

Examinarea histologică intestinală în diareea cronică la copil (studiu clinic)

Intestinal histologic examination in chronic diarrhea in children (clinical study)

Șef Lucr. Dr. MIRELA COVĂCESCU^{1,2}, Asist. Univ. Dr. ALEXIS VIRGIL COCHINO²,
Prof. Dr. DUMITRU MATEI^{1,2}, Prof. Dr. IOAN GHERGHINA^{1,2}

¹IOMC „Alfred Rusescu”, București

²Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila”, București

REZUMAT

Biopsia intestinală rămâne o metodă importantă de diagnostic la copiii cu diaree cronică, fiind utilizată în afecțiuni cu leziuni specifice, atunci când celelalte investigații nu sunt concludente. Este prezentat un studiu clinic efectuat pe un lot de copii cu diaree cronică, internați pe o perioadă de 2 ani în IOMC Alfred Rusescu București. Biopsia intestinală a fost efectuată la un număr restrâns de copii, în principal pentru diagnosticul bolii celiace, dar a existat și un caz în care diagnosticul final a fost de sindrom postenteritic. Examinarea histologică a fost efectuată la microscopul optic, iar în 3 cazuri au fost studiate și aspecte histologice la microscopul electronic, metodă utilizată în special în scop de cercetare. Sunt prezentate și câteva rezultate ale altor studii din literatură, efectuate la copii cu diaree persistentă.

Concluzii: Biopsia intestinală reprezintă o metodă utilă de diagnostic în diareea cronică la copil, atunci când celelalte investigații nu pot preciza diagnosticul. Examinarea se face în principal la microscopul optic, dar microscopia electronică poate furniza date histologice suplimentare.

Cuvinte cheie: diareea cronică la copil, sindrom postenteritic, biopsie intestinală, microscopie electronică

ABSTRACT

Intestinal biopsy remains an important diagnostic method in children with chronic diarrhea, utilised in diseases with specific intestinal pattern, when other investigations are inconclusive. We present a clinical study in a group of children with chronic diarrhea, admitted over a period of 2 years in IOMC Alfred Rusescu Bucharest. Intestinal biopsy was performed at a limited number of children, mainly to diagnose celiac disease, but there was a case in which the final diagnosis was postenteritic syndrome. Histological examination was performed using the optical microscope, but in three cases were studied the histological aspects using the electron microscope, a method used primarily for research purposes. There are also presented the results of other studies described in the medical literature, performed in children with persistent diarrhea.

Conclusions: Intestinal biopsy is a useful diagnostic method in chronic diarrhea in children when other investigations cannot clarify the diagnosis. Examination is primarily performed under the optical microscope, but electron microscopy can provide additional histological data.

Key words: chronic diarrhea in children, postenteritic syndrome, intestinal biopsy, electron microscopy

Adresă de corespondență:

Șef Lucr. Dr. Mirela Covăcescu, IOMC „Alfred Rusescu”, Bd. Lacul Tei, Nr. 120, București

INTRODUCERE

Biopsia de intestin subțire este o metodă para-clinică importantă de diagnostic la pacienții cu sindrom de malabsorbție ce identifică bolile mucoasei intestinului subțire care sunt asociate cu modificări histologice, incluzând enteropatia prin sensibilizare la gluten, abetalipoproteinemia, limfangiectazia, boala congenitală cu incluzii microvilozitare, gastro-enterita eozinofilică, boli infecțioase, boala Whipple (rară la copil). Astfel, identifică gradul leziunilor mucoasei intestinale, permite afirmarea diagnosticului pozitiv în afecțiuni cu leziuni specifice și urmărirea în timp a modificărilor histologice intestinale (1, 2). Examinarea histologică a mucoasei intestinului subțire se face de obicei la microscopul optic, dar tehnica microscopiei electronice poate furniza date histologice suplimentare.

Scopul lucrării este de a aduce în discuție utilizarea biopsiei intestinale în scop diagnostic în diareea cronică la copil, cu examinarea fragmentelor intestinale la microscopul optic, dar și observarea unor aspecte histologice la microscopul electronic.

MATERIAL ȘI METODĂ

Au fost studiate retrospectiv și prospectiv cazurile de diaree cronică internate în IOMC Alfred Rusescu în perioada ianuarie 2009 – decembrie 2010 sub aspectul efectuării biopsiei intestinale, urmărindu-se aspectele histologice observate la microscopul optic, dar și modificări observate în unele cazuri la microscopul electronic.

REZULTATE

În perioada ianuarie 2009 – decembrie 2010 au fost internați în IOMC Alfred Rusescu București un număr de 336 de copii cu diaree cronică.

Repartiția diagnosticelor la cei 336 de copii cu diaree cronică internați în clinică a fost:

- *Fibroză chistică* – 36 de cazuri; 10,71% (dintre care 10 cazuri noi)
- *Celiachie* – 52 de cazuri; 15,48% (dintre care 13 cazuri noi)
- *Sindrom postenteritic (SP)* – 71 de cazuri; 21,13%
- *Alergie la proteinele laptelui de vacă (PLV)* – 34 de cazuri; 10,12%
- *Altele: boală inflamatorie intestinală; megadolicolon; sindrom de intestin scurt chirurgical* – 7 cazuri; 2,08%

Cazuri de diaree cronică fără precizare (136 de cazuri; 40,47%):

- *Enterocolită recidivantă* – 10 cazuri; 2,98%
- *Enterocolită trenantă* – 18 cazuri; 5,36%
- *Sindrom de malabsorbție* – 80 de cazuri; 23,81%
- *Diaree cronică cu intoleranță la lactoză* – 10 cazuri; 2,98%
- *Sindrom de maldigestie* – 10 cazuri; 2,98%
- *Colon iritabil cu diaree* – 8 cazuri; 2,38%

Astfel, din totalul de 336 de copii cu diaree cronică, la 129 de copii (38,4%) cauza a fost clar precizată (fibroză chistică, celiachie, alergie la PLV, boală inflamatorie intestinală, megadolicolon, sindrom de intestin scurt chirurgical). Ponderea copiilor diagnosticați ca și SP a fost de 71 de cazuri (21,1%). Restul de 136 de cazuri (40,74%) nu au avut o cauză cert precizată, fiind încadrați ca: enterocolită recidivantă, enterocolită trenantă, sindrom de malabsorbție, colon iritabil cu diaree, diaree cronică cu intoleranță la lactoză, sindrom de maldigestie.

Din totalul de 336 de copii internați cu diaree cronică pe durata studiului, doar 10 pacienți (2,98%) au necesitat biopsie intestinală, la 9 dintre ei aceasta confirmând diagnosticul de boală celiacă.

Un pacient a avut aspect normal histologic la examinarea fragmentului de mucoasă intestinală, diagnosticul final fiind de sindrom post-enteritic. Alți 8 copii (2,38%) au avut biopsie intestinală efectuată anterior internării actuale (7 cu boală celiacă confirmată histologic, 1 cu inflamație nespecifică).

Examinarea histologică în cazurile menționate s-a făcut la toți pacienții prin tehnica microscopiei optice, dar au existat și 3 pacienți la care examinarea s-a făcut și la microscopul electronic.

Figurile 1A și 1B redau aspecte histologice ale mucoasei intestinale (microscopie electronică) la copilul O.T, 3 ani și 4 luni, FO 7192/2009, cu diagnosticul de *Boală celiacă* sub dietă fără gluten, cu anticorpi antitransglutaminază (TTG) negativi și anticorpi antiendomisiu (EMA) pozitivi.

Biopsia este efectuată după inițierea dietei fără gluten și relevă: microvili în deget de mână de cca 1μm înălțime, fără modificări structurale și cu glicocalixul păstrat; enterocite de cca 35μm înălțime; nu se constată microorganisme pe suprafața stratului epitelial; limfocitele intraepiteliale au o frecvență mai mare ca normal.

Concluzie – inflamație limfo-plasmocitară în lamina propria.

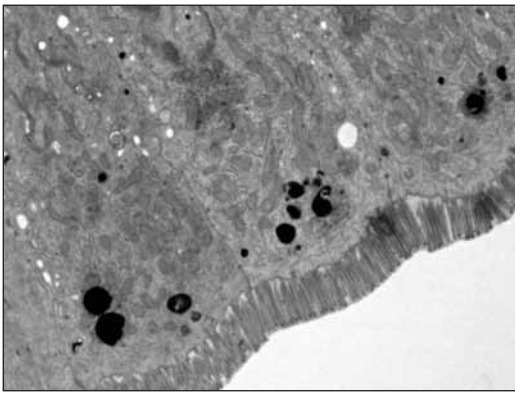


FIGURA 1A. O.T., 3 ani și 4 luni; Boală celiacă – fragment de mucoasă intestinală (microscopie electronică)

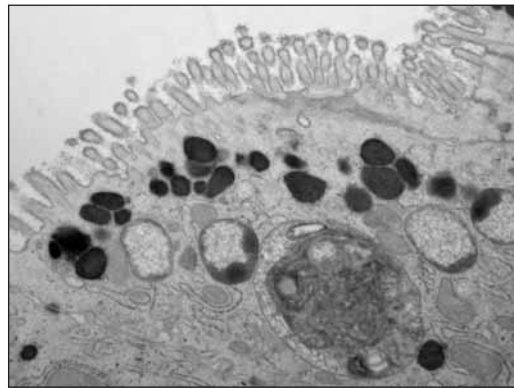


FIGURA 2B. V.R.M., 4 ani și 6 luni; Boală celiacă – fragment de mucoasă intestinală (microscopie electronică)

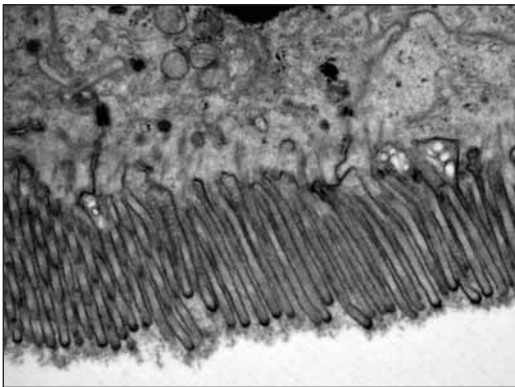


FIGURA 1B. O.T., 3 ani și 4 luni, Boală celiacă – fragment de mucoasă intestinală (microscopie electronică)



FIGURA 2C. V.R.M., 4 ani și 6 luni; Boală celiacă – fragment de mucoasă intestinală (microscopie electronică)

Figurile 2A, 2B și 2C reprezintă imagini histologice ale fragmentelor de mucoasă intestinală examinate la microscopul electronic obținute prin biopsie intestinală de la copilul V.R.M în vârstă de 4 ani și 6 luni, cu diagnosticul de *Boală celiacă* (FO 802/2011). Imaginile relevă epiteliul intestinal cu zone cu microvili de mici dimensiuni și zone fără microvili, alături de zone cu microvili normali; numeroase limfocite în epiteliu; mitocondrii cu aspect normal; infiltrat inflamator bogat în plasmocite în aria interstițială.

Figurile 3A, 3B și 3C redau imaginile observate la microscopul electronic prin examinarea fragmentului de biopsie intestinală de la copilul C.D, 4 ani, cu diagnosticul de *Sindrom postenteritic* (FO 1663/2010). Se observă microvili în deget de mănușă de cca 1μm înălțime, fără modificări structurale și cu glicocalixul păstrat (25 μm grosime); joncțiuni intercelulare cu structură normală; nu se constată microorganisme pe suprafața stratului epitelial; limfocitele intraepiteliale în limite normale. Concluzie: aspect normal.

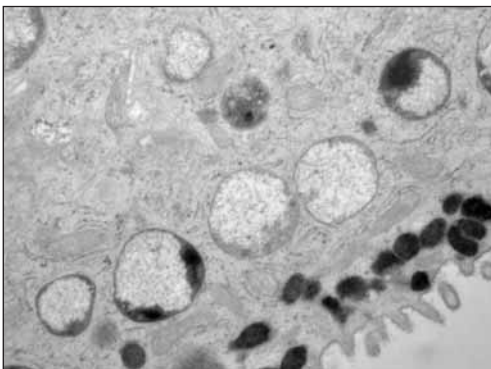


FIGURA 2A. V.R.M., 4 ani și 6 luni; Boală celiacă – fragment de mucoasă intestinală (microscopie electronică)

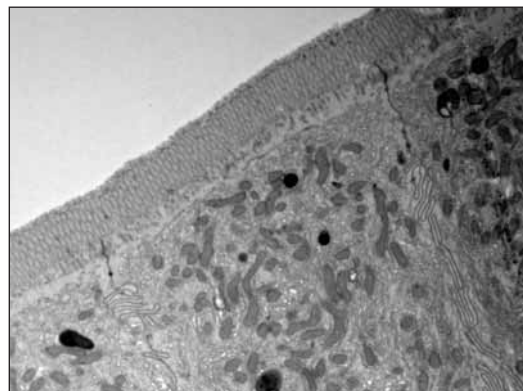


FIGURA 3A. C.D., 4 ani; Fragment de mucoasă intestinală (microscopie electronică) cu aspect normal

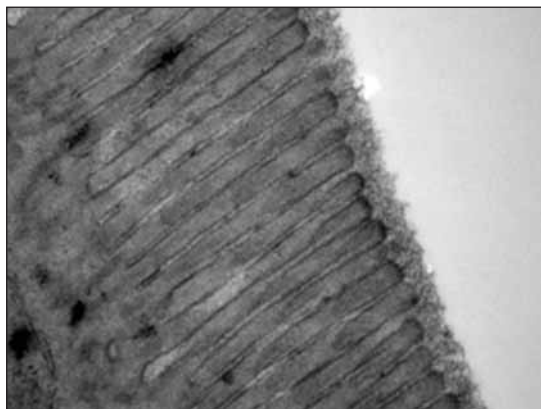


FIGURA 3B. C.D., 4 ani; fragment de mucoasă intestinală (microscopie electronică) cu aspect normal

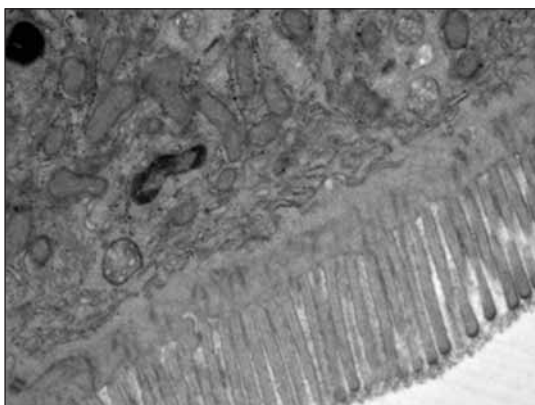


FIGURA 3C. C.D., 4 ani; fragment de mucoasă intestinală (microscopie electronică) cu aspect normal

Deși examinarea la microscopul electronic are rezoluție superioară, o putere de mărire mult mai mare și permite o mai mare adâncime a câmpului de examinare față de microscopia optică, este o metodă scumpă, fiind utilizată în prezent mai ales în cercetare.

DISCUȚII

Numărul mic de copii la care, pentru precizarea diagnosticului, a fost necesară efectuarea biopsiei intestinale confirmă că, în prezent, în diareea cronică examinarea histologică nu este o investigație de rutină, ci este rezervată cazurilor în care diagnosticul nu poate fi precizat în urma investigațiilor efectuate. În practica pediatrică examinarea histologică este efectuată mai ales pentru diagnosticul bolii celiace, fapt confirmat și de cazurile studiate, având în vedere că la majoritatea copiilor la care a fost efectuată biopsia intestinală, diagnosticul a fost de boală celiacă. Într-un caz biopsia intestinală a fost normală, diagnosticul final fiind de sindrom postenteritic.

Deși examinarea histologică la microscopul optic susține diagnosticul în boala celiacă (cri-

teriile Marsh), biopsia intestinală este efectuată în principal atunci când investigațiile imunologice au rezultate incerte. Determinarea anticorpilor tisulari antitransglutaminază IgA (TTG) are o sensibilitate și specificitate mare, mai ales pentru valori sigur pozitive (peste 100 ui) sau sigur negative (sub 20 ui) la pacienții cu niveluri normale de IgA. Pacienții cu valori TTG între 20-100 ui sau cu valori sub 20 ui și IgA scăzut, necesită determinare de anticorpi antiendomisiu sau și biopsie intestinală, în cazul deficienței de IgA în care există valori fals negative și ale EMA. (3, 4) În anumite cazuri este necesară efectuarea imunofenotipării HLA pentru excluderea predispoziției genetice la boala celiacă.

Biopsia intestinului subțire nu este o metodă de rutină pentru sindromul postenteritic, putând fi necesară uneori pentru diagnosticul diferențial. Totuși, mai multe studii efectuate au urmărit aspectele histologice prezente în diareea persistentă, atât la microscopul optic, cât și la microscopul electronic.

În diferite studii publicate, examinarea mucoasei intestinului subțire prin tehnica microscopiei optice la copiii cu diaree persistentă a arătat diferite grade de atrofię vilozitară, incluzând atrofię vilozitară subtotală, cu creșterea infiltratului inflamator în lamina propria.

U. Fagundes-Neto și col., într-un studiu efectuat pe 16 sugari cu diaree persistentă, au descris anomaliile histologice ale suprafeței intestinului subțire și prezența proliferării bacteriene în fluidul jejunal (5). Anomaliile morfologice ale mucoasei intestinului subțire care au fost observate în acest studiu la microscopul optic, au fost: atrofię vilozitară moderată observată cel mai frecvent (56,3%); atrofię vilozitară subtotală (43,7%); zone parcelare de microvili slab dezvoltati asociați frecvent cu vacuolizare intracitoplasmatică; creșterea infiltratului inflamator, cu limfocite, plasmocite și eozinofile în lamina propria.

AVANTAJELE MICROSCOPIEI ELECTRONICE (ME)

Microscopia optică este ușor de folosit și permite examinarea celulelor vii și a mișcărilor lor, dar are dezavantajul că poate mări numai până la 2.000 de ori, în timp ce microscopul electronic poate mări până la 20.000 de ori (uneori până la 2 milioane de ori). Scanarea la microscopul electronic are multe avantaje față de microscopul tradițional cu lumină optică, având rezoluție superioară, o putere de mărire mult mai mare și o mai mare adâncime a câmpului de examinare, permițând unei probe mai mari să fie

focalizată în același timp. Toate aceste avantaje, ca și claritatea imaginii, fac ca scanarea la microscopul electronic să fie unul dintre instrumentele foarte utile în cercetare în prezent. Totuși, această metodă este scumpă și dificil de folosit.

ASPECTE HISTOLOGICE LA MICROSCOPUL ELECTRONIC ÎN SINDROMUL POSTENTERITIC

Diareea persistentă postenteritică este asociată cu modificări vizibile atât la microscopul optic, cât și la microscopul electronic, dar modificările histologice se corelează slab cu severitatea simptomelor clinice. (6)

Deși examinarea la microscopul optic poate furniza informații importante pentru diagnostic, microscopia electronică permite vizualizarea unor modificări ale mucoasei jejunale chiar și în situațiile în care microscopia optică a fost normală. (7)

Examinarea prin tehnica microscopiei electronice a fragmentelor de mucoasă intestinală realizează scanarea suprafeței mucoasei intestinale la o putere mică, medie și mare, permițând:

- aprecierea tipului microvililor, a morfologiei vilozitare descrisă ca având formă de deget de mână sau de frunză, având margine scurtă sau lungă (margine scurtă = 2 x forma de frunză; margine lungă = 2 x marginea scurtă)
- determinarea numărului microvililor/mm² de suprafață a submucoasei examinate
- vizualizarea mucusului de suprafață, cantitatea de mucus prezent fiind analizată pe o scală de la 0-10, în care 0 indică absența completă a mucusului și 10 că întreaga suprafață a fost acoperită de mucus
- evaluarea leziunilor ultrastructurale ale mucoasei și a colonizării bacteriene

Această metodă permite o mai bună detectare a enteropatiei parcelare, la o putere mai mare fiind posibilă vizualizarea diferențierii enterocitelor, a glicocalixului care le acoperă, prezența microorganismelor și locul leziunilor celulare. (7, 8)

Distrucția severă a microvililor a fost observată în prezența bacteriilor aderente, dar și când bacteriile erau prezente, însă neaderente. Totuși, rămâne neclar dacă modificările observate în diareea persistentă sunt rezultatul episodului acut de enterită, al malnutriției sau al unor leziuni imune asociate cu sensibilizarea la proteinele laptelui de vacă sau la proteinele din soia. (6)

În diferite studii efectuate la pacienții cu diaree persistentă, au fost descrise modificările constatate prin examinarea electrono-microscopică. Astfel, la U. Fagundes-Neto și col., în studiul efectuat pe cei 16 sugari cu diaree persistentă, studiarea prin scanarea electrono-microscopică a biopsiilor de intestin subțire a arătat anomalii morfologice la toți cei 16 pacienți, variind în intensitate de la moderată (56,3%) la severă (43,7%), arătând câteva anomalii de suprafață, care, deși nespecifice, sunt destul de intense pentru a justifica severitatea aspectelor clinice avute în faza precoce a vieții.

La o putere mică de mărire (de 150 de ori):

- la mulți dintre microvili s-a observat o dezvoltare deficitară
- toți sugarii au avut anomalii histologice ale mucoasei intestinului subțire, și anume: 9 au avut atrofie vilozitară ușoară până la moderată, iar 7 au avut atrofie vilozitară severă
- în unele situații a existat atrofie vilozitară subtotală
- marginea vilozitară nu a fost distinct recunoscută, arătând atrofie subtotală
- zone vaste ale suprafeței vilozitare au fost acoperite cu mucus și detritus
- spațiile intervillozitare au fost lărgite

La o putere de mărire mai mare (de 7.500 de ori) s-au observat:

- deranjamente severe ale enterocitelor
- în mai multe situații celulele marginii în perie nu au fost clar definite și foarte adesea microviliile au fost reduși ca număr și înălțime, în unele zone existând completa dispariție a microvililor
- în mai multe zone microviliile au fost complet denudați și uneori au fost observate bacterii aderente de porțiunea apicală a enterocitelor
- la 3 pacienți a fost notată prezența limfocitelor și picăturilor de grăsime acoperind suprafața enterocitelor
- la jumătate din pacienți a fost observată o pseudomembrană mucofibrinoidă ce acoperă parțial enterocitele; această constatare a oferit o corelație pozitivă cu prezența dezvoltării bacteriene în intestinul subțire, oferind informații adiționale asupra fiziopatologiei diareei persistente. Pseudomembrana nu a fost asociată cu prezența vreunui microorganism particular, dar a fost clar asociată cu apariția dezvoltării bacteriene în intestinul subțire (5). Această structură reprezintă un veritabil biofilm la nivelul mucoasei intestinale,

care favorizează persistența infecției bacteriene la acest nivel și a sindromului diareic.

Într-un alt studiu, McClean și col. au studiat la microscopul electronic suprafața mucoasei jejunale de la 41 de copii cu diaree cronică, comparând modificările observate cu probele obținute de la copii fără simptome gastrointestinale. Ei au descris modificările constatate în diferite afecțiuni, dintre care (7):

În boala celiacă:

- 5 dintre copiii cu boală celiacă nediagnosticată anterior au avut modificări tipice la ME
- Suprafața a fost lipsită de vili, dar au fost observate enterocite în jurul deschiderii criptelor
- Câteva șuvițe de mucus au fost observate pe suprafața mucoasei
- Colonizarea bacteriană a fost prezentă numai într-un caz și a fost asociată cu pierderea glicocalixului de la nivelul enterocitelor din jur.

La 2 pacienți cu *sindrom postenteritic*, biopsiile au arătat:

- subdezvoltarea vililor
- scorul mucusului a variat între 3 și 7 în acest grup
- microorganismele au fost detectate la 10 din 12 pacienți, deși în 2 cazuri a fost identificat parazitul *Giardia Lamblia*
- prezența colonizării bacteriene a fost asociată cu pierderea glicocalixului și aglutinarea microvililor.

Anomaliile mucoasei intestinale observate la ME la sugarii cu diaree persistentă, deși nespecifice, sunt destul de intense ca să justifice severitatea aspectelor clinice. Scăderea numărului și înălțimii microvililor, turtirea marginii enterocitelor, pierderea glicocalixului, scurtarea vililor și prezența pseudomembranei de mucus ce acoperă suprafața mucoasei au fost modificările observate în diareea persistentă postenteritică. De asemenea, colonizarea bacteriană a suprafeței intestinului subțire poate fi prezentă și joacă un rol în patogeneza bolii și apariția intoleranței alimentare responsabile de perpetuarea diareei. (5)

Totuși, singurul copil cu sindrom postenteritic din cadrul studiului efectuat în IOMC, la care a fost efectuată biopsie intestinală cu examinare la microscopul optic și electronic, a avut aspect histologic normal.

CONCLUZII

Biopsia intestinală rămâne o metodă utilă de diagnostic în diareea cronică la copil, atunci când celelalte investigații nu pot preciza diagnosticul. Examinarea se face în principal la microscopul optic, dar microscopia electronică poate furniza date histologice suplimentare, având rezoluție superioară, o putere de mărire mult mai mare și permițând o adâncime mai mare a câmpului de examinare față de microscopia optică. Totuși, este o metodă scumpă, utilizată în prezent mai ales în cercetare.

BIBLIOGRAFIE

1. **Louis Țurcanu, Ioan Simedrea, Dorel Tănase, Emil Osteanu** – Bolile digestive la copil; Ed. Medicală 1988, cap. 1.3, pag. 41-88
2. **Riley S.A., Marsh M.N.** – Maldigestion and Malabsorption, in Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease: Pathophysiology /Diagnosis/ Management 6th edition (August 15, 1998): By W B Saunders; vol 2, sect X, chapter 88; Pag 97-130
3. **Collin C. Barker, Craig Mitton, Gareth Jevon, Thomas Mock** – Can Tissue Transglutaminase Antibody Titers Replace Small-Bowel Biopsy to Diagnose Celiac Disease in Select Pediatric Populations? *Pediatrics* 2005;115:1341-1346
4. **van der Windt D.A., Jellema P., Mulder C.J., Kneepkens C.M., van der Horst H.E.** – Diagnostic testing for celiac disease among patients with abdominal symptoms: a systematic review, *Journal of the American Medical Association*. *JAMA*. 2010 May 5; 303 (17): 1738-46.
5. **Fagundes-Neto U., De Martini-Costa S., Pedrosa M.Z. and I.C.A.** – Scaletsky Studies of the small bowel surface by scanning electron microscopy in infants with persistent diarrhea *Braz J Med Biol Res*, December 2000, Volume 33(12) 1437-1442
6. **Claude C. Roy, Arnold Silverman, Daniel Alagille** – Persistent postenteritis diarrhea, *Pediatric Clinical Gastroenterology*, 4th ed. Chapt. 8, 262-265, 1995
7. **McClean P., Dodge J.A., Nunn S., Carr K.E., Sloan J.M.** – Surface Features of Small-Intestinal Mucosa in Childhood Diarrheal Disorders, *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition: Volume 23 (5), December 1996*, pp 538-546
8. **Gherghina I., Matei D., Monica Mihaela Aloman, Mirela Iușan, Eliza Elena Ioniță, Maria Cristina Cârjă, Mona Dumbravă** – Actualități în diareile cronice la copil, "Medicina Modernă", Vol. XI, Nr. 4, 2004: 201-211