekundis (cps). Tulemuste interpreteerimiseks kasutati alleelspetsiifiliste proovidega kaasas olnud juhendit (tabel 1). Uuritava proovi cps ja tausta (deioniseeritud vesi) cps suhe näitas amplifikatsiooni taset.

Tabel 1.

“+” märk näitab hübridisatsioonil saadud tulemust

DQB1 alleel	AD0127	AD0128	AD0129	AD0130	AD0131	AD0132
*02			+			+
*0301			+		+	
*030201			+	+		
*0304			+	+	+	
*0602	+		+			
*0603	+	+	+			
*0604		+	+			

Näiteks kui uuritaval on DQB*02 ja *0301, saame hübridisatsioonil positiivse vastuse proovidega ADO129, ADO131 ja ADO 132.

4.5. Esmashaigestumus T1DM

Aasta keskmine T1DM esmashaigestumus 100 000 alla 15-a. lapse kohta saadi 90-ndaid aastaid kajastavatest publikatsioonidest (Podar et al. 2001, Kondrashova et al. 2005, Green et al 2001). Esmashaigestumiskordaja oli Eestis 12,3, Soomes 40,8, Saksamaal 12,0, Ungaris 9,4, Iisraelis 7,3, Leedus 7,8, Venemaal 7,3 ja Rootsis 25,7. Vastavalt sellele moodustasid Soome ja Rootsi kõrge diabeeti haigestumissagedusega grupi ja ülejäänud madala haigestumissagedusega grupi.

4.6. Statistiline analüüs

Mõõdetud parameetreid võrreldi eri gruppide vahel Mann-Whitney U-testi ja hii-ruut testi abil. P väärtused alla 0,05 loeti statistiliselt olulisteks. Seosed neutraliseerivate AK ja geograafilise piirkonna (madal/kõrge diabeedi esinemissagedus) vahel leiti kasutades logistilist regressioonanalüüsi, arvutati ka šansside suhe (OR).

5. TULEMUSED

5.1. Enteroviiruste vastaste antikehade esinemine lastel

ELISA analüüsil ilmnes, et sünnimomendil esines polioviiruse vastaseid IgG tüüpi AK 38-l (31,1%) 122-st lapsest ja IgA tüüpi AK 7-l (21,9%) 32-st lapsest. CBV4 vastased IgG tüüpi AK esines 62-l (71,3%) 87-st ja IgA tüüpi AK 10-l (11,2%) 89-st lapsest. Enteroviiruse peptiidi vastased IgG tüüpi AK esinesid 29-l (40,8%) 71-st lapsest. Sünnil esines vähemalt ühe enteroviiruse vastu antikehi 85-l lapsel (69,1%). Analüüsides antikehade esinemist kahe esimese eluaasta jooksul dünaamikas, leidsime, et kuue kuu vanustel lastel esines antikehi vähemalt ühe enteroviiruse vastu 87,8%-l ja ühe aasta vanustel 77,9%-l. Kahe aasta vanustel lastel olid tekkinud CBV4 vastased IgG tüüpi AK 38,8% ja IgA tüüpi AK 10,9% lastest.

Kõik peale ühe lapse, kelle kohta täpseid andmeid ei saadud, olid vastavalt Eestis käibel oleva vaktsineerimisskeemi järgi vaktsineeritud esimesel eluaastal suukaudse polioviiruse vaktsiiniga. Kahe aasta vanuses leiti neil lastel polioviiruse vastaseid AK 41-l (77,4 %) 53-st lapsest, kusjuures IgG tüüpi AK esines 64,2% ja IgA tüüpi AK 62,3% uuritutest.

Enteroviirusinfektsioonide tekkevõimalus sõltub olulisel määral sellest, missugustes tingimustes laps on kasvanud. Lastekollektiivis oli esimeseks eluaastaks hakanud käima 14 last 68- st (20,6%). Enteroviiruste vastaste AK esinemissagedus ja nivoo ei erinenud nendel lastel, kes viibisid päeval lastekollektiivides või pärinesid suurematest perekondadest (peres 3 või rohkem last), võrreldes nende lastega, kes olid kodused ja väiksematest peredest (tabel 2). Erandina oli CBV esinemissagedus väiksem kodustel ja väiksema pere lastel (tabel 2b).

Tabel 2. (a) Antikehade keskmised väärtused ja (b) esinemissagedus (AK positiivsete arv) sõltuvalt kollektiivist, milles laps viibis.

a

	Üksikud ja väikese pere kodused lapsed	Suure pere lapsed ja kollektiivis käivad lapsed
CBV4 IgG	27,4 (CI 19,9-34,9) EIÜ ^a	20,5 (CI 14,2-26,7) EIÜ ^a
Polio IgG	25,9 (CI 21,5-30,4) EIÜ ^b	33,7 (CI 28,7-38,7) EIÜ ^b
Entero IgG	20,3 (CI 12,5-28,2) EIÜ ^c	11,9 (CI 7,0-16,9) EIÜ ^c

^{a, b, c} p>0,05

b

	Üksikud ja väikese pere kodused lapsed	Suure pere lapsed ja kollektiivis käivad lapsed
CBV4 IgG	20-l 71-st ^a	82-l 185-st ^a
Polio IgG	56-l 91-st	160-l 235-st
Entero IgG	25-l 91-st	89-l 236-st

^a p=0.02

5.2. Enteroviiruste vastaste antikehade esinemine rasedatel.

ELISA tulemused näitasid, et rasedatel olid IgG tüüpi CBV4 AK testid positiivsed 81-l (81%), polioviiruse IgG AK testid 89-l (89%) ja enteroviiruse IgG AK testid 73-l (73%) 100-st uuritud naisest. Seejuures leiti vähemalt üks AK test positiivsena 93%-l uuritutest. Neutraliseerivaid AK esines kõigil rasedatel ühe või mitme enteroviiruse vastu. Seejuures leiti neutralisatsiooni AK tiitris 1/4 CAV9 suhtes 93%, nii CBV4 kui ka EV9 suhtes 86% rasedatest.

Leidmaks korrelatsiooni kahe AK määramise meetodi vahel, võrreldi CBV4 AK esinemist Eesti rasedatel nii neutralisatsiooni- kui ka ELISA analüüsis. Selgus, et mõlema testi tulemused kattusid 73-l (73%) uuritutest (tabel 3). Kahe testi

kombineerimisel leidsime CBV4 AK 96%-l uuritustest. Määrates ELISA meetodil IgG üüpi AK esinemist CBV-4 vastu 38-l ema ja vastsündinu paaril, täheldasime, et testitulemused kattusid 27-l (71,1%) juhtudest.

Tabel 3. CBV4 vastaste antikehade esinemine/puudumine rasedatel määratuna erinevate meetoditega

NA-test n	Positiivne 84		Negatiivne 16	
ELISA	69 ^a	15	12 ^a	4

^a p>0,05

5.3. HLA-DQ alleelide esinemine ja võrdlus enteroviiruste vastaste antikehade olemasoluga.

Diabeedi suhtes kõrge riskiga HLA-DQ alleelid (DQB1*02/0302) esinesid 4-l (4,0%) 100-st naisest ja 3-l (2,4%) 123-st lapsest. Keskmise riskiga (DQB1*0302/x, kus x=*0302 või oli defineerimata alleel) naisi oli 1 (1,0%) ja lapsi 5 (4,1%), madala riskiga (DQB1*0301/0302, *02/0301, *02/x, *0302/0602, *0302/0603, kus x=*02 või defineerimata alleel) vastavalt 25 (25,0%) ja 31 (25,2%) ja vähese riskiga (DQB1*0301/x, x/x, *02/0602, *02/0603, *0602/x, *0603/x, kus x tähistab defineerimata alleeli) vastavalt 74 (74,0%) ja 84 (68,3%). Seost HLA erinevate alleelide ja enteroviiruste vastaste AK esinemise vahel ei leitud (tabel 4).

Tabel 4. HLA alleelid ja AK keskmised väärtused lastel

	Kõrge ja mõõduka riskiga HLA – DQB1 alleelid	Madala ja vähenenud riskiga HLA – DQB1 alleelid
CBV-4 AK	18,4 (CI 4,7-32,0) EIÜ ^a	23,7 (CI 19,4-29,9) EIÜ ^a
Polio AK	23,7 (CI 14,1-33,4) EIÜ ^b	30,0 (CI 26,4-33,7) EIÜ ^b
Entero AK	12,0 (CI 4,4-19,7) EIÜ ^c	24,0 (CI 18,8-29,2) EIÜ ^c

^{a, b, c} p>0,05

5.4. Rahvusvaheline võrdlus

Võrreldes Eesti naistel esinevate enteroviiruste vastaste neutraliseerivate AK esinemissagedust samade parameetritega Soome ja Venemaa Karjala regiooni naistel, täheldasime esinemissageduse sarnasust Karjala naistega. Koosvõetuna oli Eesti ja Karjala rasedatel vastavate AK esinemissagedus väga oluliselt erinev võrreldes AK esinemissagedusega Soome rasedatel ($p < 0,0001$). Mitut AK korraga (kolm või neli neljast testitud AK) leiti oluliselt sagedamini Eestis ja Karjalas võrreldes Soomega (tabel 5). Sama erinevust peegeldas ka tiitrist sõltuv vastus mitmese regressioonianalüüsi tulemustes: võrreldes seronegatiivsetega, tõusis šansside suhe (OR) 2,4-lt 9,1, 31,5 ja 66,9-ni vastavalt testitud antikehade arvule (vastavalt üks, kaks, kolm, neli testitud viirust).

Tabel 5. Seropositiivsete naiste neutraliseerivate AK levimus (%) (95%CI)

Antikeha	Soome (n=200)	Eesti ja Karjala (n=203)
Tiiter 1/4		
CBV4	57,5 (50,6-64,5)	85,7 ^b (80,2-89,9); 84 (75-90)*
CBV5	53,0 (46,1-59,8)	71,9 ^b (85,8-93,9); 70 (60-79)*
CAV9	65,0 (58,2-71,3)	90,6 ^b (85,8-93,9); 86 (77-92)*
EV9	40,5 (33,9-47,4)	85,7 ^b (80,2-89,9); 93 (86-97)*
Mitu AK (3-4)	38,5 (32,0-45,4)	84,2 ^b (78,6-88,6); 81 (72-88)*
Tiiter 1/256		
CBV4	41,0 (34,4-47,9)	47,8 (41,0-54,6); 48 (38-58)*
CBV5	16,0 (11,6-21,7)	17,2 (12,7-23,0); 21 (14-31)*
CAV9	51,5 (44,6-58,3)	64,0 (57,2-70,3); 36 (27-46)*
EV9	21,5 (16,4-27,7)	34,0 ^c (27,8-40,7); 66 (56-75)*
Mitu AK (3-4)	11,0 (7,4-16,1)	19,7 ^a (14,8-25,7); 21 (14-31)*

CBV4 Coxsackie virus B4; CBV5 Coxsackie virus B5; CAV9 Coxsackie virus A9;

EV9 Echovirus 9

^a $p < 0,05$; ^b $p < 0,0001$; ^c $p < 0,01$

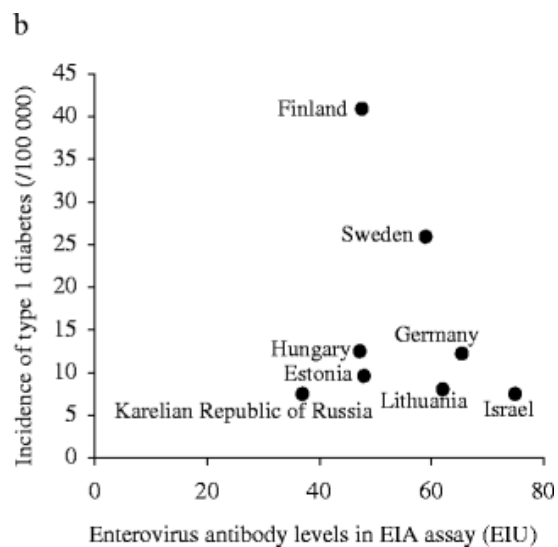
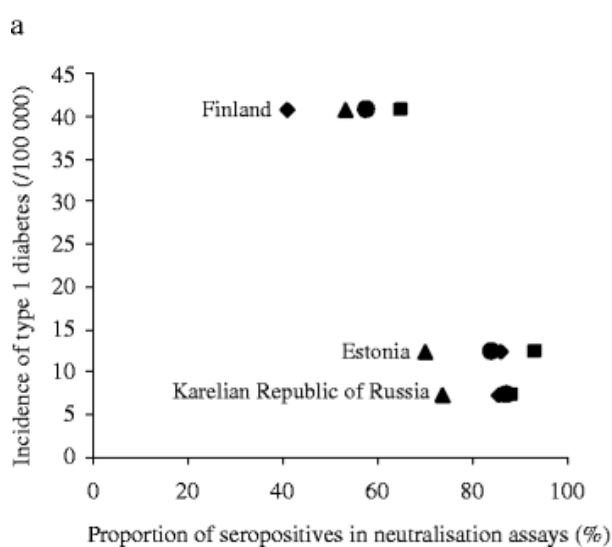
*Eesti kohta käivad andmed eraldivõetuna

Lisaks madalas tiitris antikehadele olid ka kõrges tiitris antikehad (256 või rohkem) sagedasemad Eestis ja Karjalas kui Soomes. See seos ei olnud küll nii tugev kui madala tiitriga antikehade korral, olles statistiliselt oluline ainult EV9 ja mitme antikeha korral (tabel 5). Seda seletab fakt, et Soome seropositiivsetel naistel olid antikehad kõrgemas tiitris kui Eesti ja Karjala seropositiivsetel naistel. Näiteks tugevalt positiivsete hulk seropositiivsete seas Soomes oli 71,3% (CBV4) ja 53,5% (EV9), Eestis ja Karjalas vastavalt 55,7% ja 39,7% ($p < 0,05$). Sarnane tulemus saadi ka analüüsidest antikehade tiitrist sõltuvalt igat serotüüpi eraldi - madala tiitriga (>4) antikehade OR oli kõrgem kui kõrge tiitriga antikehadel. Näiteks esines Eestis ja Karjalas CAV9 neutraliseerivaid AK sagedamini tiitris >4 (OR=8,3) kui tiitris > 256 , võrreldes seronegatiivsetega ($p < 0,001$ mõlema jaoks). Erinevalt neutraliseerivatest antikehadest, enteroviiruse antikehade esinemissagedus sünteetilise peptiidi, PV1 ja CBV4 antigeeni vastu ELISA meetodil ei erinenud Eestis ja Karjalas võrreldes Soomega.

Analüüsidest kõigis madala diabeedi haigestumusega maades ja regioonides (Eesti, Saksamaa, Ungari, Iisrael, Leedu ja Karjala) ELISA meetodil saadud antikehade uurimistulemusi ja võrreldes neid kahe kõrge haigestumusega maade (Soome ja Rootsi) tulemustega, ei leitud märkimisväärseid erinevusi, v.a. CBV4 antikehade nivoo oli veidi kõrgem Soomes ja Rootsis (keskmine 70 vs 59 EIÜ, $p=0,037$). Need uurimistulemused on kajastatud alljärgneval joonisel. Nagu sealt nähtub, esineb negatiivne korrelatsioon diabeedi haigestumissageduse ja neutraliseerivate AK esinemissageduse vahel Soomes, Eestis ja Karjalas (joonis 1a), samal ajal kui erinevate riikide enteroviiruse peptiidse antigeeni vastaste AK nivoo ja diabeedi haigestumissageduse vahel seos puudub (joonis 1b).

Joonis 1 Enteroviiruse Ak ja T1DM esmashaigestumuse hajuvusdiagrammid.

- a) Eesti, Soome ja Karjala seropositiivsete rasedate naiste hulk (%) CBV4 (●), CBV5 (▲), CAV9 (■) ja EV9 (◆) neutralisatsiooni testis vastavalt T1DM esmashaigestumusele (100,000 lapse kohta). b) Enteroviiruse peptiidi AK nivoo (EIÜ) ELISA meetodil erinevates maades arvestades esmashaigestumust T1DM 100,000 lapse kohta.



6. ARUTELU

Antikehade määramist kasutatakse sageli organismi infitseerituse ja läbipõetud infektsioonhaiguse diagnoosimiseks, kuid ka vaktsinatsiooni korral tekkiva immuunvastuse hindamiseks. Et hinnata enteroviirusinfektsioonide esinemist rasedatel ja lastel, määrasime neil enteroviiruste vastaste AK esinemist nii ELISA kui ka neutraliseerivate antikehade meetodil. Need kaks meetodit võimaldavad hinnata erinevaid enteroviiruste vastase immuunsuse aspekte. ELISA meetodil mõõdetud viiruste vastased AK võivad omavahel ristreageeruda ja on seega rohkem grupi-spetsiifilised kui serotüübi-spetsiifilised. Neutraliseerivate AK märklauaks on serotüübi spetsiifiline osa viiruse kapsiidi proteiinis ja vastav test on kõrge tundlikkusega ja spetsiifiline möödunud infektsiooni suhtes. Seejuures on just neutraliseerivatel AK otsene kaitsefunktsioon vastava viirusinfektsiooni suhtes. Vaatamata sellele eelisele, on neutraliseerivate AK test tehniliselt märksa komplitseeritum (vajadus kasutada koekultuure jms.), mistõttu seda kasutatakse ELISA meetodiga võrreldes tunduvalt vähem. Et ELISA ja neutraliseerivate AK meetodi tulemuste kattuvus on suhteliselt hea (73 %), siis teatud juhtudel võib ELISA meetod asendada neutraliseerivate AK testi. Kindlasti on aga eelistatum kasutada korraga mõlemat testi hindamaks enteroviirusinfektsioonide põdemist ja tekkinud kaitsvaid AK samaaegselt. Nende kahe testi tulemusi summeerides võime otsustada küllaldase tõenäosusega, kui suur osa uuritavatest on põdenud vastavat viirusinfektsiooni (Ivanov ja Dragunsky 2005).

Meie uuring näitas, et enteroviiruste esinemissagedus on väga kõrge tõenäoliselt kogu meie elanikkonnas, sest enteroviiruste vastaseid AK esines enamikul uuritud naistest. Ka esimesel kahel eluaastal täheldatud enteroviiruste vastaste AK järkjärguline esinemissageduse tõus näitab veenvalt laste sagedast eksponeeritust enteroviirustele. Seejuures leidsime, et AK esinemissageduse ja nivoo osas puudus oluline erinevus laste vahel, kes pärinesid suurematest perekondadest (peres üle 3 lapse) või käisid regulaarselt lastekollektiivides, võrreldes nendega, kellel oli vähem õdesid-vendi ja kes ei käinud lastekollektiivides. Ilmselt on siin põhjuseks siiski uuritavate väike arv, sest analoogne rahvusvaheline uuring, kuhu kuulus 359 last, tõi selle erinevuse siiski esile (Viskari et al 2004). Erinevus võib samuti olla tingitud

enteroviirusinfektsioonide erinevast esinemissagedusest aastate ja kuude lõikes ning lisaks asjaolust, et käesolevas töös uuriti väiksemate linnade (Võru, Tartu) elanikke, kus asustustihedus ja lastekollektiivid on väiksemad ja tõenäoliselt läksid antud uuringus lapsed kollektiivi hiljem.

Oluline on märkida, et ka põhiliste enteroviiruste tüüpide (CBV4, CBV5, EV9 ja CAV9) vastaseid neutraliseerivaid AK esines enamikul uuritavatel, kusjuures vähemalt üht tüüpi neutraliseerivaid AK leiti kõigil rasedatel. Kuivõrd emal olevad IgG tüüpi AK läbivad platsentat ning IgA tüüpi AK sisalduvad rinnapiimas, siis võib järeldada, et nii looted kui ka vastsündinud on enamasti hästi kaitstud enamlevinud enteroviiruste eest. Selle tõestuseks on ka fakt, et nabaväädiveres leiti enamike enteroviirustega ristireageeruvaid (peptiidi KEVPALTAVETGAT-C vastaseid) IgG tüüpi AK 40,8 %-l ja CBV4 antikehi 71,3 % uuritud lastest. Fakti, et vastsündinute nabaveres leiti ka IgA tüüpi enteroviiruste vastaseid AK, on raske interpreteerida, sest seni peetakse vaid IgG tüüpi AK platsentat läbivateks. Siiski on ka teistes uuringutes tuvastatud IgA tüüpi antikehi nabaväädi ja loote veres (Mellander et al 1986, Hahn-Zoric et al 1992, Weemaes et al 2003), mis sunnib sellele fenomenile edasistes uuringutes erilist tähelepanu pöörama.

Neutraliseerivate AK esinemissageduse erinevus Karjala, Eesti ja Soome uuritute seas on olulise tähendusega ja lubab arvata, et Soome naised on põdenud vähem enteroviirusinfektsioone. See tulemus toetab hüpoteesi, et enteroviiruste vastaste neutraliseerivate AK harvem esinemine elanikkonnas loob eeldused imikute ja väikelaste nakatumiseks T1DM tekkes osalevate enteroviirustega. Näiteks 2001 aastal puudusid 42% Soome rasedatest CBV4 antikehad ja seega puudus nende lastel kaitse selle konkreetse kõige sagedamini T1DM seostatud enteroviiruse serotüübi vastu. Vastav näitaja Karjalas ja Eestis oli 14%. On oluline märkida, et AK positiivsetest emadest (keda oli 96 %), leiti mitu antikeha vastavalt 39%-l Soome ja 84%-l Eesti ning Karjala emadel.

Samas näitab meie uuring, et mitte alati ei ole ema verest raseduse jooksul leitud AK tuvastatavad vastsündinu veres. Nii leidsime, et vaid 71 %-l ema-vastsündinu paarist olid CBV4 AK testi tulemused kattuvad. Siin võib olla mitmeid põhjusi, millest eeskätt võiks mainida ema immuunsüsteemi nõrka ja lühiaegset reageerimist vastava

enteroviiruse suhtes. Samas pole välistatud ka asjaolu, et vastsündinu veres esinesid AK sellises kontsentratsioonis, mis on allpool testi tundlikkust. Emalt saadud AK hulk hakkab kahanema peale sünni, mille tulemusena aegamööda kasvab ka vastuvõtlikkus infektsioonidele. Kirjanduse andmetel on 30-50% lastest 6-ndaks elukuuks põdenud juba enteroviirusinfektsioone, millest annab tunnistust vastavate antikehade olemasolu (Juhela et al 2000). Sama täheldasime ka meie, kusjuures 6 kuu vanustel imikutel leidsime enteroviiruste vastaseid antikehi juba 87,8%-l uuritutest. Kuigi lapsed olid poliomüeliidi vastu vaksineeritud, leidsime polioviiruse vastaseid antikehi 77,4%-l. Kuna laste grupil neutraliseerivaid antikehi ei määratud, ei saa ainult ELISA analüüsi põhjal otsustada vaksineerimise efektiivsuse üle.

Et HLA-I on võtmeroll immuunreaktsioonide tekkes, analüüsisime, kas diabeedi suhtes erinevat rolli omavad HLA-DQ fenotüübid võiksid määrata enteroviiruste suhtes kujunenud immuunvastuse taset. Meie tulemused näitasid, et AK hulk ei olnud erinev diabeedi suhtes kõrget ja mõõdukat tekkeriski omavaid HLA-DQ alleele (DQB1*02/0302 ja DQB1*0302/x) ja madalat tekkeriski omavaid HLA-DQ alleele (DQB1*0301/0302, *02/0301, *02/x, *0302/0602, *0302/0603) kandvate laste vahel. Seega meie tulemused ei kinnita varasemat leidu, kus HLA-DQ *0302 alleeli omavatel isikutel oli vähem enteroviiruste vastaseid AK (Sadeharju et al 2003). Samas tuleb muidugi rõhutada, et viimatinimetaud HLA-DQ alleeli esines meie poolt uuritute hulgas vaid 3-l lapsel, mistõttu selliste uuritavate vähesus võis mõjutada saadud tulemust. Edasised suuremamahulised uuringud peavad näitama, kas Sadeharju ja kaasautorite poolt leitud seos kehtib ka Eesti elanikkonnas. See uuring eeldab aga märkimisväärseid ressursse, sest T1DM haigestumise suhtes suurenenud riski omavate HLA DQB1 alleelide esinemissagedus on Eesti populatsioonis suhteliselt väike – ainult 6,1% (Salur ja Uibo 2004), mis teeb vastava materjali kogumise äärmiselt raskeks. Nii näiteks tuleb selleks, et saada andmeid vähemalt 50-lt diabeedi kõrgenenud riski omavalt isikult, uurida kokku vähemalt 834 last.

Seega võib töö kokkuvõtteks öelda, et erinevate enteroviiruste vastaseid AK esineb valdaval enamusel rasedatest, mis tagab vastsündinule vajaliku kaitse enteroviirusinfektsioonide vastu. Emalt saadud neutraliseerivad antikehad kaitsevad vastsündinut esimesed 3-9 kuud peale sünni. Sel ajal toimub tavaliselt lapse esimene kokkupuude viirusinfektsiooniga ja areneb tema immuunsüsteem. Imikueas ja kahe

aasta vanustel lastel leidub enteroviiruste vastaseid AK, sealhulgas ka vaksineerimisega seotud polioviiruse vastaseid AK harvem, kuid siiski enamikul uuritud lastest. Soome ja Rootsi rasedatel leitud väiksem enteroviiruste antikehade esinemissagedus on kooskõlas varem välja pakutud polio hüpoteesiga (Hyöty ja Taylor 2002, Viskari et al 2000, Viskari et al 2004, Lönnrot 1999). Vastavalt sellele hüpoteesile, tõstab enteroviiruste antikehade madal esinemissagedus taustpopulatsioonis laste vastuvõtlikkust diabetogeensetele viirustele. Kõrge T1DM tekkeriskiga elanikkonnas on kasvanud emade hulk, kellel pole enteroviiruste vastaseid antikehi ja lapse esimene infektsioon tekib peale emalt saadud kaitsvate antikehade kadumist. Sarnane seos esines ka poliomieliidi korral, kui haigusjuhtude arvu vähenedes suurenes paralüüside osakaal.

7. JÄRELDUSED

1. Enteroviiruste esinemissagedus on väga kõrge tõenäoliselt kogu meie elanikkonnas, sest ELISA meetodil määratud enteroviiruste coxsackie B4, polioviiruse ja sünteetilise peptiidi KEVPALTAVETGAT-C vastaseid AK esines enamikul uuritud naistest. Ka lastel täheldati kahel esimesel eluaastal enteroviiruste vastaste antikehade esinemissageduse järkjärgulist tõusu.
2. Kuigi ELISA meetodil ei leitud 7 rasedal ühegi uuritud enteroviiruse vastaseid AK, siis vähemalt üht tüüpi neutraliseerivaid AK leiti kõigil rasedatel. Kuivõrd emal olevad IgG tüüpi antikehad läbivad platsentat ja lähevad sealtskaudu lapse organismi ning IgA tüüpi AK leidub rinnapiimas, on alust arvata, et meie vastsündinud on enamasti kaitstud enamlevinud enteroviiruste eest, sealhulgas nende enteroviiruste eest, mis võivad osaleda 1. tüüpi diabeedi tekkes.
3. Diabeedi suhtes kõrget ja keskmist tekkeriski kandvaid HLA-DQB1 alleele (DQB1*02/0302 ja DQB1*0302/x) omavate laste enteroviiruste vastaste antikehade nivoo ei erinenud madalat tekkeriski ja kaitsvaid alleele (DQB1*0301/0302, *02/0301, *02/x, *0302/0602, *0302/0603 ja DQB1*0301/x, x/x, *02/0602, *02/0603, *0602/x, *0603/x) omavate laste omast.
4. Neutraliseerivad enteroviiruste vastased AK olid Eesti ja Venemaa Karjala regiooni rasedatel sagedasemad võrreldes Soome naistega. Seevastu ELISA meetodil määratud antikehade esinemine enteroviiruste sünteetilise peptiidi, polioviiruse PV1 ja coxsackie-viiruse CBV4 vastu kõigis madala T1DM haigestumusega maades ja regioonides (Eesti, Karjala, Saksamaa, Ungari, Iisrael, Leedu) ei erinenud kahes kõrge T1DM haigestumusega maades (Soome, Rootsi) saadud AK tulemustest.

8. KASUTATUD KIRJANDUS

Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and molecular immunology. 5th ed. 2003, Elsevier Science, USA

Adojaan B, Podar T. Lapseeas alanud insuliinisõltuva suhkurtõve immunoloogilised ja geneetilised tegurid Eestis. Eesti Arst 1998; 6: 488-491

Åkeblom HK, Vaarala O, Hyöty H, Ilonen J, Knip M. Environmental Factors in the Etiology of Type 1 Diabetes. Am J Med Genetics (Semin Med Genet) 2002; 115: 18-29

Atkinson MA, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. Lancet 2001; 358: 221-229

Bach JF, Garchon HJ, van Endert P. Genetics of human type 1 diabetes. In: von Herrath MG, ed. Molecular pathology of type 1 diabetes mellitus. Basel: Karger; 2001, 1-30

Baekkeskov S, Nielsen JH, Marner B, Bilde T, Ludvigsson J, Lernmark Å. Autoantibodies in newly diagnosed diabetic children immunoprecipitate human pancreatic islet cell proteins. Nature 1982; 298: 167-169

Baekkeskov S, Aanstoot HJ, Christgau S, Reetz A, Solimena M, Cascalho M, Folli F, Richter-Olesen H, De Camilli P. Identification of the 64K autoantigen in insulin-dependent diabetes as the GABA-synthetizing enzyme glutamic acid decarboxylase. Nature 1990; 347: 151-156

Bell GI, Horita S, Karam JH. A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin-dependent diabetes mellitus. Diabetes 1984; 33: 176-183

Bennet ST, Wilson AJ, Esposito L, Bouzekri J, Undlien D, Cucca F, Buzzetti R, Bosi E, Pociot F, Nerup J, Cambon-Thomsen A, Pugliese A, Shield JP, McKinney PA, Bain SC, Polychronakos C, Todd JA. Insulin VNTR allele-specific effect in type 1 diabetes depends on identity of untransmitted paternal allele. Nat Genet 1997; 17: 350-352

Brunet JF, Denizot F, Luciani MF, Roux-Dosseto M, Suzan M, Mattei MG, Golstein P. A new member of the immunoglobulin superfamily-CTLA-4. Nature 1987; 328: 267-270

Bu D-F, Erlander MG, Hitz BC, Tillakaratne NJ, Kaufman DL, Wagner-McPherson CB, Evans GA, Tobin AJ. Two human glutamate decarboxylase, 65-kDa and 67-kDa

GAD, are each encoded by a single gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 2115-2119

Cohen IR. Short analytic review. The Th1/Th2 dichotomy, hsp60 autoimmunity, and type I diabetes. *Cl Immunol and Immunopath* 1997; 84 (2), 103-106

DeStefano F, Mullooly JP, Okoro CA, Chen RT, Marcy SM, Ward JI, Valdheim M, Black SB, Shinefield HR, Davis RL, Bohlke K, Vaccine Safety Datalink Team. Childhood vaccinations, vaccination timing, and risk of type 1 diabetes mellitus. *Pediatrics* 2001; 108 (6):1360-1364

Eissa MAH, Gunner KB. Evaluation and management of obesity in children and adolescents. *J Pediatr Health Care* 2004; 18 (1): 35-38

Emery LM, Babu S, Bugawan TL, Norris JM, Erlich HA, Eisenbarth GS, Rewers M. Newborn HLA-RD, DQ genotype screening: age-and ethnicity-specific type 1 diabetes risk estimates. *Ped Diabetes* 2005; 6: 136-144

Evans CF, Horwitz MS, Hobbs MV, Oldstone MB. Viral infection of transgenic mice expressing a viral protein in oligodendrocytes leads to chronic central nervous system autoimmune disease. *J Exp Med* 1996; 184: 2371-2384

Fairweather D, Rose NR. Type I diabetes: virus infection or autoimmune disease? *Nat Imm* 2002; 3 (4): 338-340

Flippi C, von Herrath M. How viral infections affect the autoimmune process leading to type 1 diabetes. *Cellular Immunology* 2005; 233: 125-132

Gorodezky C, Alaez C, Murguia A, Rodriguez A, Balladares S, Vazquez M, Flores H, Robles C. HLA and autoimmune disease: Type 1 diabetes (T1D) as an example. *Autoimmunity Rev* 2006; 5: 187-194

Green A, Patterson CC. Trends in the incidence of childhood-onset diabetes in Europe 1989-1998. *Diabetologia* 2001; 44 (Suppl 3): B3-B8

Hahn-Zoric M, Carlsson B, Bjorkander J, Osterhaus AD, Mellander L, Hanson LA. Presence of non-maternal antibodies in newborns of mothers with antibody deficiencies. *Pediatr Res* 1992; 32 (2): 150-154

Haller K, Kisand K, Nemvalts V, Laine AP, Ilonen J, Uibo R. Type 1 diabetes is insulin -2221 MspI and CTLA-4 +49 A/G polymorphism dependent. *Eur J Clin Invest* 2004; 34:543-548

Hauben E, Roncarolo MG, Nevo U, Schwartz M. Beneficial autoimmunity in type 1 diabetes mellitus. *Trends in Immunol* 2005; 26 (5): 248-253

Haverkos HW, Battula N, Drotman DP, Rennet OM. Enteroviruses and type 1 diabetes mellitus. *Biomed & Pharmacotherapy* 2003; 57: 379-385

Hawa MI, Beyan H, Buckley LR, Leslie RDG. Impact of genetic and non-genetic factors in type 1 diabetes. *Am J Med Genetics (Semin Med Genet)* 2002; 115: 8-17

Horwitz MS, Bradley LM, Harbertson J, Krahl T, Lee J, Sarvetnick N. Diabetes induced by Coxsackie virus: initiation by bystander damage and not molecular mimicry. *Nat Med* 1998; 4 (7): 781-785

Horwitz M S, Ilic A, Fine C, Balasa B, Sarvetnick. Coxsackieviral-mediated diabetes: induction requires antigen-presenting cells and is accompanied by phagocytosis of beta cells. *Clinical Immunology* 2004; 110:134-144

Hummel M, Fuchtenbuch M, Schenker M, Ziegler A-G. No major association of breast-feeding, vaccinations, and childhood viral diseases with early islet autoimmunity in the German BABYDIAB study. *Diabetes Care* 2000; 23: 969-974

Hviid A, Stellfeld M, Wohlfahrt J, Melbye M. Childhood vaccination and type 1 diabetes. *N Engl J Med* 2004; 350: 1398-1404

Hyöty H, Hiltunen M, Knip M, Laakonen M, Vähäsalo P, Karjalainen J, Koskela P, Roivainen M, Leinikki P, Hovi T, Åkerblom HK, and the Childhood Diabetes in Finland (DiMe) Study Group. A prospective study of the role of coxsackie B and other enterovirus infections in the pathogenesis of IDDM. *Diabetes* 1995; 44: 652-7.

Hyöty H, Taylor KW. The role of viruses in human diabetes. *Diabetologia* 2002; 45: 1353-1361

Ide A, Eisenbarth GS. Genetic susceptibility in type 1 diabetes and its associated autoimmune disorders. *Rev Endocr and Metab Disorders* 2003; 4: 243-253

Ilonen J, Sjöroos M, Knip M, Veijola R, Simell O, Åkerblom HK, Paschou P, Bozas E, Havarani B, Malamitsi-Puchner A, Thymelli J, Vazeou A, Bartsocas CS. Estimation of genetic risk for type 1 diabetes. *Am J Med Genetics. (Semin Med Genet)* 2002, 115:30-36

Ivanov A, Dragunsky EM. ELISA as a possible alternative to the neutralization test for evaluating the immune response to poliovirus vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2005; 4 (2): 167-172

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. *Immunobiology: The immune system in health and disease*. 2001, Garland Publishing, New York

Juhela S, Hyöty H, Roivainen M, Härkönen T, Putto-Laurila A, Simell O, Ilonen J. T-cell responses to enterovirus antigens in children with type 1 diabetes. *Diabetes* 2000; 49:1308-1313

Jun H-S, Yoon J-W. A new look at viruses in type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 2003; 19: 8-31

Karlsson MGE, Sederholm Lawesson S, Ludvigsson J. Th1-like dominance in high-risk first-degree relatives of type I diabetic patients. *Diabetologia* 2000; 43: 742-749

Khalil I, d'Auriol L, Gobet M, Morin L, Lepage V, Deschamps I, Park MS, Degos L, Galibert F, Hors J. A combination of HLA-DQ beta Asp57-negative and HLA DQ alpha Arg52 confers susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1990; 85: 1315-1319

Kimpimäki T, Kulmala P, Savola K, Kupila A, Korhonen S, Simell T, Ilonen J, Simell O, Knip M. Natural History of β -Cell Autoimmunity in Young Children with Increased Genetic Susceptibility to Type 1 Diabetes Recruited from the General Population. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 4572-4579

Knip M. Environmental triggers and determinants of β -cell autoimmunity and type 1 diabetes. *Rev Endocr Metab Disord* 2003; 4: 213-223

Knip M, Veijola R, Virtanen SM, Hyöty H, Vaarala O, Åkerblom HK. Environmental triggers and determinants of type 1 diabetes. *Diabetes* 2005; 54: S125-S136

Kondrashova A, Reunanen A, Romanov A, Karvonen A, Viskari H, Vesikari T, Ilonen J, Knip M, Hyöty H. A six-fold gradient in the incidence of type 1 diabetes at the eastern border of Finland. *Ann Med* 2005; 37(1): 67-72

Kukko M, Kimpimäki T, Kupila A, Korhonen S, Kulmala P, Savola K, Simell T, Keskinen P, Ilonen J, Simell O, Knip M. Signs of beta-cell autoimmunity and HLA-defined diabetes susceptibility in the Finnish population: the sib cohort from the Type 1 Diabetes Prediction and Prevention Study. *Diabetologia* 2003; 46: 65-70

Kulmala P, Rahko J, Savola K, Vähäsalo P, Veijola R, Sjöroos M, Reunanen A, Ilonen J, Knip M. Stability of autoantibodies and their relation to genetic and metabolic markers of Type I diabetes in initially unaffected schoolchildren. *Diabetologia* 2000; 43: 457-464

Kulmala P, Rahko J, Savola K, Vähäsalo P, Sjöroos M, Reunanen A, Ilonen J, Knip M. β -Cell Autoimmunity, Genetic Susceptibility, and Progression to Type 1 Diabetes in Unaffected Schoolchildren. *Diabetes Care* 2001; 24: 171-173

LaGasse JM, Brantley MS, Leech NJ, Rowe RE, Monks S, Palmer JP, Nepom GT, McCulloch DK, Hagopian WA. Successful prospective prediction of type 1 diabetes in schoolchildren through multiple defined autoantibodies. *Diabetes Care* 2002; 25: 505-511

Leslie RDG, Atkinson MA, Notkins AL. Autoantigens IA-2 and GAD in Type I (insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 1999; 42: 3-14

Lönnrot M, Knip M, Marciulionyte D, Rahko J, Urbonaite B, Moore WP, Vilja P, Hyöty H. Enterovirus antibodies in relation to islet cell antibodies in two populations with high and low incidence of type 1 diabetes. *Diabetes Care* 1999; 22: 2086-2088

Mellander L, Carlsson B, Hanson LA. Secretory Iga and IgM antibodies to E. Coli O and poliovirus type 1 antigens occur in amniotic fluid, meconium and saliva from newborns. A neonatal immune response without antigenic exposure: a result of anti-idiotypic induction? *Clin Exp Immunol* 1986; 63 (3): 555-561

Modlin JF. Introduction to the enteroviruses. In: Mandell GL, Bennett JE, Dohn R eds. *Principles and practice of infectious diseases*. 6th ed, Elsevier Inc. 2005; 2133-2140

Moore M, Morens DM. Enteroviruses, including polioviruses. In: Belshe RB, ed. *Textbook of human virology*. Littleton, MA: PSG Publishing Co, 1984, 407-483.

Moustakas AK, Papadopoulos GK. Molecular properties of HLA-DQ alleles conferring susceptibility to or protection from insulin-dependent diabetes mellitus: keys to the fate of islet β -cells. *Am J Med Gen (Sem Med Gen)* 2002; 115: 37-47

Nahill SR, Welsh RM. High frequency of cross-reactive cytotoxic T lymphocytes elicited during the virus-induced polyclonal cytotoxic T lymphocyte response. *J Exp Med* 1993; 177: 317-327

Nistico L, Buzzetti R, Pritchard LE, van der Auwera B, Giovannini C, Bosi E, Larrad MT, Rios MS, Chow CC, Cockram Cs, Jacobs K, Mijovic C, Bain SC, Barnett AH, Vandewalle CL, Schuit F, Gorus FK, Tosi R, Pozzilli P, Todd JA. The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. *Belgian Diabetes Registry. Hum Mol Genet* 1996; 7: 1075-1080

Notkins AL, Lernmark Å. Autoimmune type 1 diabetes: resolved and unresolved issues. *J Clin Invest* 2001; 108: 1247-1252

Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Flemister MR, Brown BA, Pallansch MA. Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1288-1293

- Palmer JP. Insulin autoantibodies: their role in the pathogenesis of IDDM. *Diabetes Metab Rev* 1987; 3: 1005-1015
- Podar T, Solntsev A, Karvonen M, Padaiga Z, Brigis G, Urbonaite B, Viik-Kajander M, Reunanen A, Tuomilehto J. Increasing incidence of childhood-onset Type I diabetes in 3 Baltic countries and Finland 1983-1998. *Diabetologia* 2001; 44 (Suppl): B17-B20
- Robles DT, Eisenbarth GS Diabetes and related autoimmune diseases. In: Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Kotzin BL, Schroeder Jr HW, eds. *Clinical Immunology principles and practice*. 2nd ed.vol. 2. Mosby, 2001, 82.1-82.18
- Roivainen M, Knip M, Hyöty H, Kulmala P, Hiltunen M, Vähäsalo P, Hovi T, Åkerblom HK. Several different enterovirus serotypes can be associated with prediabetic autoimmune episodes and onset of overt IDDM. Childhood Diabetes in Finland (DiMe) Study Group. *J Med Virol* 1998; 56:74-78
- Ronningen KS, Kleiding N, Green A. Correlations between the incidence of childhood-onset type I diabetes in Europe and HLA genotypes *Diabetologia* 2001; 44 (Suppl): B51-B59
- Sadeharju K, Hämäläinen A-M, Knip M, Lönnrot M, Koskela P, Virtanen SM, Ilonen J, Åkerblom HK, Hyöty H, the Finnish TRIGR Study Group. Enterovirus infections as risk factor for type I diabetes: virus analyses in a dietary intervention trial. *Clin Exp Immunol* 2003; 132: 271-277
- Salur L, Uibo R. Suhkurtõve immunoloogilisi aspekte. *Eesti Arst* 2004; 83 829:112-116
- Santamaria P. Effector lymphocytes in islet cell autoimmunity. *Rev Endocr Metab Dis* 2003; 4: 271-280
- Sjöroos M, Iitiä A, Ilonen J, Reijonen H, Lövgren T. Triple-label Hybridisation assay for type-I diabetes related HLA alleles. *Biotechniques* 1995; 18:870-7
- Tillmann V, Kulakova N, Heilman K, Einberg U. Increasing incidence of childhood-onset type I diabetes in Estonia 1983-2003. *Pediatric Diabetes* 2004; 5: 23
- Todd JA, Bell JI, McDevitt HO. HLA-DQ beta gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 1987; 329: 599-604
- Viskari H, Koskela P, Lönnrot M, Luonuansuu S, Reunanen A, Baer M, Hyöty H. Can enterovirus infections explain the increasing incidence of type 1 diabetes? *Diabetes Care* 2000; 23, 414-416

Viskari H, Ludvigsson J, Uibo R, Salur L, Marciulionyte D, Hermann R, Soltesz G, Fuchtenbusch M, Ziegler A-G, Kondrashova A, Romanov A, Knip M, Hyöty H. Relationship between the incidence of type 1 diabetes and enterovirus infections in different European populations-results from the EPIVIR project. *J Med Virol* 2004; 72:610-617

Weemaes C, Klasen I, Göertz J, Beldhuis-Valkis M, Olafsson O, Haraldssons A. Development of immunoglobulin A in infancy and childhood. *Scand J Immunol* 2003; 58: 642-648

SUMMARY

The incidence of type 1 diabetes (T1DM) has increased worldwide over recent decades, and the incidence varies remarkably even among geographically close countries, such as Finland compared with Estonia and Russia. The reason behind this epidemiological pattern has remained obscure, although it has been related to certain risk factors for T1DM, such as enterovirus infections. Enterovirus infections are one of the most common virus infections throughout childhood. Enteroviruses are small non-enveloped RNA viruses, which belong to the picornavirus family. The group of enteroviruses comprises more than 60 serotypes and the infections are usually asymptomatic or mild flu-like diseases. Protection against enterovirus infection depends mainly on neutralising antibodies. Passively acquired neutralising antibodies protect newborn infants for the first 6-9 months, during which time the child can develop his/her own specific immunity.

In the present study we analysed the frequency of T1DM associated enterovirus antibodies in Estonia. We also tried to find out, if diabetes-associated HLA-DQB1 alleles are involved in immune response against enterovirus antigens. As polioviruses are enteroviruses, poliovaccinations were also recorded. The study was a part of an international study EPIVIR and so we compared our data with the data from EPIVIR study.

Study design: The Estonian study group comprised 123 babies (56 M and 67 F) born at the Hospital of South-Estonia and 100 pregnant women (50 from Tartu and 50 from Võru, mean age 28.1 ± 8.1 SD years). Blood samples were drawn at birth (cord blood), at 6, 12 and 24 months of age during May 2000 till August 2003. Sera from pregnant women were collected at the end of the first trimester of pregnancy from randomly selected women during their regular visit to the prenatal clinic.

International comparison: eight countries in Europe with different incidences of type 1 diabetes were included in the study. The high-incidence countries comprised Finland (104 pregnant women, mean age 28.8 ± 4.7 SD years) and Sweden (n=128, mean age 29.7 ± 4.0 SD years), while the low- and intermediate-incidence countries included, in addition to Estonia, Germany (n=110, mean age 32.9 ± 4.6 SD years), Hungary (n=100, mean age 27.5 ± 4.7 SD years), Israel (n=377, mean age 29.1 ± 5.0 SD years), Lithuania (n=154, mean age 26.5 ± 5.1 SD years) and Russian Karelia (n=103,

mean age 25.9±5.5 SD years). The sera were collected throughout the year during the years 1999-2001.

Results: The frequency of enterovirus infections in Estonia was studied by analyzing IgG and IgA class enterovirus antibodies in all groups using both ELISA to measure group specific (CBV4, poliovirus and a synthetic enterovirus peptide KEVPALTAVETGAT-C) antibodies and a neutralisation assay to measure serotype-specific (CBV4, CBV5, EV9, CAV9) antibodies in the international comparison.

At birth 31.1% of infants had IgG type antibodies and 21.9% had IgA type antibodies against poliovirus. In the cord blood antibodies against at least one enterovirus were detected in 85 children (69.1%), at the age of 6 month in 87.8% and at the age of 12 months in 77.9% of the children. At the age of 24 months after poliovirus vaccination antibodies against poliovirus were found in 77.4% of the children. At the same age 38.8% had IgG type and 10.9% had IgA type antibodies against CBV4. Almost all pregnant women tested positive for enterovirus antibodies. No association of antibodies positivity with diabetes associated HLA-DQB1 alleles was found.

International comparison: The neutralising antibodies were more frequent in the low-incidence countries. Multiple antibodies (three or four of the four viruses tested) were significantly more frequent in Estonia and Karelia than in Finland. When serotypes were tested separately, all four tested viruses showed a 20-45% difference in antibody prevalence at a titer greater than 4 ($p < 0.0001$ for all comparisons in binomial logistic regression). In addition to the low-titre antibodies, the high-titre antibodies (256 or higher) were also more frequent in Estonia and Karelia than in Finland. In contrast to neutralising antibodies, enterovirus antibodies measured against the synthetic enterovirus peptide and the PV1 and CBV4 antigens using ELISA did not differ between Estonia and Karelia compared with Finland. The country-specific levels of enterovirus antibodies did not show any correlation with the incidence of type 1 diabetes.

Conclusions: The enterovirus antibody status is often used to reflect the frequency of infections in studied persons. The results suggest that the enterovirus infections are quite common in our population, because almost all pregnant women tested positive for enterovirus antibodies. During the first two years of life the frequency of enterovirus antibodies was constantly raising, which shows that the infants are continuously exposed to enterovirus infections. The mother plays a very

important role in the immunity of the newborn baby. The neutralising antibodies provided by the mother protect the offspring for the first 3-9 months after birth, after which the child develops his/her own specific immunity. In our study 87.8% of the 6 months old children had antibodies against enteroviruses. The international study, where Estonian material was included, supported previous observations of an inverse relationship between the frequency of type 1 diabetes and enterovirus infections in the background population.

TÄNUAVALDUSED

Minu siiras tänu kõigile, kes osalesid selles töös või aitasid kaasa selle teoks saamisele:

- Minu juhendajale prof. Raivo Uibole igakülgse toetuse ja abi eest.
- Soome kaasautortele Hanna Viskarile ja Heikki Hyötyle, väärtuslike nõuannete ja kommentaaride eest ning kes varustasid meie laborit ELISA testiks vajalike enteroviiruste antigeenidega. Ühiste arutelude käigus tekkinud mõtted aitasid kaasa töö valmimisele.
- Kolleegidele immunoloogia õppetoolist, kes olid alati valmis aitama nii praktilistes töödes kui ka teoreetiliste probleemide lahendamisel. Eriline tänu kõigile, kes antud töös aitasid leida puudujääke ja vasturääkivusi.
- Kõigile lähedastele inimestele, kes mind moraalselt ja materiaalselt minu õpingute ajal toetasid.

LISAD

Enteroviirusevastaste antikehade esinemine rasedatel ja kuni kaheaastastel lastel

Liina Salur¹, Hanna Viskari², Heikki Hyöty², Raivo Uibo¹ – ¹Tartu Ülikooli molekulaarse ja kliinilise meditsiini keskus, ²Tampere Ülikool

enteroviirus, diabeet, HLA

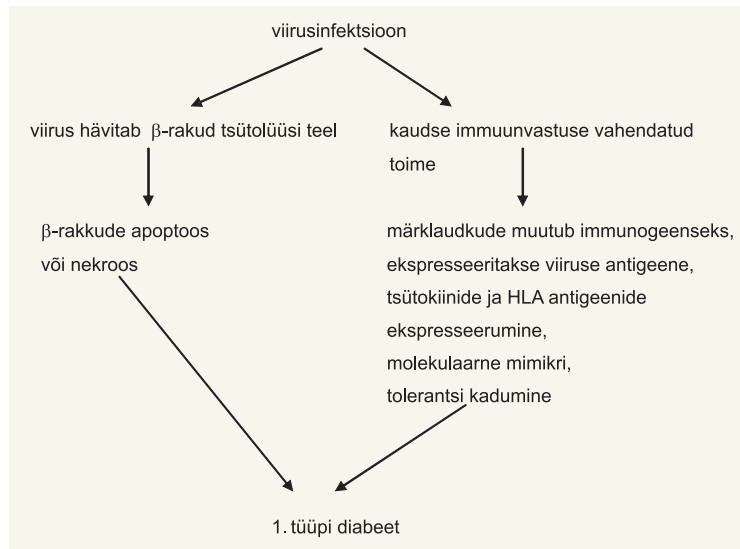
Epidemioloogilised uuringud on näidanud tugevat seost enteroviiruste, eeskätt Coxsackie B-viiruse ja 1. tüüpi (insuliinisõltuva) diabeedi vahel. Käesolevas töös on analüüsitud enteroviirusinfektsioonide esinemist rasedatel ja lastel, hinnates ka diabeedi erineva tekkeriskiga HLA DQ alleelide esinemist ning seost enteroviirusevastaste immuunreaktsioonidega. Kokkuvõtteks võib öelda, et erinevaid enteroviirusevastaseid antikehi esines valdavalt osal rasedatest ning selle tulemusena oli enamik vastsündinutest kaitstud varajaste enteroviirusinfektsioonide eest. Imikueas ja kahe aasta vanustel lastel leidis enteroviirusevastaseid antikehi, sealhulgas ka vaksineerimisega seotud polioviirusevastaseid antikehi mõnevõrra harvem, kuid siiski enamikul uurituist. Seos HLA-DQB1 alleelide ja enteroviirusevastaste immuunreaktsioonide vahel puudus.

Enteroviirusinfektsioonid on ühed sagedamini esinevad infektsioonid, mille põhjustajaks on pikornaviiruste perekonda kuuluvad RNA-viirused. Enteroviirusi on üle 60 serotüüpi ja nad põhjustavad kõigis vanuserühmades valdavalt kerge külmetuse sümptomitega kulgevaid haigusi. Normaalne humoraalne immuunvastus enteroviirustele kutsus esile algul IgM, hiljem IgG ja IgA tüüpi antikehade (AK) tekke. IgM-tüüpi AKd kaovad tavaliselt 6 nädala möödudes, aga IgG ja IgA tüüpi AKd võivad püsida aastaid. Serotüübispetsiifilised nn neutraliseerivad AKd annavad eluaegse kaitse ja immuunsuse vastava viiruse vastu (1).

Epidemioloogilised uuringud on näidanud tugevat seost enteroviiruste, eeskätt Coxsackie B-viiruse ja 1. tüüpi (insuliinisõltuva) diabeedi vahel. Diabeeti haigestumise hetkel on PCR (polümeraas ahelreaktsioon) meetodil leitud 42% uuritute verest Coxsackie viiruse RNAd, kusjuures samavanustel tervetel uuritutel seda ei leitud (2).

1. tüüpi diabeet on organispetsiifiline geneetiliselt determineeritud autoimmuunhaigus, kus insuliini produtseerivad pankrease β -rakud hävitatakse autoreaktiivsete T-lümfotsüütide poolt. Haiguse progresseerumise kiirus on erinev ja β -rakkude häving algab tavaliselt aastaid enne haiguse diagnoosimist (3).

Kuidas täpselt enteroviirused diabeeti haigestumisele kaasa aitavad, on veel ebaselge. Võimalikud autoimmuunsuse tekke mehhanismid on mitmesugused. Viirus võib muuta märklaudkoe peremehe immuunsüsteemile immunogeenseks ja vallandada organismis autoimmuunsed reaktsioonid. Samuti võivad peremeesraku lüüsi käigus vabaneda sekvestreeritud antigeenid või üleekspresseeritakse märklaudkoes koos autoantigeenidega MHC (*major histocompatibility complex*) I ja/või II klassi molekulidele. Kuid viirus võib muuta immuunsüsteemi ka nii, et järgneb autoimmuunne rünnak β -rakkudele. Selle kutsus esile a) B-rakkude polükloonaalne aktivatsioon koos autoantikehade tekkega, b) lümfokiinide (eeskätt IFN- α ja TNF) vabanemine, c) immuunrakkude aktivatsioon, mis põhjustab autoimmuunse tolerantsuse kadumise (põhjuseks näiteks regulatoorsete T-rakkude puudulikkus) või Th1/Th2 (*T-helper*) tasakaalu häirimise. Ka viiruse antigeenne epitoop võib olla sarnane peremeesraku molekulidega (nn molekulaarne mimikri). Selle tagajärjel tekib hulgaliselt antigeenisetsiifilisi T-efektorrakke ja/või AKsid, mis tunnevad ära märklaudraku ning areneb autoimmuunsus. Veel on arvatud, et viirusinfektsiooni järel võivad viirusevastased AKd põhjustada anti-idiotüüpsete AKde



Joonis 1. tüüpi diabeedi üks võimalikest tekkeviisidest.

moodustumise. Need sekundaarsed AKd võivad olla autoreaktiivsed, kui esmased AKd moodustasid viiruse selle osa vastu, mis on sarnane mingi valguga peremeesorganismis (4) (vt jn).

Enteroviirused levivad peamiselt fekaal-oraal- sel või respiratoorsel teel ja nende levik sõltub sellistest sotsiaal-majanduslikest teguritest nagu asustuse tihedus ning elustandard. Meie varasemas töös on näidatud, et enteroviirusinfektsioonid on harvemad Soomes ja Rootsis, kus haigestumus 1. tüüpi diabeeti on suur võrreldes maadega, kus haigestumus 1. tüüpi diabeeti on väiksem (5). On püstitatud nn poliohüpotees, mis aitab selgitada enteroviirusinfektsioonide ja 1. tüüpi diabeedi vahelist seost ka geograafiliselt lähedastikku asuvates maades. Selle hüpoteesi kohaselt on populatsioonis harvem tekkivatel enteroviirusinfektsioonidel kalduvus komplikatsioonide (β-rakkudevastase autoimmuunsuse) tekkeks. See võib toimuda kahel teineteist mittevälisoval viisil: enteroviirusevastaste AKde väike hulk rasedate veres ei suuda kaitsta loodet ning vastsündinut vajalikul määral ja/või laps haigestub pärast ema poolt saadud kaitsvate AKde kadumist enne oma immuunsüsteemi vajaliku küpsuse saavutamist (6). Siiski pole seni ajani päris selge, millal tekivad imikul vastavad AKd ja kuidas nad võivad olla seotud emal raseduse ajal esinevate AKde ning diabeedi teket ja organismi

immuunreaktiivsust oluliselt mõjutavate HLA DQ alleelidega. Samuti on vähe andmeid, kuidas mõjub enteroviiruste rühma kuuluvate polioviiruste vastane vaktsinatsioon teiste, näiteks Coxsackie viiruse vastaste immuunreaktsioonide kujunemisele.

Käesolevas töös analüüsiti enteroviirusinfektsioonide esinemist rasedatel ja lastel, hinnates ka diabeedi erineva tekkeriskiga HLA DQ alleelide esinemist ning seost enteroviirusevastaste immuunreaktsioonidega. Töö moodustab osa rahvusvahelisest, seitset riiki haaravast koostööprojektist, mida on osaliselt finantseerinud Euroopa Liit.

Uurimismaterjal ja -meetodid

Kogu uurimismaterjal koguti perioodil 2000. a maist kuni 2003. a augustini. Nabaväädiveri koguti 123-l järjestikku sündinud Võru maakonna vastsündinult (56 M ja 67 N), kellest 83-l võeti lisaks veri 6kuuselt, 68-l 12kuuselt ja 53-l 24kuuselt. Lisaks uuriti 100 rasedusega arvel olnud naist (50 Tartust ja 50 Võru maakonnast) vanuses 17,5–41,3 aastat (keskmise 28,1 a), neist 38 naise järeltulija kuulus samal ajal ka uuritavasse lasterühma. Veri võeti 11.–30. rasedusnädalal (keskmiselt 16. nädalal) rutiinse arstliku kontrolli käigus. Lastelt vere võtmisel täideti küsimustik, kus uuriti, kas ja millal on laps vaktsineeritud ning kas laps on kodune või viibib osa päevast lastekollektiivis, samuti küsiti laste arvu

peres. Nimetatud andmed võivad olulisel määral mõjutada enteroviirustesse haigestumise šanssi.

Enteroviirusinfektsiooni põdemise (kokkupuute) ja poliovaktsinatsiooni efektiivsuse näitajana uuritavate hulgas hinnati vastavate AKde esinemist uuritavate veres, kasutades ELISA-meetodit ning antigeenina Coxsackie B4-viiruse (CBV4) ja polioviiruse valke ning sünteetilist peptiidi KEVPALTA VETGAT-C, mis on ühiseks komponendiks kõigile teadaolevatele enteroviirustele. Positiivsuse piiriks võeti 15 EIÜ (ensüümimmunoloogiline ühik) (6). Naistel määrati ka neutraliseerivad AKd Coxsackie B4 ja B5 viiruste (CBV4, CBV5), ECHO-viirus 9 (EV9) ning Coxsackie A9-viiruse (CAV9) vastu klassikalisel neutralisatsioonianalüüsil (NA) (7). Kasutati kahte seerumilahendust 1/4 ja 1/256. Positiivseks peeti seerumit, kus blokeeriti rohkem kui 80% viirusest (8).

HLA-DQB1 alleelid määrati mikrotiiterplaatidel toimuva hübridisatsioonireaktsiooniga, kasutades lantanoididega märgistatud alleelispetsiifilisi oligonukleotide (9). Sõltuvalt HLA alleelide seosest diabeediga jagati need kirjanduses antud soovitusel alusel nelja rühma: 1) suure riskiga alleelid DQB1*02/0302, 2) keskmise riskiga DQB1*0302/x (x = *0302 või kindlaks määramata alleel), 3) väiksema riskiga, kuid siiski riskialleelid DQB1*0301/0302, DQB1*02/x (x = *02 või kindlaks määramata alleel), DQB1*0302/0602-3, DQB1*02/301 ja 4) vähenenud riskiga DQB1*x/x, DQB1*0301/x, DQB1*02/0602-3, DQB1*0301/0602-3, kus x tähistab kindlaks määramata alleeli (10).

Tulemuste statistiliseks töötamiseks kasutati vabavara R ja programmi Statistica 7.

Töö tulemused

ELISA-analüüsil ilmnes, et polioviirusevastased IgG-tüüpi AKd esinesid sünnil 31,1%-l ja IgA-tüüpi AKd 21,9%-l lastest. CBV4-vastased IgG-tüüpi AKd esinesid 71,3%-l ja IgA-tüüpi AKd 11,2%-l lastest. IgG-tüüpi enteroviiruse peptiidi vastased AKd esinesid 40,8%-l lastest. Sünnil esines vähemalt ühe enteroviiruse vastu antikehi 85 lapsel (69,1%).

Tabel 1. CBV4-vastaste antikehade esinemine rasedatel määratuna erinevate meetoditega

NA-test	Positiivne, n		Negatiivne, n	
	84		16	
ELISA-test	positiivne	negatiivne	positiivne	negatiivne
	69*	15*	12*	4*

*p > 0,05

Kuue kuu vanustel lastel täheldati AKsid 87,8%-l ja ühe aasta vanustel 77,9%-l. Kahe aasta vanustel lastel, kellelt kõigilt peale ühe olid olemas andmed esimesel eluaastal toimunud polioviirusevastase vaksineerimise kohta, leiti polioviirusevastaseid AKsid 77,4%-l, seejuures IgG-tüüpi 64,2%-l ja IgA-tüüpi AKsid 62,3%-l uuritustest. Samaks vanuseks olid tekkinud CBV4-vastased IgG-tüüpi AKd 38,8%-l ja IgA-tüüpi AKd 10,9%-l lastest. ELISA tulemused näitasid, et rasedatel olid IgG-tüüpi CBV4 AKde testid positiivsed 81%-l, polioviiruse IgG AKde testid 89%-l ja enteroviiruse IgG AKde testid 73%-l. Seejuures leiti vähemalt üks AK-test positiivseks 93%-l uuritustest. Neutraliseerivaid AKsid esines kõigil rasedatel ühe või mitme enteroviiruse vastu. Seejuures leiti neutralisatsiooni AK tiitris 1/4 CAV9 suhtes 93%-l, nii CBV4 kui ka EV9 suhtes 86%-l rasedatest. Leidmaks korrelatsiooni kahe AKde määramise meetodi vahel võrreldi CBV4 AKde esinemist rasedatel nii neutralisatsiooni kui ka ELISA analüüsis. Selgus, et mõlema testi tulemused kattusid 73%-l uuritustest (vt tabel 1). Määrates ELISA-meetodil IgG-tüüpi AKde esinemist CBV-4 vastu 38-l ema ja vastsündinu paaril, täheldati, et testitulemused kattusid 71,1%-l juhtudest.

Lastekollektiivis oli esimeseks eluaastaks hakanud käima 14 last 68st (20,6%). Enteroviirusevastaste AKde esinemissagedus ja hulk ei erinenud nendel lastel, kes viibisid päeval lastekollektiivis või pärinesid suurematest perekondadest (peres 3 või rohkem last), võrreldes nende lastega, kes olid kodused või väiksematest peredest (vt tabel 2). Diabeedi suhtes suure riskiga HLA-DQ alleelid esinesid naistel 4,0% ja lastel 2,4%; mööduka riskiga naised oli 1,0% ning lapsed 4,1%; väikse riskiga vastavalt 25,0% ja 25,2% ning vähese riskiga vastavalt 74,0% ja 68,3%. Seost HLA erinevate

Tabel 2. Antikehade keskmised väärtused sõltuvalt kollektiivist, milles laps viibib

	Üksikud ja väikese pere kodused lapsed, EIÜ	Suure pere lapsed ja kollektiivis käivad lapsed, EIÜ
CBV4 IgG	27,4 (CI 19,9–34,9)*	20,5 (CI 14,2–26,7)*
Polio IgG	25,9 (CI 21,5–30,4)*	33,7 (CI 28,7–38,7)*
Entero IgG	20,3 (CI 12,5–28,2)*	11,9 (CI 7,0–16,9)*

EIÜ – ensüümimmunoloogiline ühik

*p >0,05

alleleide ja enteroviirusevastaste AKde esinemise vahel ei leitud.

Arutelu

Antikehade määramist kasutatakse sageli organismi infitseerituse ja läbipõetud infektsioonhaiguse diagnoosimiseks, kuid ka vaktsinatsiooni korral tekkiva immuunvastuse hindamiseks. Et hinnata enteroviirusinfektsioonide esinemist rasedatel ja lastel, uuriti neil enteroviirusevastaste AKde esinemist nii ELISA kui ka neutraliseerivate antikehade meetodil. Need kaks meetodit võimaldavad hinnata erinevaid enteroviirusevastase immuunuse aspekte. ELISA-meetodil mõõdetud viirusevastased AKd võivad omavahel ristreageerida ja on seega rohkem rühma-spetsiifilised kui serotüübispetsiifilised. Neutraliseerivate AKde märklauks on serotüübispetsiifiline osa viiruse kapsiidi proteiinis ja vastav test on väga tundlik ning spetsiifiline möödunud infektsiooni suhtes. Seejuures on just neutraliseerivatel AKdel otsene kaitsefunktsioon vastava viirusinfektsiooni suhtes. Neutraliseerivate AKde testid on tehniliselt komplitseeritud, mistõttu nende kasutusvõimalused on ELISA-meetodiga võrreldes märksa piiratamad.

Uuring näitas, et enteroviiruste esinemissagedus on väga suur tõenäoliselt kogu rahvastikus, sest enteroviirusevastaseid AKsid esines enamikul uuritud naistest. Ka esimesel kahel eluaastal täheldatud enteroviirusevastaste AKde järkjärguline esinemissageduse kasv näitab veenvalt laste sagedast eksponeeritust enteroviirustele. Seejuures leidsime, et AKde

esinemissageduse ja hulga osas puudus oluline erinevus laste vahel, kes pärinesid suurematest perekondadest (peres üle 3 lapse) või käisid regulaarselt lastekollektiivis, võrreldes nendega, kellel oli vähem õdesid-vendi ning kes ei käinud lastekollektiivis. Ilmselt on siin põhjuseks siiski uuritavate väike arv, sest analoogne uuring, kuhu kuulus 359 last, tõi selle erinevuse ilmekalt esile (5). Erinevus võib samuti olla tingitud enteroviirusinfektsioonide esinemissageduse erinevusest aastate ja kuude kaupa ning lisaks asjaolust, et käesolevas töös uuriti väiksemate linnade elanikke, kus asustustihedus ning lastekollektiivid on väiksemad ja lapsed läksid kollektiivi hiljem.

Oluline on märkida, et ka põhiliste enteroviirusetüüpide (CBV4, CBV5, EV9 ja CAV9) vastaseid neutraliseerivaid AKsid esines enamikul uuritavatest, kusjuures vähemalt üht tüüpi neutraliseerivaid AKsid leiti kõigil rasedatel. Kuivõrd emal olevad IgG-tüüpi AKd läbivad platsentat ning IgA-tüüpi AKsid sisaldab rinnapiim, siis võib järeldada, et nii looted kui ka vastsündinud on enamasti hästi kaitstud enam levinud enteroviiruste vastu. Selle tõestuseks on ka fakt, et nabaväädiveres leiti enamiku enteroviirustega ristreageerivaid (peptiidi KEVPALTAVETGAT vastaseid) IgG-tüüpi AKsid 40,8%-l ja CBV4 antikehi 71,3%-l uuritud lastest.

Juhela ja kaasautorid on näidanud, et emalt saadud viirust neutraliseerivad antikehad kaitsevad last esimesed 3–9 kuud pärast sündi, kusjuures suur osa lastest (30–50%) on 6. elukuuks põdenud juba enteroviirusinfektsioone, millest annab tunnis-

Tabel 3. HLA alleelid ja antikehade (AKde) keskmised väärtused lastel

	Suure ja keskmise riskiga HLA-DQB1 alleelid, EIÜ	Väikse ja vähenenud riskiga HLA-DQB1 alleelid, EIÜ
CBV-4 AK	18,4 (CI 4,7–32,0)*	23,7 (CI 19,4–29,9)*
Polio AK	23,7 (CI 14,1–33,4)*	30,0 (CI 26,4–33,7)*

*p >0,05

tust vastavate antikehade olemasolu (11). Sama täheldasime ka meie, kusjuures 6 kuu vanustel imikutel leidsime enteroviirusevastaseid antikehi juba 87,8%-l uuritustest. Samas näitab meie uuring, et mitte alati ei ole ema verest raseduse jooksul leitud AKd tuvastatavad ka vastsündinu veres, mistõttu ka need, antikehadeta vastsündinud ei ole ilmselt vastavate infektsioonide eest kaitstud. Siin võib olla mitmeid põhjusi, millest eeskätt võiks mainida ema immuunsüsteemi nõrka ja lühiaegset reageerimist vastava enteroviiruse suhtes.

Et HLA-I on keskne osa immuunreaktsioonide tekkes, analüüsiiti, kas diabeedi suhtes erinevat rolli omavad HLA-DQ fenotüübid võiksid määrata enteroviiruste suhtes kujunenud immuunvastuse taset. Meie tulemused näitasid, et AKde hulk ei olnud erinev diabeedi suhtes suurt ja keskmist tekkeriski omavaid HLA-DQ alleele ning väikest tekkeriski omavaid HLA-DQ alleele kandvate laste vahel. Seega ei kinnita meie tulemused varasemat leidu, kus HLA-DQ *0302 alleeli omavatel isikutel oli vähem enteroviirusevastaseid AKsid (12). Samas tuleb muidugi rõhutada, et viimati nimetatud HLA-DQ alleeli esines meie uuritute hulgas vaid 3 lapsel (vt tabel 3), mistõttu selliste uuritavate vähesus võis otseselt mõjutada saadud tulemust. Edasised suuremahulisemad uuringud peavad näitama, kas Sadeharju ja kaasautorite (12) leitud seos kehtib ka Eesti rahvastikus. See uuring eeldab aga märkimis-

väärseid ressursse, sest 1. tüüpi diabeeti haigestumise suhtes suurenenud riski omavate HLA DQB1 alleelide esinemissagedus on Eesti rahvastikus suhteliselt väike – ainult 6,1% (13) – ning see teeb vastava materjali kogumise äärmiselt raskeks. Nii näiteks tuleb selleks, et saada andmeid vähemalt 50-lt suurenenud diabeediriskiga isikult, uurida kokku vähemalt 834 last.

Seega võib töö kokkuvõtteks öelda, et erinevate enteroviiruste vastaseid AKsid esineb valdaval osal rasedatest ning selle tulemusena on enamik vastsündinutest kaitstud varajaste enteroviirusinfektsioonide eest. Imikueas ja kahe aasta vanustel lastel leidub enteroviirusevastaseid AKsid, sealhulgas ka vaktsineerimisega seotuid polioviirusevastaseid AKsid mõnevõrra harvem, kuid siiski enamikul uuritud lastest. Vanuse suurenedes AKde esinemissagedus kasvab ilmselt veelgi. See kõik näitab enteroviirusinfektsioonide suurt sagedust Eesti rahvastikus. Kuidas meil esinevad enteroviirused võiksid aga olla seotud 1. tüüpi diabeedi tekkega, vajab edasisi uuringuid. Neil puhkudel tuleb kindlasti olulist tähelepanu pöörata ka organismi immuunreaktiivsust määravate tegurite uuringutele.

Tänuavaldus. Tööd on toetanud Euroopa Liit (INCO Copernicuse grant) ja Eesti Teadusfond (grant nr 6514). Autorid tänavad Võru haigla personali (eriti dr R. Kipperit ja ämmaemand T. Tuvi) abi eest materjali kogumisel.

Kirjandus

1. Moore M, Morens DM. Enteroviruses, including polioviruses. In: Belshe RB, ed. Textbook of human virology. Littleton, MA: PSG Publishing Co; 1984. p. 407–83.
2. Horwitz MS, Ilic A, Fine C, Balasa B, Sarvetnick. Coxsackieviral-mediated diabetes: induction requires antigen-presenting cells and is accompanied by phagocytosis of beta cells. Clin Immunol 2004;110:134–44.
3. Knip M. Environmental triggers and determinants of β -cell autoimmunity and type 1 diabetes. Rev Endocr Metab Disord 2003;4:213–23.
4. Jun H-S, Yoon J-W. A new look at viruses in type 1 diabetes. Diabetes Metab Res Rev 2003;19:8–31.
5. Viskari H, Ludvigsson J, Uibo R, Salur L, Marciulionyte D, Hermann R, et al. Relationship between the incidence of type 1 diabetes and enterovirus infections in different European populations – results from the EPIVIR project. J Med Virol 2004;72:610–7.
6. Viskari HR, Koskela P, Lönnrot M, Luonuansuu S, Reunanen A, Baer M, et al. Can enterovirus infections explain the increasing incidence of type 1 diabetes? Diabetes Care 2000;23:414–6.
7. Roivainen M, Knip M, Hyöty H, Kulmala P, Hiltunen M, Vähäsalo P, et al. Several different enterovirus serotypes can be associated with prediabetic autoimmune episodes and onset of overt IDDM. Childhood Diabetes in Finland (DiMe) Study Group. J Med Virol 1998;56:74–8.
8. Viskari H, Ludvigsson J, Uibo R, Salur L, Marciulionyte D, Skrodeniene E, et al. Relationship between the incidence of type 1 diabetes and maternal enterovirus antibodies – time trends and geographical variation. (trükkimisel)

9. Sjöroos M, Iitiä A, Ilonen J, Reijonen H, Lövgren T. Triple-label hybridisation assay for type-1 diabetes related HLA alleles. *Biotechniques* 1995;18:870–7.
10. Kukko M, Kimpimäki T, Kupila A, Korhonen S, Kulmala P, Savola K, et al. Signs of beta-cell autoimmunity and HLA-defined diabetes susceptibility in the Finnish population: the sib cohort from the Type 1 Diabetes Prediction and Prevention Study. *Diabetologia* 2003;46:65–70.
11. Juhela S, Hyöty H, Roivainen M, Härkönen T, Putto-Laurila A, Simell O, et al. T-cell responses to enterovirus antigens in children with type 1 diabetes. *Diabetes* 2000;49:1308–13.
12. Sadeharju K, Hämäläinen A-M, Knip M, Lönnrot M, Koskela P, Virtanen SM, et al. Enterovirus infections as risk factor for type 1 diabetes: virus analyses in a dietary intervention trial. *Clin Exp Immunol* 2003;132:271–7.
13. Salur L, Uibo R. Suhkurtõve immunoloogilisi aspekte. *Eesti Arst* 2004;83(2):112–6.

Summary

Enterovirus antibody levels in children during the first two years of life and in pregnant women

Background. Enterovirus infections are one of the most common virus infections throughout childhood. Enteroviruses are small non-enveloped RNA viruses, which belong to the picornavirus family. Enteroviruses, in particular Coxsackie B4, have been implicated in the aetiology of type 1 diabetes mellitus.

Aim. To establish the frequency of enterovirus infections in Estonian pregnant women and in children. We also tried to find out if diabetes-associated HLA-DQB1 alleles are associated with immune responsiveness against enterovirus antigens.

Study design. The participants were 123 babies born at the Hospital of South-Estonia. Blood samples were drawn at birth (cord blood), at 6, 12 and 24 months from May 2000 till August 2003. Maternal enterovirus antibodies were analysed from the serum samples taken from 100 pregnant women (from Tartu and Võru) at the end of the third month of pregnancy.

Methods. The frequency of enterovirus infections was studied by analysing IgG and IgA class enterovirus antibodies in a study series using ELISA to measure group specific (CBV4, poliovirus and a synthetic enterovirus peptide KEVPALTAVETGAT-C) antibodies and a neutralisation assay to measure serotype-specific (CBV4, CBV5, EV9, CAV9) antibodies.

Results. At birth, antibodies against at least one enterovirus were detected in 85 children (69.1%), at the

age of 6 months in 87.8% and at the age of 12 months in 77.9% of the children. At the age of 24 months, after a poliovirus vaccination, antibodies against poliovirus were found in 77.4% of the children. Almost all pregnant women tested positive for enterovirus antibodies. There was found no association of antibodies positivity with HLA-DQB1.

Discussion/conclusions. The status of enterovirus antibodies is often used to reflect the frequency of infections in study subjects. The results suggest that enterovirus infections are quite common in our population, because almost all pregnant women tested positive for enterovirus antibodies. During the first two years of life the frequency of enterovirus antibodies was constantly increasing, which shows that infants are continuously exposed to enterovirus infections. Maternal health plays a very important role in the immunity of the newborn baby. Neutralising antibodies provided by the mother protect the offspring for the first 3–9 months after birth, after which the child develops his/her own specific immunity. This was also evident in our study where 87.8% of the 6-month-old children had antibodies against enteroviruses. It can be concluded that as almost all pregnant women tested positive for enterovirus antibodies, it means that newborns are well protected against early enterovirus infections. Although enterovirus antibodies were less frequent in infants and in two-year-old children, they are still found in majority of children.

liina.salur@ut.ee

H. Viskari · J. Ludvigsson · R. Uibo · L. Salur · D. Marciulionyte · R. Hermann ·
G. Soltesz · M. Füchtenbusch · A.-G. Ziegler · A. Kondrashova · A. Romanov ·
B. Kaplan · Z. Laron · P. Koskela · T. Vesikari · H. Huhtala · M. Knip · H. Hyöty

Relationship between the incidence of type 1 diabetes and maternal enterovirus antibodies: time trends and geographical variation

Received: 16 September 2004 / Accepted: 12 February 2005 / Published online: 19 May 2005
© Springer-Verlag 2005

Abstract *Aims/hypothesis:* We have previously observed an inverse correlation between the incidence of type 1 diabetes and enterovirus infections in the background population. The aim of this study was to analyse whether maternal enterovirus antibody status, which reflects both the frequency of enterovirus infections and the protection conferred by the mother on the offspring, also correlates with the incidence of type 1 diabetes. *Methods:* Maternal enterovirus antibodies were analysed from serum samples taken from pregnant women between 1983 and 2001 in Finland and Sweden using enzyme immunoassay and neutralisation assays. Comparable samples were also taken

between 1999 and 2001 in countries with a lower incidence of diabetes (Estonia, Germany, Hungary, Israel, Lithuania, Russia). *Results:* A clear decrease was observed in maternal enterovirus antibody levels over the past 20 years ($p < 0.0001$). The frequency of enterovirus antibodies was higher in countries with a low or intermediate incidence of type 1 diabetes compared with high-incidence countries ($p < 0.0001$). *Conclusions/interpretation:* These findings are in line with our previous observations supporting the hypothesis that a low frequency of enterovirus infection in the background population increases the susceptibility of young children to the diabetogenic effect of enteroviruses.

H. Viskari · A. Kondrashova · M. Knip · H. Hyöty
JDRF Center for Prevention of Type 1 Diabetes in Finland,
Finland

H. Viskari (✉) · A. Kondrashova · T. Vesikari · H. Hyöty
Department of Virology,
University of Tampere,
Medical School,
FM3/5th Floor, Biokatu 10,
33520 Tampere, Finland
e-mail: hanna.viskari@uta.fi
Tel.: +358-3-2158457
Fax: +358-3-2158450

J. Ludvigsson
Department of Paediatrics, Linköping University,
Linköping, Sweden

R. Uibo · L. Salur
Department of Immunology, University of Tartu,
Tartu, Estonia

D. Marciulionyte
Institute of Endocrinology, Kaunas University of Medicine,
Kaunas, Lithuania

R. Hermann · G. Soltesz
Department of Paediatrics, University of Pécs,
Pécs, Hungary

M. Füchtenbusch · A.-G. Ziegler
Diabetes Research Institute,
Munich, Germany

A. Kondrashova · A. Romanov
Department of Paediatrics, University of Petrozavodsk,
Petrozavodsk, Russia

B. Kaplan
Department of Gynaecology, Beilinson Hospital,
Petah-Tikva, Israel

Z. Laron
Endocrinology and Diabetes Research Unit,
Schneider Children's Medical Centre, Tel Aviv University,
Tel Aviv, Israel

P. Koskela
National Public Health Institute,
Oulu, Finland

H. Huhtala
Tampere School of Public Health, University of Tampere,
Tampere, Finland

M. Knip
Hospital for Children and Adolescents, University of Helsinki,
Helsinki, Finland

M. Knip
Department of Paediatrics, Tampere University Hospital,
Tampere, Finland

H. Hyöty
Department of Clinical Microbiology, Center for Laboratory
Medicine, Tampere University Hospital,
Tampere, Finland

Keywords EIA · Enterovirus · Environment · Immunity · Maternal antibody · Neutralisation assay · Population · Type 1 diabetes

Abbreviations CAV9: coxsackievirus A9 · CBV4: coxsackievirus B4 · CBV5: coxsackievirus B5 · EIA: enzyme immunoassay · EIU: enzyme immunoassay unit · EV9: echovirus 9 · IgG: immunoglobulin G · OR: odds ratio · PV1: poliovirus type 1

Introduction

The incidence of type 1 diabetes has increased worldwide over recent decades, and the incidence varies remarkably even among geographically close countries, such as Finland compared with Estonia and Russia [1–3]. The reasons behind this epidemiological pattern have remained obscure, although it has been related to certain risk factors for type 1 diabetes, such as cow's milk consumption [4]. Enterovirus infections are one of the main candidates as environmental trigger of type 1 diabetes [5] but only a few studies have evaluated the epidemiological association between type 1 diabetes and enterovirus infections in the background population [6–8].

Enterovirus infections are common in all age groups. The group of enteroviruses comprises more than 60 serotypes and the infections are usually asymptomatic or mild flu-like diseases. Rarely, enteroviruses cause severe infection, such as meningitis or myocarditis. Protection against enterovirus infection depends mainly on neutralising antibodies. Passively acquired neutralising antibodies protect newborn infants for the first 6–9 months, during which time the child can develop his/her own specific immunity [9].

Enteroviruses are transmitted mainly via the faecal–oral or respiratory route, and the rate of transmission depends on socio-economic factors such as crowding and standards of hygiene [9, 10]. The endemic and epidemic viruses vary annually and also between different areas, and are often found in sewage, surface water and seawater [11–14]. Human enteroviruses are mostly restricted to humans but several of them have occasionally been detected also in animals [15–17]. Along with an increased standard of living, improved hygiene and diminished crowding may have decreased the transmission rate of enteroviruses in many countries.

We have previously shown that enterovirus infections are less frequent among children in Finland and Sweden, where the incidence of type 1 diabetes is high, than in countries with a lower incidence of type 1 diabetes [7]. In addition, in our preliminary study we found that the frequency of enterovirus infections decreased in Finland during the 1980s and 1990s, whereas the incidence of type 1 diabetes increased [6]. Based on these initial observations, we proposed a hypothesis, named the 'polio hypothesis', which links enterovirus infections to the increasing trend and geographical variation in the incidence of type 1 diabetes [6]. This hypothesis was based on experience with

another enterovirus disease, poliomyelitis, in which the risk of paralytic complications was inversely related to the frequency of poliovirus infections in the background population at the beginning of the last century. In circumstances where the circulation of the virus was low (increased standard of hygiene), children experienced their first poliovirus infection after maternal antibodies had already disappeared, and the virus was therefore able to spread to the blood and cause paralytic complications in some individuals. According to the polio hypothesis, this same phenomenon may play a role in enterovirus-induced diabetes and contribute to the increase and geographical variation in the incidence of type 1 diabetes. Recently, it has been proposed that the same type of phenomenon plays a role in other infections and autoimmune diseases [18, 19].

In the present study we analysed the enterovirus antibody status in pregnant women at different time-points during the last 20 years in two countries with a high and increasing incidence of type 1 diabetes. In addition, maternal enterovirus antibody status at the end of the last decade was analysed in six other European countries with lower incidences of type 1 diabetes. The aim was to further assess whether the frequency and geographical location of enterovirus infections in the background population correlates with the incidence of type 1 diabetes in these countries, and whether the frequency of enterovirus infections has changed over the past 20 years. Importantly, this study evaluates the status of protective enterovirus antibodies in pregnant women, and thus relates to the early immune protection of the offspring.

Subjects, materials and methods

Time-trend series Stored serum samples were available from two countries, Finland and Sweden, for the analysis of possible changes in enterovirus epidemiology over the past 20 years. In Finland, a serum sample has been taken from practically all pregnant women (>98%) at the end of the third month of pregnancy for routine screening of infectious diseases since 1982. These samples have been stored at -20°C at the National Public Health Institute. A series of 1,000 samples, which were taken during July in each of the years 1983 ($n=232$, mean age 26.7 ± 5.5 SD years), 1989 ($n=240$, mean age 28.1 ± 5.1 SD years), 1995 ($n=243$, mean age 28.9 ± 5.6 SD years) and 2001 ($n=285$, mean age 29.0 ± 6.3 SD years), were randomly selected from this serum bank for the enterovirus antibody analyses. They represented different age groups of women living in various parts of Finland. Data from years 1983, 1989 and 1995 have also been presented in our earlier study [6]. In Sweden, stored serum samples have been collected from mothers at delivery in Linköping, covering approximately 95% of the mothers, and samples ($n=999$) were randomly selected from specimens obtained during June and July in the years 1985 ($n=250$, mean age 28.4 ± 5.3 SD years), 1990 ($n=250$, mean age 27.1 ± 5.0 SD years), 1995 ($n=250$, mean age 29.2 ± 4.7 SD years) and 2000 ($n=249$, mean age 29.4 ± 4.8 SD years). The mean age of preg-

nant women in Finland and Sweden increased during the study period from 27.6 to 29.2 years ($p < 0.0001$).

International comparison Eight countries in Europe with different incidences of type 1 diabetes were included in the study. The high-incidence countries comprised Finland ($n=104$, mean age 28.8 ± 4.7 SD years) and Sweden ($n=128$, mean age 29.7 ± 4.0 SD years), while the low- and intermediate-incidence countries (later referred to as low-incidence countries) included Estonia ($n=100$, mean age 28.1 ± 8.1 SD years), Germany ($n=110$, mean age 32.9 ± 4.6 SD years), Hungary ($n=100$, mean age 27.5 ± 4.7 SD years), Israel ($n=377$, mean age 29.1 ± 5.0 SD years), Lithuania ($n=154$, mean age 26.5 ± 5.1 SD years) and Russian Karelia ($n=103$, mean age 25.9 ± 5.5 SD years). Sera from pregnant women were collected at the end of the first trimester of pregnancy from randomly selected women during their regular visits to a prenatal clinic in all countries. The sera were collected throughout the year during the years 1999–2001 and the participation rate was 90% (range 86–98%). The time period of sampling was within the same range in high- and low-incidence countries. The mean age of the women was slightly higher in the high-incidence countries than in the low-incidence countries (mean \pm SD age, 29.3 ± 4.4 vs 28.4 ± 5.8 years, $p=0.032$).

The study protocols were approved by local ethics committees in each country and the study was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki.

Antibody analyses The frequency of enterovirus infections in different countries was studied by analysing enterovirus antibodies in the study series using both an enzyme immunoassay (EIA) to measure group-specific antibodies and a neutralisation assay for serotype-specific antibodies. All samples were analysed under code in the Virus Laboratory, University of Tampere. Samples from each country and/or different years were included in the same run. The frequencies and levels of these antibodies were taken as indicators of past exposure to enteroviruses, since it has been reported that they reflect the frequency of enterovirus infections in a given population [20].

Enzyme immunoassay Immunoglobulin G (IgG) class antibodies were measured separately against a panel of antigens including highly purified coxsackievirus B4 (CBV4), poliovirus type 1 (PV1, strain Sabin) and a synthetic enterovirus peptide (sequence KEVPALTAVETGAT-C), which is a common epitope for enteroviruses [21], as described previously [22]. CBV4 was first heat-treated (30 min at $+56^\circ\text{C}$) to expose antigenic epitopes, which are cross-reactive between various enterovirus serotypes. Microtitre plates (Nunc Immunoplate, Nunc, Glostrup, Roskilde, Denmark) were coated with the antigen at concentrations of $2.5 \mu\text{g/ml}$ (bovine serum albumin-conjugated peptide), $2.4 \mu\text{g/ml}$ (CBV4) and $0.8 \mu\text{g/ml}$ (polio 1) in carbonate buffer (pH 9.4). Serum samples were analysed at $1/2,000$ dilution in phosphate-buffered saline supplemented with 1% bovine serum albumin and 0.05% Tween 20. Binding of specific antibodies was documented using peroxidase-conjugated anti-human

IgG (P214; Dako, Copenhagen, Denmark) as the second layer. The results are given as enzyme immunoassay units (EIU) with reference to the same negative and positive control samples used in all analyses. The value of 15 EIU was used as the cut-off for seropositivity [6].

Antibodies against tetanus toxoid (National Public Health Institute, Helsinki, Finland) were measured from the samples taken in 1983 and 2001 in Finland, as described previously [23], to assess the possible effect of long storage on antibody levels, such as a higher concentration due to possible vapourisation (regular tetanus vaccinations for children started in 1957 in Finland and have not changed substantially during the study period).

Plaque neutralisation assay The presence of neutralising antibodies against CBV4, CBV5, echovirus 9 (EV9) and coxsackievirus A9 (CAV9) was analysed in a subset of the series using the classical plaque neutralisation assay [24]. Samples from Estonia and Russian Karelia ($n=203$) and 200 samples from Finland from each of the years 1983 and 2001 were analysed. Two serum dilutions were used to detect high ($1/256$) and low ($1/4$) levels of neutralising antibodies. The viruses (American Type Culture Collection reference strains) were first treated with four-fold or $1/256$ dilutions of serum for 1 h at 36°C , followed by overnight incubation at room temperature. The virus was then added on monolayers of green monkey kidney cells on six-well plates (Nunclon, Nunc). The amount of infectious virus was measured by counting the plaques after 46 h of incubation at 36°C . The serum was taken as antibody-positive if it blocked more than 80% of the virus infectivity.

Incidence of type 1 diabetes The mean annual incidences of type 1 diabetes (per 100,000 children under the age of 15 years) were taken from publications covering approximately the same period in the 1990s [1, 3, 25]. The incidences were 12.3 in Estonia, 40.8 in Finland, 12.0 in Germany, 9.4 in Hungary, 7.3 in Israel, 7.8 in Lithuania, 7.3 in Russia and 25.7 in Sweden. Finland and Sweden were considered high-incidence countries and Estonia, Germany, Hungary, Lithuania, Russia and Israel low-incidence countries.

Statistical analyses Comparisons were done between high- and low-incidence countries in the cross-sectional series. Age differences between study groups were tested by ANOVA. The Mann–Whitney test was used in the analysis of levels of antibodies between high- and low-incidence countries. A logistic regression model was applied to explain seropositivity in the neutralisation assay with the geographical area (high/low incidence) or time point as covariate (binomial logistic regression). Multinomial logistic regression was used to test the dose effect of multiple positivity for neutralising antibody in terms of absolute titres separately and the dose effect of titre for each serotype separately (0, seronegative [reference category]; >4 , low positive; >256 , high positive). Age was considered a confounding factor, and accordingly the logistic regression

analyses were adjusted for maternal age. The differences in antibody levels between different years in the time-trend series were tested by the non-parametric test of Cuzick for linear trend [26]. The software packages used were Stata version 6.0 (Stata Corporation, College Station, TX, USA), SPSS version 10.1 (SPSS, Chicago, IL, USA) and CIA [27]. A p value of 0.05 or less was considered statistically significant.

Results

Time-trend series A significant decrease was observed in enterovirus antibody levels in pregnant women between 1983 and 2001 both in Finland and in Sweden (Fig. 1). This decrease was observed in antibodies against both the highly purified coxsackievirus B4 as well as the synthetic peptide epitope of the VP1 protein ($p < 0.0001$ for both in Cuzick's test for linear trend). Maternal age did not affect the antibody levels in the EIA test (ANOVA). In the neutralisation antibody assay, seropositivity for multiple antigens (three or four of the four serotypes screened) did not differ between the years 1983 and 2001. When serotypes were tested separately, a significant decrease was observed in neutralising antibodies for CBV4 (titre 4) and CBV5 (titre 256) ($p = 0.023$ and 0.024 , respectively in the binomial logistic regression model; Table 1). No dose effects were observed. The prevalences of EV9 and CAV9 antibodies did not differ between these years. The wide age range of pregnant women (from 15 to 44 years) influenced the neutralising antibody result in the time-trend series. For example, the frequency of CBV4 seropositivity was higher among older women (odds ratio [OR] 1.06, 95% CI 1.02–1.10, $p = 0.001$) per year increase in age.

The antibody levels against tetanus toxoid that are induced by vaccinations did not decrease during this period but rather showed a slight increasing trend (median IgG levels were 36 EIU in 1983 and 52 EIU in 2001 in Finland).

International comparison The neutralising antibodies were more frequent in the low-incidence countries (Estonia and Karelia) than in the high-incidence country (Finland). Multiple antibodies (three or four of the four viruses tested) were significantly more frequent in Estonia and Karelia than in Finland (Table 1). This was also reflected in a clear dose response in the multinomial logistic regression: when compared to seronegativity, the OR increased from 2.4 to 9.1, 31.5 and 66.9 according to the number of antibodies tested (one, two, three and four of the four tested viruses, respectively). When serotypes were tested separately, all four tested viruses showed a 20–45% difference in antibody prevalence at a titre greater than 4 ($p < 0.0001$ for all comparisons in binomial logistic regression; Table 1, Fig. 2a).

In addition to the low-titre antibodies, the high-titre antibodies (256 or higher) were also more frequent in Estonia and Karelia than in Finland. However, this difference was not as strong as for the low-titre antibodies, being statistically significant only for EV9 antibodies and multiple antibodies (Table 1). This was due to the fact that seropositive women in Finland had stronger antibody responses than seropositive women in Estonia and Karelia. For example, the proportion of high positives among seropositives was 71.3% for CBV4 and 53.5% for EV9 in Finland compared with 55.7 and 39.7% in Estonia and Karelia respectively ($p < 0.05$ for both in logistic regression). This was also seen when the dose effect of antibody

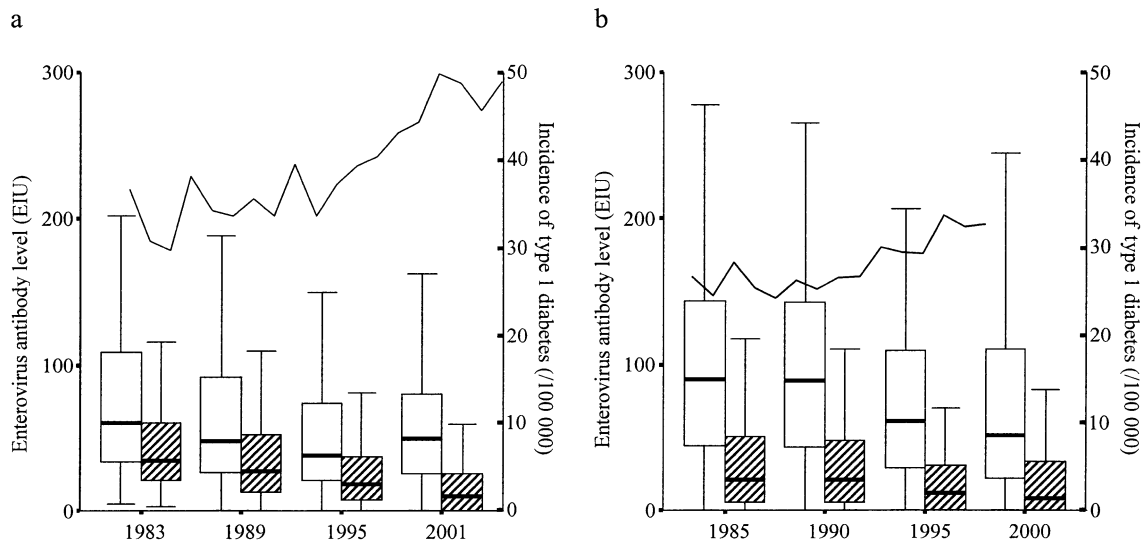


Fig. 1 Annual distribution of CBV4 IgG levels (white box plots) and synthetic enterovirus peptide-IgG (hatched box plots) among pregnant women in Finland and Sweden. The lines represent (a) the annual incidence of type 1 diabetes in Finland between 1983 and 2001 (incidence data from [3] and A. Reunanen, unpublished observation) and (b) the annual incidence in Sweden from 1983 to

1998 (incidence data from [46]). Each box plot represents the median (black bar) and the 25th and 75th percentiles in enterovirus antibodies. The error bars represent the lowest and highest values that are not outliers. Cuzick's test for linear trend: $p < 0.0001$ for both antibodies in Finland as well as in Sweden

Table 1 Proportion of seropositive pregnant women (neutralising antibodies)

Antibody specificity	Finland year 1983 (n=200) Percent (%) (95% CI)	Finland year 2001 (n=200) Percent (%) (95% CI)	Estonia and Karelia year 2000 (n=203) Percent (%) (95% CI)
Titre 4			
CBV4	65.5 ^a (58.7–71.7)	57.5 (50.6–64.5)	85.7 ^b (80.2–89.9)
CBV5	58.0 (51.1–64.6)	53.0 (46.1–59.8)	71.9 ^b (65.4–77.7)
CAV9	64.0 (57.1–70.3)	65.0 (58.2–71.3)	90.6 ^b (85.8–93.9)
EV9	41.5 (34.9–48.4)	40.5 (33.9–47.4)	85.7 ^b (80.2–89.9)
Multiple neutralising antibodies (three or four)	44.0 (37.3–50.9)	38.5 (32.0–45.4)	84.2 ^b (78.6–88.6)
Titre 256			
CBV4	46.0 (39.2–52.9)	41.0 (34.4–47.9)	47.8 (41.0–54.6)
CBV5	24.5 ^a (19.1–30.9)	16.0 (11.6–21.7)	17.2 (12.7–23.0)
CAV9	50.5 (43.6–57.4)	51.5 (44.6–58.3)	64.0 (57.2–70.3)
EV9	19.0 (14.2–25.0)	21.5 (16.4–27.7)	34.0 ^c (27.8–40.7)
Multiple neutralising antibodies (three or four)	16.0 (11.6–21.7)	11.0 (7.4–16.1)	19.7 ^a (14.8–25.7)

CBV4 Coxsackie virus B4; CBV5 coxsackie virus B5; CAV9 coxsackievirus A9; EV9 echovirus 9
^a*p*<0.05; ^b*p*<0.0001; ^c*p*<0.01 in binomial logistic regression when compared with corresponding samples from year 2001 in Finland

titre was analysed for each serotype: the low-titre (>4) antibodies showed a higher OR than the high-titre antibodies. For example, for CAV9, the OR for more frequent presence of neutralising antibodies in low-incidence countries was 8.3 at a titre greater than 4 and 5.5 at a titre greater than 256 when compared with seronegative samples (*p*<0.001 for both).

In contrast to neutralising antibodies, enterovirus antibodies measured against the synthetic enterovirus peptide and the PV1 and CBV4 antigens using EIA did not differ between Estonia and Karelia compared with Finland. When antibody results from all low-incidence countries (Estonia, Germany, Hungary, Israel, Lithuania and Russian Karelia) were compared with the two high-incidence countries (Finland and Sweden), no difference was found

either, except that the levels of CBV4 antibodies were slightly higher in high-incidence countries than in low-incidence countries (median level 70 vs 59 EIU, *p*=0.037). The country-specific levels of enterovirus antibodies did not show any correlation with the incidence of type 1 diabetes (Fig. 2b).

The association between the two antibody detection methods was assessed by comparing CBV4 antibody results in the neutralisation and EIA assays. Sixty-one per cent of the samples were positive in both assays and 5% of the samples were negative in both assays. Twenty-five per cent of the samples that were negative in the neutralisation assay were positive in the EIA test, and 9% of the samples positive in the neutralisation test were negative in the EIA test.

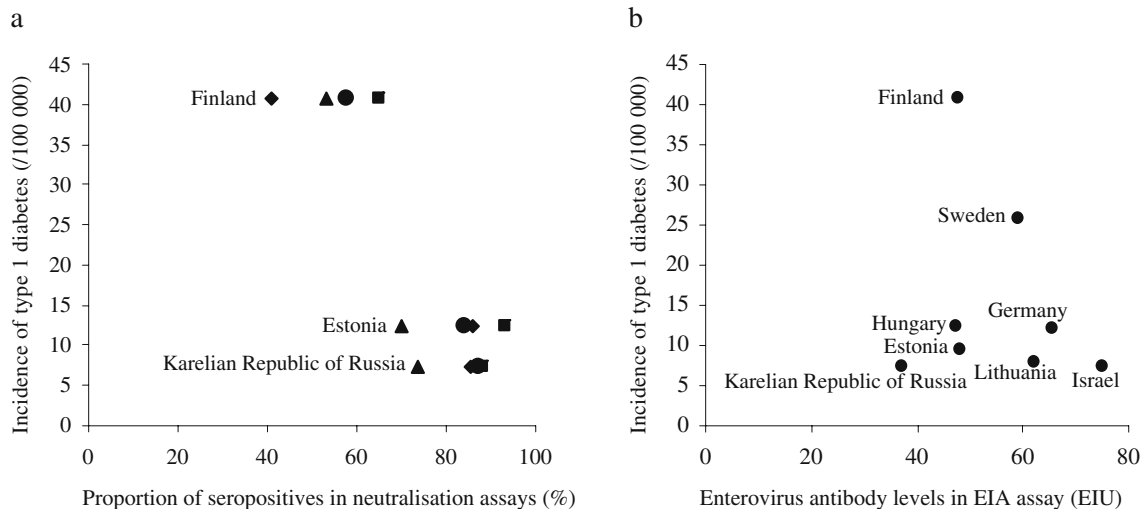


Fig. 2 Scatter plots of enterovirus antibodies and incidence of type 1 diabetes. **a** Proportion of seropositive pregnant women (%) in the neutralisation assay for CBV4 (circles), CBV5 (triangles), CAV9 (squares) and EV9 (diamonds) in Estonia, Finland and the Karelian Republic of Russia in relation to the annual incidence of type 1 diabetes (per 100,000 children). The differences between Finland

and low-incidence countries (Estonia and Karelia) were significant in multinomial regression, as described in the Results section. **b** Median peptide enterovirus antibody levels (EIU) in EIA in different countries in relation to the incidence of type 1 diabetes (per 100,000 children). Incidence data for both figures are from [1, 3, 25]

Discussion

This study shows a decrease in enterovirus antibodies in the background population over the past 20 years in Finland and Sweden, while the incidence of type 1 diabetes has increased during the same time period. Furthermore, the populations with a high incidence of type 1 diabetes had a lower frequency of enterovirus antibodies than populations with a low diabetes incidence. These findings support our previous observations of an inverse relationship between the frequency of type 1 diabetes and enterovirus infections in the background population.

The enterovirus antibody status of pregnant women reflects their exposure to enterovirus infections (frequency of infections) as well as the protection of the offspring against enterovirus infections conferred by these maternal antibodies when transferred to the infant either transplacentally or in breast milk. The decrease in enterovirus antibody levels over the past 20 years suggests that the overall exposure rate to enteroviruses has decreased in both the Finnish and the Swedish population. The samples were taken between 1983 and 2001. However, the antibody status reflects not only recent infections but also the past infection history of a given individual. Therefore, the observed decrease in antibody levels probably reflects a change in enterovirus epidemiology during a longer period of time. In addition to the decrease in antibody levels seen in pregnant women, we have observed a parallel significant decrease in enterovirus antibody levels in a younger age group (10- to 14-year-old Finnish children) using serum samples collected during the years 1975, 1983 and 1998–2002. This finding further supports a decrease in enterovirus infections during recent decades (Viskari et al, data not shown). Increasing standards of living and hygiene and other factors that diminish the spread of the virus are probably the reasons for this decrease. For example, we have previously observed that children who had attended day-care experienced more enterovirus infections [7].

Several studies have reported an inverse relationship between the incidence of type 1 diabetes and population density, population mixing or the proportion of children in the population [28–32]. In Finland, a strong inverse correlation has been reported between population density and the incidence of type 1 diabetes [33, 34]. A number of reports have suggested that day-care protects against diabetes, but larger studies are needed to confirm this association [35]. Thus, these epidemiological findings support a possible protective role of such an environment where infections are readily transmissible. In fact, studies on common childhood infections suggest that one or more infections during the first 6–12 months of life may decrease the risk of type 1 diabetes [36–38]. Severe neonatal infections were, instead, a risk factor for diabetes [39, 40].

The differences in the prevalence of neutralising antibodies between Russian Karelia, Estonia and Finland were substantial, suggesting that Finnish women have experienced clearly fewer enterovirus infections. For example, in the year 2001, 42% of Finnish pregnant women lacked antibodies to CBV4 and were thus unable to protect their

children against this particular serotype, which has most often been associated with type 1 diabetes. The corresponding figure in Estonia and Karelia was 14%. Multiple antibodies were observed in 39 and 84% of the mothers, respectively. This difference was observed also when samples from 1983 in Finland were compared with the samples from the year 2000 in Karelia and Estonia, even though a further decrease was observed in the CBV4 and CBV5 neutralising antibodies over the last 20 years in Finland. Enterovirus infections are, however, still frequent in young infants in Finland. We have previously shown that 30–50% of infants have had at least one enterovirus infection by the age of 6 months [41].

Ecological studies such as the present one may be biased by several confounding factors. The population selection bias is one possibility. In this study the sample collection was carried out in a regular prenatal clinic in each country where the participation rate is known to be high. In addition, the participation rate in our study was high in both the time-trend series and the cross-sectional series.

The long storage of the serum samples at -20°C may have influenced the quality of the sera. However, we observed no decrease in tetanus antibody levels during the same period, suggesting that this was not the case. IgG class antibodies are quite stable but we cannot exclude the possibility that some antibody degradation may have occurred during the 20 years of storage of sera. The degradation, however, should have been more prevalent in the oldest samples, thus rather diminishing than increasing the observed time-trend in antibody levels.

In the international comparisons, the distribution of HLA risk alleles for type 1 diabetes is one possible source of bias as HLA can modulate the immune response to enterovirus antigens [42–44]. These HLA allele combinations vary between countries, and high-risk combinations may be more prevalent in countries with a high diabetes incidence, thus contributing to the international variation in diabetes incidence [45]. However, the difference observed between high- and low-incidence countries is opposite to the expected one if HLA risk genes were involved, as a strong antibody response to enteroviruses is associated with HLA risk alleles for type 1 diabetes [44]. The present observation that Finnish women had a stronger antibody response when positive in the neutralisation assay may reflect the effect of HLA, even though other factors such as a low level of background enterovirus infection in the Finnish population may also play a role, leading to a higher response to the infection.

In the present study, enterovirus antibodies were measured using both EIA and neutralising antibody assays. The antibodies observed in the neutralisation assay represent the specific, lifelong-accumulated, ‘biological’ ability of antibodies to neutralise the infective virus. The difference in enterovirus antibodies between high- and low-incidence countries was not observed in the EIA but was apparent in the neutralising antibodies. These two methods are not directly comparable as they assess different aspects of enterovirus immunity. EIA measures antibodies binding to several different epitopes, whereas neutralising antibodies

target serotype-specific sites in the viral capsid proteins and are highly specific and sensitive markers of past infection. In contrast to the neutralising antibodies, the antibodies measured by EIA cross-react between serotypes, and are thus more group-specific than serotype-specific. This was also observed in our study, in which 25% of the CBV4 antibodies detected with the EIA were negative in the neutralisation assay. We measured neutralising antibodies against four enterovirus serotypes out of more than 60 serotypes, whereas the EIA assay included the group-specific CBV4 antibodies as well as the synthetic enterovirus antigen of the VP1 region that is common to all enteroviruses. Accordingly, the two methods complement each other and facilitate the generation of both specific and sensitive information on the epidemiology of enterovirus infections. The fact that the difference between the high- and low-incidence countries was seen in neutralising antibodies but not in EIA antibodies may reflect the masking effect of cross-reactive antibodies in the EIA test.

The mother plays a crucial role in the immunity of the newborn baby. The neutralising antibodies provided by the mother protect the offspring for the first 3–9 months after birth, during which time the child can be infected with enteroviruses and develop his or her own specific immunity. The observed decrease in levels of enterovirus antibodies among pregnant women in Finland and Sweden is in line with the polio hypothesis, which we proposed earlier [5–8]. Accordingly, we hypothesise that a low frequency of enterovirus infections in the background population will increase the susceptibility of young children to the diabetogenic effect of enteroviruses. The reason for this is that the proportion of mothers who lack enterovirus antibodies is increasing and children also experience their first infection later, when maternal antibodies have already disappeared.

Acknowledgements This study was based on the EPIVIR project, supported by the EU as a part of the INCO-Copernicus programme (contract number IC15-CT98-0316), JDF-Wallenberg Foundation (k98-99JD-12813-01A, No 1997-73), the Swedish Medical Research Council (k99-72X-11242-05A), the Swedish Child Diabetes Foundation and the Estonian Science Foundation (grant 4631). The study was also supported by Päivikki and Sakari Sohlberg's Foundation and the Academy of Finland. We are grateful to Eeva Jokela, Mervi Kekäläinen, Maarit Takalo, Katri Koivumäki and Inkeri Lehtimäki for technical assistance, and to Dr Sandra Schmid and the staff members in all countries for sample collection. The EPIVIR study group includes the following investigators: H. Hyöty (coordinator), M. Knip, H. Viskari, University of Tampere, Finland; J. Ilonen, University of Turku, Finland; A. Reunanen, National Public Health Institute, Helsinki, Finland; R. Uibo (scientific coordinator), L. Salur, University of Tartu, Estonia; J. Ludvigsson, University of Linköping, Sweden; D. Marciulionyte, Kaunas University of Medicine, Lithuania; R. Hermann, G. Soltesz, University of Pécs, Hungary; M. Fächtenbusch, A. Ziegler, Munich, Germany; A. Kondrashova, A. Romanov, University of Petrozavodsk, Russia. Z. Laron is director of the WHO Collaborating Center for the Study of Diabetes in Youth, Israel.

References

- Podar T, Solntsev A, Karvonen M et al (2001) Increasing incidence of childhood-onset type 1 diabetes in 3 Baltic countries and Finland 1983–1998. *Diabetologia* 44(Suppl 3): B17–B20
- Gale EA (2002) The rise of childhood type 1 diabetes in the 20th century. *Diabetes* 51:3353–3361
- Kondrashova A, Reunanen A, Romanov A et al (2005) A sixfold gradient in the incidence of type 1 diabetes at the eastern border of Finland. *Ann Med* 37:67–72
- Virtanen SM, Aro A (1994) Dietary factors in the aetiology of diabetes. *Ann Med* 26:469–478
- Hyöty H, Taylor KW (2002) The role of viruses in human diabetes. *Diabetologia* 45:1353–1361
- Viskari HR, Koskela P, Lönnrot M et al (2000) Can enterovirus infections explain the increasing incidence of type 1 diabetes? *Diabetes Care* 23:414–416
- Viskari H, Ludvigsson J, Uibo R et al (2004) Relationship between the incidence of type 1 diabetes and enterovirus infections in different European populations: results from the EPIVIR project. *J Med Virol* 72:610–617
- Lönnrot M, Knip M, Marciulionyte D et al (1999) Enterovirus antibodies in relation to islet cell antibodies in two populations with high and low incidence of type 1 diabetes. *Diabetes Care* 22:2086–2088
- Pallansch MA, Roos RP (2001) Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses and newer enteroviruses. In: Knipe DM, Howley PM (eds) *Fields virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp 723–775
- Morens D, Pallansch M (1995) Epidemiology. In: Rotbart H (ed) *Human enterovirus infections*. ASM, Washington DC, pp 3–23
- Alexander LM, Heaven A, Tennant A, Morris R (1992) Symptomatology of children in contact with sea water contaminated with sewage. *J Epidemiol Community Health* 46:340–344
- van Olphen M, Kapsenberg JG, van de Baan E, Kroon WA (1984) Removal of enteric viruses from surface water at eight waterworks in The Netherlands. *Appl Environ Microbiol* 47: 927–932
- Ozere RL, Faulkner R, Van Rooyen CE (1961) Enteroviruses in sewage and epidemic poliomyelitis in eastern Canada. *Can Med Assoc J* 85:1419–1424
- Hovi T, Stenvik M, Rosenlew M (1996) Relative abundance of enterovirus serotypes in sewage differs from that in patients: clinical and epidemiological implications. *Epidemiol Infect* 116:91–97
- Grew N, Gohd RS, Arguedas J, Kato JI (1970) Enteroviruses in rural families and their domestic animals. *Am J Epidemiol* 91:518–526
- Kadoi K, Suzuki H, Nishio O (2001) Isolation of coxsackievirus B5 from pigs. *New Microbiol* 24:217–222
- Waldman EA, Moreira RC, Saez SG et al (1996) Human enterovirus infection in stray dogs. Some aspects of interest to public health. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 38:157–161
- Zinkernagel RM (2001) Maternal antibodies, childhood infections, and autoimmune diseases. *N Engl J Med* 345:1331–1335
- Zinkernagel RM (2003) On natural and artificial vaccinations. *Annu Rev Immunol* 21:515–546
- Roivainen M, Alftan G, Jousilahti P, Kimpimäki M, Hovi T, Tuomilehto J (1998) Enterovirus infections as a possible risk factor for myocardial infarction. *Circulation* 98:2534–2537
- Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, Flemister MR, Brown BA, Pallansch MA (1999) Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. *J Clin Microbiol* 37:1288–1293
- Sadeharju K, Lönnrot M, Kimpimäki T et al (2001) Enterovirus antibody levels during the first two years of life in prediabetic autoantibody-positive children. *Diabetologia* 44:818–823

23. Kurikka S, Olander RM, Eskola J, Käyhty H (1996) Passively acquired anti-tetanus and anti-*Haemophilus* antibodies and the response to *Haemophilus influenzae* type b-tetanus toxoid conjugate vaccine in infancy. *Pediatr Infect Dis J* 15:530–535
24. Roivainen M, Knip M, Hyöty H et al (1998) Several different enterovirus serotypes can be associated with prediabetic autoimmune episodes and onset of overt IDDM. Childhood Diabetes in Finland (DiMe) Study Group. *J Med Virol* 56:74–78
25. Green A, Patterson CC (2001) Trends in the incidence of childhood-onset diabetes in Europe 1989–1998. *Diabetologia* 44(Suppl 3):B3–B8
26. Altman DG (1991) Non-parametric test for ordered groups. In: Altman DG (ed) *Practical statistics for medical research*. Chapman and Hall, London, pp 215–217
27. Altman D, Altman DG, Bryant T, Gardner M, Gardner MJ, Machin D (2000) *Statistics with confidence*, 2nd edn. BMJ Books, London
28. Staines A, Bodansky HJ, McKinney PA et al (1997) Small area variation in the incidence of childhood insulin-dependent diabetes mellitus in Yorkshire, UK: links with overcrowding and population density. *Int J Epidemiol* 26:1307–1313
29. Parslow RC, McKinney PA, Law GR, Staines A, Williams R, Bodansky HJ (1997) Incidence of childhood diabetes mellitus in Yorkshire, northern England, is associated with nitrate in drinking water: an ecological analysis. *Diabetologia* 40:550–556
30. Schober E, Rami B, Waldhoer T (2003) Small area variation in childhood diabetes mellitus in Austria: links to population density, 1989 to 1999. *J Clin Epidemiol* 56:269–273
31. Patterson CC, Carson DJ, Hadden DR (1996) Epidemiology of childhood IDDM in Northern Ireland 1989–1994: low incidence in areas with highest population density and most household crowding. Northern Ireland Diabetes Study Group. *Diabetologia* 39:1063–1069
32. Parslow RC, McKinney PA, Law GR, Bodansky HJ (2001) Population mixing and childhood diabetes. *Int J Epidemiol* 30:533–538; discussion 538–539
33. Karvonen M, Rusanen J, Sundberg M et al (1997) Regional differences in the incidence of insulin-dependent diabetes mellitus among children in Finland from 1987 to 1991. Childhood Diabetes in Finland (DiMe) Study Group. *Ann Med* 29:297–304
34. Rytönen M, Moltchanova E, Ranta J, Taskinen O, Tuomilehto J, Karvonen M (2003) The incidence of type 1 diabetes among children in Finland—rural–urban difference. *Health Place* 9: 315–325
35. Kaila B, Taback SP (2001) The effect of day care exposure on the risk of developing type 1 diabetes: a meta-analysis of case-control studies. *Diabetes Care* 24:1353–1358
36. Pundziute-Lycká A, Urbonaitė B, Dahlquist G (2000) Infections and risk of type I (insulin-dependent) diabetes mellitus in Lithuanian children. *Diabetologia* 43:1229–1234
37. Blom L, Nystrom L, Dahlquist G (1991) The Swedish childhood diabetes study. Vaccinations and infections as risk determinants for diabetes in childhood. *Diabetologia* 34:176–181
38. Gibbon C, Smith T, Egger P, Betts P, Phillips D (1997) Early infection and subsequent insulin dependent diabetes. *Arch Dis Child* 77:384–385
39. Dahlquist GG, Patterson C, Soltesz G (1999) Perinatal risk factors for childhood type 1 diabetes in Europe. The EURODIAB Substudy 2 Study Group. *Diabetes Care* 22:1698–1702
40. EURODIAB Substudy 2 Study Group (2000) Infections and vaccinations as risk factors for childhood type I (insulin-dependent) diabetes mellitus: a multicentre case-control investigation. *Diabetologia* 43:47–53
41. Juhela S, Hyöty H, Roivainen M, Härkönen T, Putto-Laurila A, Simell O, Ilonen J (2000) T-cell responses to enterovirus antigens in children with type 1 diabetes. *Diabetes* 49:1308–1313
42. Bruslerud O, Jervell J, Thorsby E (1985) HLA-DR3 and -DR4 control T-lymphocyte responses to mumps and Coxsackie B4 virus: studies on patients with type 1 (insulin-dependent) diabetes and healthy subjects. *Diabetologia* 28:420–426
43. D'Alessio DJ (1992) A case-control study of group B Coxsackievirus immunoglobulin M antibody prevalence and HLA-DR antigens in newly diagnosed cases of insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Epidemiol* 135:1331–1338
44. Sadeharju K, Knip M, Hiltunen M, Åkerblom HK, Hyöty H (2003) The HLA-DR phenotype modulates the humoral immune response to enterovirus antigens. *Diabetologia* 46:1100–1105
45. Rønningen KS, Keiding N, Green A (2001) Correlations between the incidence of childhood-onset type I diabetes in Europe and HLA genotypes. *Diabetologia* 44(Suppl 3):B51–B59
46. Dahlquist G, Mustonen L (2000) Analysis of 20 years of prospective registration of childhood onset diabetes time trends and birth cohort effects. Swedish Childhood Diabetes Study Group. *Acta Paediatr* 89:1231–1237