

Livelli anomali di anticorpi contro morbillo-parotite-rosolia e malattie autoimmuni del sistema nervoso centrale (CNS) in bambini affetti da autismo

Vijendra K. Singh Sheren X. Lin Elizabeth Newell Courtney Nelson
Department of Biology and Biotechnology Center, Utah State University, Logan, Utah, USA

Abstract

Le malattie autoimmuni a carattere del sistema nervoso centrale (CNS), specialmente contro la proteina basica della mielina (MBP), potrebbero avere un ruolo causale nell'autismo, un disturbo dello sviluppo neurologico. Siccome molti bambini autistici hanno livelli elevati di anticorpi contro il morbillo, abbiamo condotto uno studio sierologico sugli autoanticorpi di morbillo-parotite-rosolia e a carico del sistema nervoso centrale. Utilizzando campioni di siero di 125 bambini autistici e 92 campioni di controllo, si è proceduto all'analisi degli anticorpi tramite test ELISA¹ e analisi immunoblotting (immunofissazione)². I test ELISA hanno dimostrato un aumento significativo dei livelli di anticorpi MPR nei bambini autistici. Le analisi di immunofissazione hanno rilevato la presenza di un insolito anticorpo MPR in 75 su 125 sieri di bambini autistici (60%) e nessuno nel gruppo di controllo. Tale anticorpo era specifico contro la proteina 73-75 kD di MPR. Tale proteina, analizzata con anticorpi monoclonali, era immunopositiva contro la proteina H del morbillo, detta emoagglutinina³, ma non contro le nucleoproteine del morbillo e contro le proteine virali della rosolia e della parotite. Dunque l'anticorpo MPR nel siero dei bambini autistici identifica la proteina H del morbillo, che è specifica della subunità del vaccino. Inoltre più del 90% dei sieri di bambini autistici positivi agli anticorpi contro MPR erano anche positivi agli autoanticorpi contro la proteina basica della mielina (MBP), suggerendo una forte associazione tra MPR e malattie autoimmuni a carico del sistema nervoso centrale nell'autismo. Questa evidenza implica che una risposta inappropriata al vaccino MPR, specialmente nella componente del morbillo, potrebbe essere collegata alla patogenesi dell'autismo.

Introduzione

L'autismo è un disturbo dello sviluppo del sistema nervoso centrale ad esordio precoce, la cui eziologia e patogenesi è sconosciuta. Il disturbo causa gravi deficit delle più alte funzioni mentali superiori come interazione sociale, linguaggio, comunicazione, immaginazione e capacità cognitiva. Nonostante l'autismo colpisca oltre mezzo milione di americani e ancora di più a livello mondiale, si conosce ancora poco riguardo alla eziologia e alla patogenesi del disturbo. Le teorie contemporanee includono fattori genetici, immunologici, ambientali e neurologici, oltre ad altri fattori non identificati. Partendo dalla regolazione immunitaria difettosa nei bambini autistici [10, 12, 16, 21, 23], si è posta attenzione sul meccanismo autoimmune della patogenesi dell'autismo [14-17, 19, 20]. Siccome le malattie autoimmuni sono generalmente sospettate

¹ acronimo derivato dall'espressione inglese enzyme-linked immunosorbent assay: saggio immuno-assorbente legato ad un enzima

² http://www2.unibas.it/plsbiotecnologie/images/materiale_didattico/Interazione%20antigene-anticorpo%20mediante%20Western%20Blotting.pdf

³ <https://www.ildermatologorisponde.it/morbillo.php>

di essere scatenate da virus, si è provveduto recentemente a fare indagini sierologiche per la ricerca di virus nell'autismo [15, 17]. Si è scoperto che molti bambini affetti da autismo avevano livelli elevati di anticorpi contro il virus del morbillo (MV), ma non contro l'Herpesvirus umano di tipo-6 (HHV-6), il citomegalovirus o il virus della rosolia (RV). Inoltre l'elevato livello di anticorpi contro il morbillo era fortemente associato con la presenza di autoanticorpi cerebrali, che ci ha portati a postulare una associazione patogenetica tra il virus del morbillo e l'autoimmunità presente nell'autismo [15, 17]. Per determinare in maniera più approfondita l'origine di tale infezione da morbillo, abbiamo indagato la possibilità di una eccessiva o inappropriata risposta anticorpale al vaccino MPR in relazione alle malattie autoimmuni a livello di sistema nervoso centrale (CNS). Come descritto qui, diversi bambini affetti da autismo hanno insoliti livelli di anticorpi MPR e mostrano una associazione temporale con autoanticorpi contro la proteina basica della mielina (MBP) che è stata usata come un marcatore di autoimmunità CNS nell'autismo.

Metodi e materiali

Abbiamo condotto uno studio di laboratorio sugli anticorpi MPR e gli autoanticorpi MBP in sieri di bambini autistici e di un gruppo di controllo. Siccome questo studio era una estensione di una nostra ricerca ancora in corso, abbiamo utilizzato campioni di siero precedentemente raccolti e crioconservati ad una temperatura di -20° C [14-17]. Lo studio ha coinvolto in tutto 217 bambini: 125 bambini autistici (di età compresa fra i 4 e i 10 anni) e 92 nel gruppo di controllo (di cui 58 bambini normali fra i 5 e i 13 anni, 6 fratelli o sorelle normali dai 6 ai 9 anni, e 28 bambini di età compresa fra i 4 e i 12 anni i quali avevano altri disturbi del comportamento che non rientrassero nello spettro autistico). I risultati delle analisi immunologiche hanno dimostrato che tutti i bambini avevano una vaccinazione contro MPR ma nessuno aveva avuto casi di rash cutaneo o una infezione da virus selvaggio. La diagnosi clinica di autismo era stata fatta essenzialmente secondo gli standard DSM-III-R, stabiliti dalla American Association of Psychiatrists, Washington, D.C., USA, come precedentemente descritto [14-17]. Lo studio ha coinvolto solo bambini con una diagnosi accertata di autismo. Il Comitato Etico ha revisionato e approvato il nostro protocollo di ricerca che prevedeva il solo utilizzo di campioni di siero umano. Durante la raccolta dei campioni di sangue o per almeno due settimane prima del prelievo, nessuno dei pazienti autistici né del gruppo di controllo doveva assumere medicinali come antipsicotici o farmaci neurolettici. Gli anticorpi MPR sono stati inizialmente ricercati tramite saggio immuno-assorbente legato ad un enzima (test ELISA) per la titolazione del siero, ma successivamente sono stati ricercati tramite analisi di immunofissazione per fare uno screening del siero. In entrambi i metodi di analisi, il vaccino MPR-II (Merck, West Point, Pa., USA) è stato usato come antigene. Gli autoanticorpi contro la proteina basica della mielina (MBP) (Upstate Biotechnology, Lake Placid, N.Y., USA) sono stati ricercati tramite analisi di immunofissazione come di routine nel nostro laboratorio. Tutti i test immunologici sono stati condotti in house (all'interno del laboratorio), per motivi legati semplicemente alla particolare natura dello studio e perché al momento non sono disponibili da nessuna fonte in commercio.

La ricerca di anticorpi MPR tramite test ELISA è stata condotta sulla base di precedenti ricerche da noi condotte utilizzando questo metodo [18]. Brevemente, i micropozzetti di una piastra di microtitolazione Costar (Corning,

Corning, N.Y., USA) sono stati rivestiti con antigene MPR dissolto in un tampone fosfato salino⁴ a pH 7,4. La piastra è stata lavata per tre volte con tampone PBF-tween a 0,05%. Sono stati pipettati 100 µl/well di tampone fosfato salino nei micro pozzetti bianchi⁵ o di siero umano prediluito in quattro diluizioni nei micropozzetti del test. La piastra è stata incubata a temperatura ambiente per un'ora. Dopo tre lavaggi con tampone PBF-tween, è stato pipettato 100 µl/well di anticorpo di capra anti-IgG umane coniugato in fosfatasi alcalina e diluito a 1:500 (Sigma, St. Louis, Mo., USA). La piastra è stata incubata a temperatura ambiente per un'ora e successivamente di nuovo lavata per tre volte. In seguito a ciò è stata aggiunta una quantità di 100 µl/well di una soluzione di substrato (1 mg/ml di p-nitrophenylphosphate in 50 mM di tampone di bicarbonato di sodio, pH 9.6, contenente 1 mM di magnesium chloride). La reazione al colore è stata interrotta con 20 µl/well di 1 N NaOH e la piastra è stata letta a 405 nm utilizzando un modello di Microplate Reader 3550 (Bio-Rad, Richmond, Calif., USA). Dopo la **sottrazione del bianco**, le letture di assorbanza sono state convertite in unità arbitrarie EIA, Enzyme ImmunoAssay: dosaggio immunoenzimatico (0.01 OD = 1 unità EIA).

L'analisi di immunofissazione è stata inizialmente condotta secondo il metodo da noi pubblicato (17-20), utilizzando MPR o MBP (Major basic protein: proteina basica maggiore) come antigeni per lo screening e proteine **pre-colorate** (prestained) standard (Bio-Rad). In breve, le proteine sono state separate in una soluzione al 12% di gel pronto all'uso (Bio-Rad) attraverso elettroforesi utilizzando gel di poliacrilammide (PAGE) e sodio dodecil solfato (SDS)⁶. Sono poi state trasferite in membrane di nitrocellulosa tramite la tecnica a doppio sandwich, seguita dal blocco con l'1% di sieralbumina bovina in tampone tris salino (TBS: Tris-buffered saline). Le membrane sono state asciugate all'aria e riposte a temperatura ambiente.

Per i test immunologici, dei piccoli blot del diametro di 3-4 mm sono stati incubati per un'ora con siero appropriatamente diluito di pazienti autistici o di controllo. Dopo quattro lavaggi con TBST (tampone tris salino contenente 0,05% Tween-20), i blots sono stati incubati per un'ora con immunoglobuline polivalenti di capra anti-IgG umane coniugate in fosfatasi alcalina (**alkaline phosphatase conjugated goat anti-human polyvalent immunoglobulins**) (Sigma). Dopo quattro lavaggi con TBST, i blots sono stati sviluppati in soluzione di substrato come da istruzioni del produttore del kit di substrato AP (Alkaline Phosphatase) (Bio-Rad). La reazione è stata considerata positiva solo se veniva visualizzata la banda blu-violacea. In alcuni esperimenti, la presenza di proteine virali nei blot MPR è stata trovata attraverso anticorpi monoclonali contro l'emoagglutinina MV (HA), la nucleoproteina MV-NP, RV o MuV (Chemicon International, Temecula, Calif., USA), seguita dall'immunoricerca attraverso fosfatasi alcalina anti-topo-IgG di capra; per tutti gli altri test sono state replicate le suddette condizioni. Al fine di determinare il peso molecolare, abbiamo condotto in simultanea proteine standard SDS-PAGE precolorate (Bio-Rad) con inclusa miosina (207 kD), β-galattosidasi (121 kD), albumina di siero bovino (81 kD), ovoalbumina (51.2 kD), anidrasi carbonica (33.6 kD), inibitore della rizina di soia (28.6 kD), lisozima (21.1 kD), and aprotinina (7.5 kD).

⁴ PBS: Phosphate buffered saline, soluzione tampone comunemente usata nei laboratori di biologia e biochimica www.molecularlab.it/protocolli/reagent.asp?name=PBS

⁵ Blank microwell: well with no protein

⁶ Vedi nota 7, procedimento spiegato in italiano

Risultati

Innanzitutto è importante sottolineare il fatto che abbiamo scelto MPR come antigene per lo screening semplicemente perché è l'antigene immunizzante quando i bambini vengono vaccinati con MPR. Dunque gli anticorpi verso MPR saranno una misura esatta di siero conversione per questo vaccino tri- o polivalente, anziché gli anticorpi contro le proteine virali di morbillo, parotite o rosolia che vengono usati individualmente per misurare la sierologia del virus nella pratica di routine. Inizialmente, per studiare gli effetti del siero diluito, il livello di anticorpi MPR è stato misurato tramite test ELISA su sieri di 24 bambini autistici, 14 bambini normali e 16 altri bambini con problematiche oltre l'autismo. Il risultato del test ELISA sui livelli di anticorpi MPR nel siero è riassunto nella figura 1.

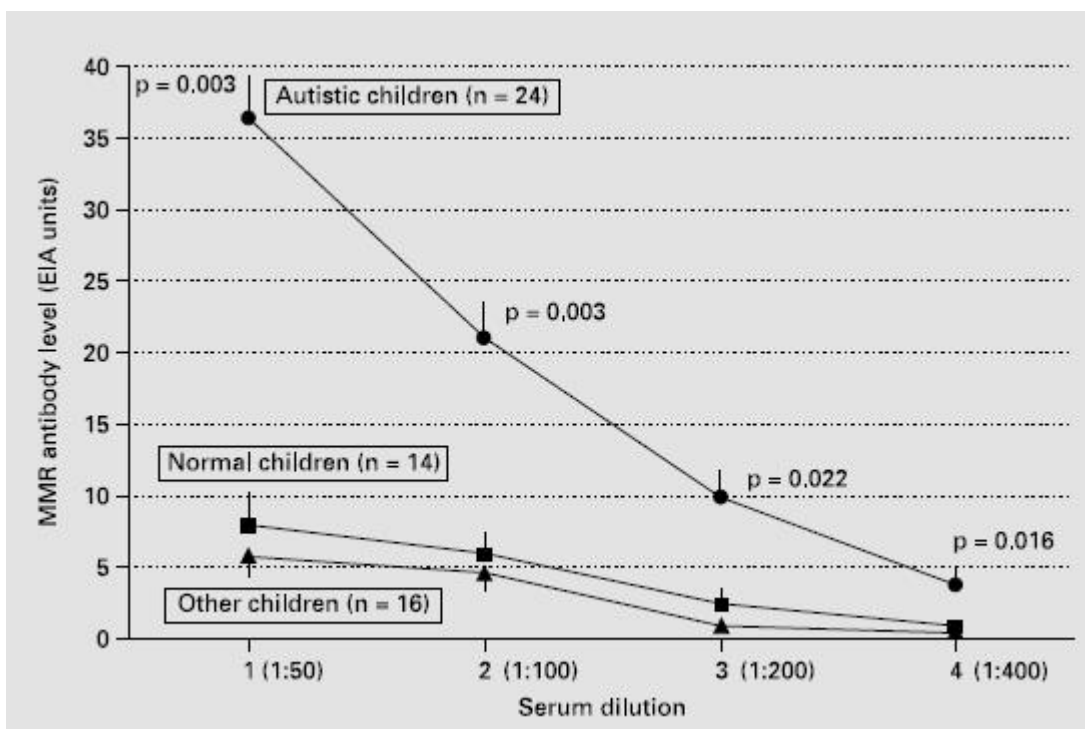


Fig. 1. Ricerca di anticorpi MPR tramite test ELISA. I livelli di anticorpi MPR sono mostrati a seconda della diluizione del siero (Serum dilution) per i bambini autistici (n=24, cerchi, nella linea più in alto), bambini normali (n=14, quadrati nella linea centrale) e bambini con altri problemi di salute (n=16, triangoli, nella linea più in basso). Statisticamente, come valutato dal test degli studenti, il livello di anticorpi MPR è molto più elevato nei bambini autistici. I dati sono espressi per errore standard \pm (Standard Error SE).

I bambini autistici, il cui siero è stato testato a varie diluizioni, avevano un livello di anticorpi MPR significativamente più elevato rispetto ai bambini normali e a quelli con altre problematiche. Il maggior picco (più di sette volte) è stato osservato alla diluizione di 1:50 di siero autistico. Il metodo ELISA è stato utilizzato principalmente per determinare una appropriata diluizione del siero, che è poi stata valutata quella di 1:50. Successivamente tutti i sieri sono stati analizzati a questa diluizione attraverso l'analisi di immunofissazione, in quanto questo metodo permette l'analisi delle proteine alle quali si legano gli anticorpi, che era l'obiettivo primario del presente studio.

L'analisi di immunofissazione di tutti i 217 sieri ha rilevato che 75 su 125 sieri autistici, contro nessuno dei 92 sieri di controllo, aveva anticorpi contro MPR e MBP. Come mostrato nella figura 2, i sieri autistici hanno avuto una reazione immunopositiva ad una banda di proteine 73-75 kD nel blot MPR (fig. 2, linea B) mentre il siero di controllo non ha avuto tale reazione (fig. 2, linea A); nessun'altra banda di proteine è risultata immunopositiva in questa analisi. Inoltre, la stessa banda di proteine nei blot MPR ha avuto una reazione immunopositiva agli anticorpi monoclonali MV-HA (fig. 3, linea di sinistra) ma non agli anticorpi monoclonali MV-NP (fig. 3, linea di destra). I blot MPR erano immunonegativi agli anticorpi monoclonali RV o MuV (figura 4). In linea con precedenti studi [5, 15, 19, 20], i sieri autistici contenevano autoanticorpi MBP da 18,5 a 20 kD (figura 2, linea D), che il peso molecolare del cervello bovino MBP usato nel presente studio. I sieri di controllo erano negativi agli autoanticorpi MBP (figura 2, linea C).

Basandoci sulle analisi di immunofissazione, abbiamo trovato che 75 su 125 (60%) dei bambini autistici erano positivi agli anticorpi MPR mentre 70 su 125 (56%) bambini autistici avevano autoanticorpi MBP (fig. 5). Nessuno di questi due tipi di anticorpi è stato rilevato nel gruppo di controllo (bambini sani o con altri tipi di malattia). Inoltre, secondo i dati delle nostre analisi di immunofissazione, il gruppo di bambini autistici ha rilevato una interessante correlazione tra anticorpi MPR e autoanticorpi MBP, cioè oltre il 90% dei sieri autistici positivi agli anticorpi MPR erano anche positivi agli autoanticorpi MBP (fig. 5). Questa correlazione era assente nel gruppo di controllo in quanto i bambini di questo gruppo erano negativi sia agli anticorpi MPR che agli autoanticorpi MBP.

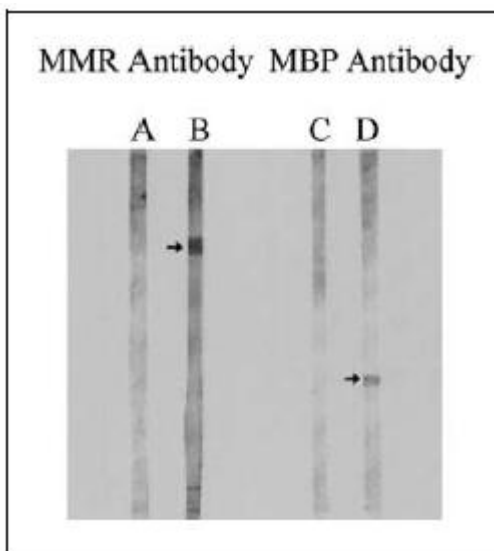


Fig. 2. Immunoblot rappresentativi di anticorpi MPR e autoanticorpi MBP. Come descritto nel testo, le proteine nelle macchie MPR e MBP sono state incubate con siero autistico o di controllo e sono state esaminate con immunoglobuline polivalenti anti-umane di capra coniugate con fosfatasi alcalina. Si noti che i sieri autistici (corsie B e D), ma non i sieri di controllo (corsie A e C), hanno mostrato reazioni anticorpo-positiva con una proteina da 73 a 75-kD nella macchia MPR e una proteina da 18,5 a 20-kD nella macchia MBP, rispettivamente. Nel gel al 12 % di acrilammide, la banda proteica MPR ($R_f = 17,5$ mm) è migrata leggermente più veloce dell'albumina di siero bovino ($R_f = 16,4$ mm) rispetto ad altri standard proteici preconfezionati (Cat. No.

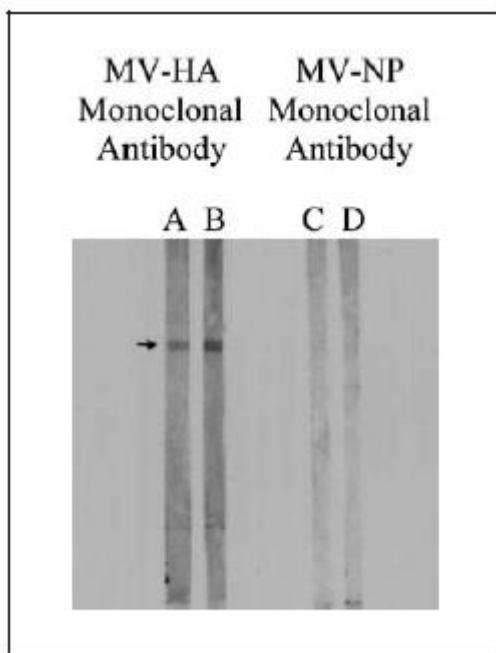


Fig. 3. Gli immunoblot MPR rappresentativi hanno reagito con anticorpi monoclonali alle proteine MV. A tale scopo, le macchie MPR sono state incubate separatamente con due diluizioni (1:100 e 1:50) di anticorpi monoclonali MV-HA o anticorpi monoclonali MV-NP e rilevate con la fosfatasi alcalina anti-topo-IgG di capra. Si noti che l'anticorpo monoclonale MV-HA (corsie A e B), ma non l'anticorpo monoclonale MV-NP (corsie C e D), ha mostrato una reazione immunopositiva con banda da 73 a 75-kD della macchia MPR.

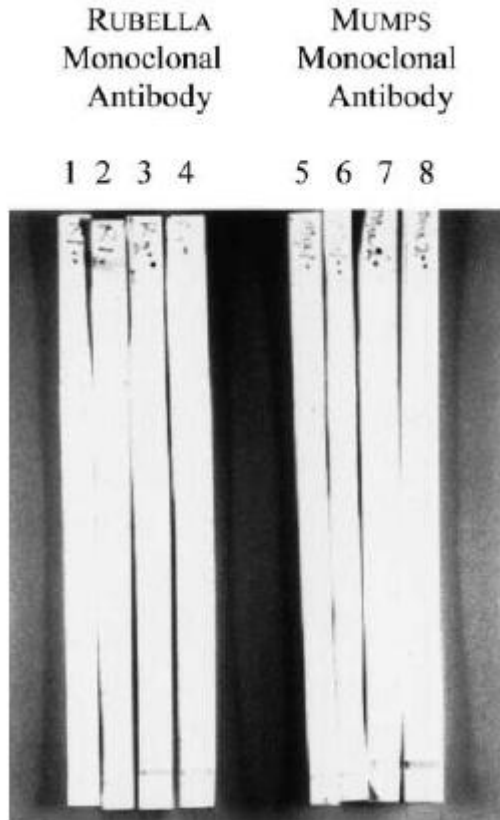


Fig. 4. Gli immunoblot rappresentativi MPR hanno reagito con anticorpi monoclonali a RV o MuV. Le macchie MPR da 4 sessioni SDS-PAGE separate sono state incubate con anticorpi monoclonali (diluizione 1:100) a RV o MuV e rilevate con la fosfatasi alcalina IgG anti-topo di capra. Si noti che le macchie MPR erano negative in questi immunodosaggi.

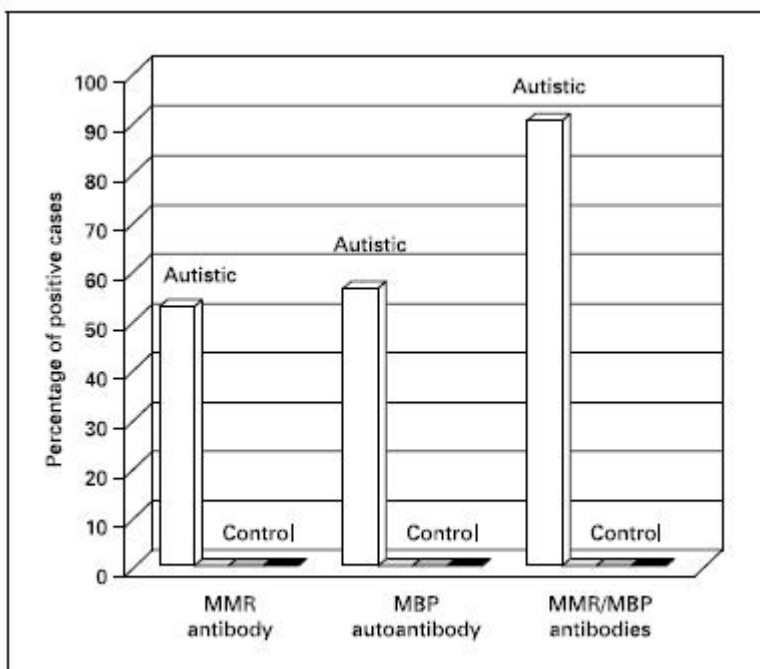


Fig. 5. Distribuzione di anticorpi MPR e MBP in bambini autistici e di controllo. Dopo lo screening degli anticorpi mediante immunoblotting, la percentuale di sieri positivi agli anticorpi è stata calcolata in ciascun gruppo di studio. Questo

è stato tracciato contro la fonte di antigene saggia. Si noti che solo il gruppo autistico ha mostrato reazioni positive (barre verticali) ma il gruppo di controllo che includeva bambini normali (riquadro di base 1), fratelli normali (riquadro di base 2) e bambini con altre malattie (riquadro di base 3) era negativo.

Discussione

Diversi studi in tutto il mondo hanno suggerito che i fattori immunitari come l'autoimmunità possono giocare un ruolo fondamentale nella patogenesi dell'autismo [10, 12, 14-17, 19, 20]. Esistono prove per i fattori di suscettibilità immunogenetica [24] e il raggruppamento familiare di malattie autoimmuni in famiglie con bambini autistici [4]. I bambini autistici hanno numerose anomalie immunitarie: aumento sierico di IgG3 [16], diminuzione sierica di IgA [7,12], riduzione del numero e delle funzioni dei linfociti, in particolare le cellule T helper (CD4 +) e le cellule natural killer (NK) [10, 12, 21, 23] e aumentati livelli plasmatici di citochine specifiche-autoimmuni come l'interleuchina-2, l'interleuchina-12 e l'interferone-gamma [4]. L'aumento della frequenza di alcuni fattori immunogenetici (allele nullo C4B, aplotipo esteso B44-SC30-DR4 e regione HLA-DRb1 ipervariabile) è stato anche dimostrato in alcuni bambini con autismo [24]. Molti bambini autistici hanno autoanticorpi organo-specifici, in particolare autoanticorpi verso la proteina MBP derivata dalla mielina del cervello [15, 17, 19, 20]. Inoltre, un numero considerevole di bambini autistici mostra miglioramenti significativi delle caratteristiche autistiche quando trattati con terapia immunitaria come autoantigene orale [15], immunoglobulina per via endovenosa [7] o fattore di trasferimento [5]. Collettivamente, queste anomalie immunitarie e / o terapie immunitarie sono coerenti con una base autoimmune di patogenesi nell'autismo.

I virus sono comunemente associati a malattie autoimmuni, nonostante la scarsità di prove sperimentali. Il meccanismo di innesco dell'autoimmunità nell'autismo non è noto ma sono state descritte associazioni virali [2, 8]. I bambini autistici hanno un valore significativamente superiore ai normali livelli di anticorpi del morbillo, ma non di anticorpi HHV-6, rosolia o citomegalovirus [15, 17]. L'aumento specifico del livello di anticorpi del morbillo era anche coerente con un'associazione sierologica tra MV e autoimmunità nell'autismo, che ci ha portato a postulare un legame eziologico di MV con l'autismo [15, 17]. Come riportato qui, un aumento significativo del livello di anticorpi MPR è stato riscontrato nei bambini autistici. Inoltre, l'anticorpo MPR ha mostrato una reazione immunopositiva a una proteina da 73- a 75-kD di MPR nel 60% dei bambini autistici nello studio. Questo è stato un risultato importante perché il peso molecolare della proteina MPR che ha reagito positivamente agli anticorpi MPR assomigliava al peso molecolare di una proteina del morbillo, nota come antigene HA. Infatti, la banda MPR conteneva l'antigene MV-HA poiché era immunopositiva per gli anticorpi monoclonali al MV-HA, ma non per gli anticorpi monoclonali al MV-NP. In dati preliminari non inclusi qui, abbiamo recentemente scoperto che l'anticorpo monoclonale MV-HA ma non l'anticorpo monoclonale MVNP ha quasi completamente bloccato il legame dell'anticorpo MPR (siero autistico anticorpo-positivo) alla banda proteica MPR su immunoblot. Pertanto, questi studi indiretti suggeriscono che gli anticorpi MPR in sieri autistici sono più probabilmente diretti verso l'antigene HA di MV. Inoltre, la banda da 73 a 75-kD di MPR non conteneva RV o MuV poiché questa banda era immunonegativa per gli anticorpi monoclonali per ognuno di questi

due virus. Rispetto ai bambini autistici, i bambini di controllo avevano bassi livelli di anticorpi MMR che erano immunonegativi per l'antigene MV-HA derivato da MMR. Quindi sembra plausibile che i bambini autistici abbiano prodotto una risposta anticorpale inappropriata o anormale all'MPR che era diretta contro l'antigene MV-HA. Indubbiamente, sono necessarie ulteriori ricerche su questo argomento, ma siamo tentati di ipotizzare che una immunoregolazione difettosa o fattori immunogenetici possano determinare il perché solo i bambini autistici producono questi anormali anticorpi alla proteina derivata da MPR (73-75 kD) che sembra essere l'antigene HA di MV. In alternativa, la differenza tra i bambini autistici e di controllo può essere dovuta a una modifica strutturale (o una mutazione) del determinante antigenico riconosciuta dagli anticorpi MPR. L'immunizzazione con i vaccini è la migliore misura preventiva contro le infezioni mortali oggi disponibili per l'umanità. Poiché i vaccini sono somministrati a soggetti sani, quasi esclusivamente ai bambini, la sicurezza dei vaccini deve essere il più assoluta quanto umanamente possibile. Sebbene l'equazione rischio-beneficio favorisca fortemente la vaccinazione, vi sono alcuni gravi effetti collaterali, anche se estremamente rari, che meritano attenzione scientifica. Ad esempio, la meningite asettica [6] e l'atassia cerebellare [11] sono state descritte in bambini immunizzati con MPR. Tuttavia, la base di come i vaccini reagiscono negativamente in alcuni casi rimane praticamente sconosciuta. È del tutto possibile che i vaccini in una piccola popolazione di bambini geneticamente predisposti possano reagire in modo inappropriato, semplicemente a causa del loro immaturo sistema immunitario o di altri fattori di rischio sconosciuti come immunodeficienze, allergie, tossine chimiche o stress psicologico cronico [3]. Tuttavia, nessuno di questi fattori è stato finora studiato nell'autismo.

Negli ultimi anni, il tema dell'immunizzazione-autoimmunità ha guadagnato un po' di attenzione da parte del pubblico. Questo è probabilmente dovuto al fatto che le malattie autoimmuni sono le manifestazioni più comuni delle vaccinazioni [1, 13]. L'MPR è stato insinuato come colpevole di problemi gastrointestinali in alcuni bambini con caratteristiche autistiche [22]. Circa la metà dei genitori con bambini autistici ha denunciato regressione autistica dopo l'immunizzazione MPR [17]. Inoltre, un'associazione sierologica di MV con l'autoimmunità è stata trovata in bambini autistici che non avevano un'infezione da morbillo di tipo selvatico, ma avevano l'immunizzazione MPR [17]. E, come qui descritto, i bambini autistici hanno mostrato una correlazione sierologica tra MPR e autoimmunità cerebrale, cioè oltre il 90% dei sieri autistici positivi agli anticorpi MPR aveva anche autoanticorpi anti MBP cerebrale. Questa è un'osservazione piuttosto intrigante a favore di una connessione tra infezione atipica da morbillo e autismo; un'infezione atipica di solito si riferisce all'infezione che si verifica in assenza di un'eruzione cutanea. Un'infezione atipica del morbillo in assenza di un'eruzione cutanea e sintomi neurologici insoliti è stata recentemente descritta per suggerire l'esistenza di una variante MV nei bambini e negli adulti [9]. Alla luce di queste nuove scoperte, suggeriamo che una considerevole percentuale di casi autistici può derivare da un'infezione atipica del morbillo che non produce eruzioni cutanee ma causa sintomi neurologici in alcuni bambini. La fonte di questo virus potrebbe essere una variante MV o potrebbe essere il vaccino MPR. Scientificamente, quindi, è istruttivo considerare entrambe queste possibilità e scoprirle attraverso la ricerca sperimentale. Pensiamo che questo sia un problema di salute pubblica estremamente importante, semplicemente perché

alcuni scienziati ci hanno recentemente avvertito dell'emergere di un MV mutante che causa malattie fatali nell'uomo [9]. Se questo è il caso, allora saranno necessarie nuove strategie di vaccinazione per combattere l'infezione da morbillo mutante. Mentre sono necessarie ulteriori ricerche per stabilire un ruolo patogenomiconico per MPR / MV, stiamo attualmente esplorando il ruolo dell'autoimmunità indotta da virus e la nostra ricerca futura è finalizzata a caratterizzare le basi molecolari dell'immunità cellulare e umorale agli antigeni virali nei bambini con autismo.

Acknowledgments

We gratefully thank the Dougherty Jr., Lattner Jr., BHARE, Mellanby, Yorio and Unanue Foundations, Autism Autoimmunity Project, and Autism Research Institute for their grant support of this research. We thank Dr. Ron Torres of the Utah State University for sharing serum samples of 30 normal children. Sheren Lin and Elizabeth Newell, two undergraduate students, contributed significantly to this report's initial studies that were carried out at the University of Michigan, Ann Arbor, Mich., USA.

References

- Buttram HE. Vaccine scare 2000 – Review and update. *Med Sentinel* 5:49–52;2000.
- Chess S, Fernandez P, Korn S. Behavioral consequences of congenital rubella. *J Pediatr* 93: 699–703;1978.
- Cohen S, Miller GE, Rabin BS. Psychological stress and antibody response to immunization: A critical review of the human literature. *Psychosom Med* 63:7–18;2001.
- Comi AM, Zimmerman AW, Frye VH, Law PA, Peeden JN. Familial clustering of autoimmune disorders and evaluation of medical risk factors in autism. *J Child Neurol* 14:388–394; 1999.
- Fudenberg HH. Dialyzable lymphocyte extract (DLyE) in infantile onset autism: A pilot study. *Biotherapy* 9:143–147;1996.
- Fujinaga T, Motegi Y, Tamura H, Kuroume T. A prefecture-wide survey of mumps meningitis associated with measles, mumps and rubella vaccine. *Pediatr Infect Dis J* 10:204–209; 1991.
- Gupta S, Aggarwal S, Heads C. Dysregulated immune system in children with autism: Beneficial effects of intravenous immune globulin on autistic characteristics. *J Autism Dev Disord* 26:439–452;1996.
- Ivarsson A, Bjerre I, Vegfors P, Ashfors K. Autism as one of several disabilities in two children with congenital cytomegalovirus infection. *Neuropediatrics* 21:102–103;1989.
- Madhur G. Indian scientists warn of 'mutant measles' virus. *BMJ* 322:693;2001.
- Menage P, Thibault G, Barthelemy C, Lelord G, Bardos P. CD+ CD45RA+ T lymphocyte deficiency in autistic children: Effect of a pyridoxine-magnesium treatment. *Brain Dysfunct* 5:326–333;1992.
- Plesner AM, Hansen FJ, Taudorf K, Nielsen LH, Larsen CB, Pedersen E. Gait disturbance interpreted as cerebellar ataxia after MMR vaccination at 15 months of age: A follow up study. *Acta Paediatr* 89:58–63;2000.
- Plioplys AV, Greaves A, Kazemi K, Silverman E. Lymphocyte function in autism and Rett syndrome. *Neuropsychobiology* 29:12–16; 1994.
- Shoenfeld Y, Aron-Maor A. Vaccination and autoimmunity – 'Vaccinosis': A dangerous liaison? *J Autoimmun* 14:1–10;2000.
- Singh VK. Plasma increase of interleukin-12 and interferon-gamma: Pathological significance in autism. *J Neuroimmunol* 66:143–145; 1996.
- Singh VK. Neuro-immunopathogenesis in autism. In: Berczi I, Gorczynski R, eds. *Neuroimmune Biology: New Foundation of Biology*. New York, Elsevier Science BV, 447–458; 2001.
- Singh VK, Warren RP, Cole P, Odell JD. Abnormalities of interleukin-2 production and levels of IgG isotypes in autistic patients (abstract 1569). *FASEB J* 3:A496;1989.
- Singh VK, Lin SY, Yang VC. Serological association of measles virus and human herpesvirus-6 with brain autoantibodies in autism. *Clin Immunol Immunopathol* 89:105–108;1998.
- Singh VK, Tingle AJ. Detection of circulating immune complexes by a C1q-microplate ELISA system. *J Immunol Methods* 50:109–114;1982.
- Singh VK, Warren RP, Averett R, Ghaziuddin M. Circulating autoantibodies to neuronal and glial filament proteins in autism. *Pediatr Neurol* 16:88–90;1997.
- Singh VK, Warren RP, Odell JD, Cole P, Warren L. Antibodies to myelin basic protein in children with autistic disorder. *Brain Behav Immun* 7:97–103;1993.
- Stubbs EG, Crawford ML, Burger DR, Vanderbilt AA. Depressed lymphocyte responsiveness in autistic children. *J Autism Child Schizophr* 7:49–55;1977.
- Wakefield AJ, Murch SH, Anthony A, Linnell J, Casson DM, Malik M, Berelowitz M, Dhilhon AP, Thompson MA, Harvey P, Valentine A, Davies SE, Walker-Smith JA. Ileal-lymphoid-nodular hyperplasia, non-specific colitis, and pervasive developmental disorder in children. *Lancet* 351:637–641;1998.
- Warren RP, Foster A, Margaretten NC. Reduced natural killer cell activity in autism. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 26:333–335;1987.
- Warren RP, Singh VK, Averett RE, Odell JD, Maciulis A, Burger RA, Daniels WW, Warren WL. Immunogenetic studies in autism and related disorders. *Mol Chem Neuropathol* 28: 77–81;1996.