

## KRYTERIA ROZPOZNAWANIA ORAZ OCENY KLINICZNEJ PACJENTÓW ZARAŻONYCH *ECHINOCOCCUS MULTILOCULARIS* LECZONYCH W OŚRODKU POZNAŃSKIM

JERZY STEFANIAK<sup>1</sup>, MAŁGORZATA PAUL<sup>1</sup>, ELŻBIETA KACPRZAK<sup>1</sup>, JERZY  
POLAŃSKI<sup>2</sup>, LIDIA CHOMICZ<sup>3</sup> I PRZEMYSŁAW MYJAK<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Klinika Chorób Tropikalnych i Pasożytniczych, Akademia Medyczna, ul. Przybyszewskiego 49, 60-355 Poznań; <sup>2</sup>II Katedra i Klinika Chirurgii, Akademia Medyczna, ul. Stępińska 19/25, 00-739 Warszawa; <sup>3</sup>Zakład Biologii Medycznej, Akademia Medyczna, ul. Nowogrodzka 73, 02-018 Warszawa; <sup>4</sup>Międzywydziałowy Instytut Medycyny Morskiej i Tropikalnej, Akademia Medyczna, ul. Powstania Styczniowego 9b, 81-519 Gdynia

**ABSTRACT.** Case definitions and clinical evaluation of patients infected with *Echinococcus multilocularis* treated in the Poznań centre. Recent epidemiological reports have shown an increasing risk of *E. multilocularis* infection among red foxes and humans in Poland. The aims of the study were: (i) to improve the early detection of alveolar echinococcosis (AE) in humans by implementation of clinical, imaging, immunodiagnostic, ultrastructural and molecular methods, (ii) to realize the parasitological verification of registered cases suspected of alveococcosis by the specialized, parasitological centres, and (iii) to standardize diagnostic and therapeutic procedures for this severe parasitic disease. Since 1993, eight cases of AE were registered in the Poznań centre. The final diagnosis was based on PAS-positive staining of lesions by histopathology or a detection of the parasite's DNA in liver sections. Collaboration with physicians of various medical specialities is crucial for an early and more effective recognition of AE. Alveococcosis should always be considered in the differential diagnosis of space-occupying lesions in the liver suggesting slow-growing cancer.

**Key words:** alveolar echinococcosis, clinical evaluation, *Echinococcus multilocularis*, histopathology, imaging, serological diagnosis.

### WSTĘP

W ostatnich latach, obserwuje się w Polsce wzrost zapadalności na bąblowicę wielokomorową wywoływaną przez tasiemca *Echinococcus multilocularis*, co sugeruje potrzebę uwzględniania tej inwazji pasożytniczej w diagnostyce różnicowej zmian ogniskowych wątroby, a zwłaszcza chorób nowotworowych. Pierwsze doniesienie o występowaniu bąblowca *E. multilocularis* wśród lisów rudyh (*Vulpes vulpes*) z okolic Gdańska pochodzi z 1994 roku (Malczewski i wsp. 1995). Dalsze badania epidemiologiczne prowadzone na terenie Polski Północnej i Południowo-Wschodniej wykazały, że aż 40% populacji lisów zamieszkujących rejony woje-



wództwa warmińsko-mazurskiego jest zarażonych *E. multilocularis*, natomiast na Podkarpaciu odsetek ten jest wyraźnie wyższy i w niektórych powiatach przekracza nawet 70% (Malczewski, korespondencja własna). W latach 1992-2003, zarejestrowano w kraju 25 przypadków alweokokozy wśród pacjentów pochodzących z terenu województwa pomorskiego, warmińsko-mazurskiego, lubuskiego i mazowieckiego. Zawód związany z leśnictwem (myśliwi, hodowcy lisów, rolnicy, garbarze) lub zwyczaj zbierania grzybów, jagód oraz jeżyn sprzyjają zachorowaniom na alweokozę, w tym także rodzinnemu występowaniu tej choroby. Bąblowica wielokomorowa w 99% przypadków lokalizuje się w wątrobie, najczęściej w pobliżu jej wnęki, w sąsiedztwie dużych naczyń krwionośnych i głównych dróg żółciowych. Inwazja u człowieka rozwija się długotrwale i podstępnie, doprowadzając do zgonu przeważnie w ciągu 10-15 lat i charakteryzuje się zbliżonym do nowotworowego, lecz powolnym wzrostem, naciekając okoliczne tkanki i narządy oraz tworząc odległe ogniska przerzutowe w płucach i w mózgu. Różnorodny przebieg i obraz kliniczny choroby, w którym dominują objawy żółtaczki, postępującego wyniszczenia, hepatosplenomegalii z cechami nadciśnienia wrotnego, niewydolności wątroby z hipertransaminazemią, hipergammaglobulinemią oraz typowymi, heterogennymi zmianami ogniskowymi o cechach rozrostu nowotworowego z obszarami martwicy, a także zwapnień w części centralnej lub na obrzeżach są charakterystyczne dla alweokokozy (Stefaniak 2002). O pomyślnym rokowaniu klinicznym decyduje wczesne rozpoznanie tej ciężkiej choroby pasożytniczej, umożliwiające przeprowadzenie radykalnego zabiegu chirurgicznego w skojarzeniu z długotrwałą, co najmniej 2-letnią chemioterapią lekiem przeciwpasożytniczym z grupy benzimidazoli, a także jej prawidłowe różnicowanie z nowotworami wątroby o charakterze pierwotnym lub przerzutowym.

Celem pracy było: (1) zwiększenie wczesnej wykrywalności przypadków bąblowicy wielokomorowej u ludzi, za pomocą badań obrazowych, immunodiagnostycznych i molekularnych, (2) przeprowadzanie weryfikacji parazytologicznej przypadków zgłaszanych z podejrzeniem alweokokozy do ośrodka specjalistycznego, oraz (3) opracowanie i ujednoczenie zaleceń diagnostyczno-terapeutycznych dla pacjentów zarażonych *E. multilocularis*.

#### MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono u 8 pacjentów z potwierdzoną alweokozą (stosunek kobiet do mężczyzn 1:1), kierowanych do Kliniki Chorób Tropikalnych i Pasożytniczych AM w Poznaniu w latach 1993-2003, w ramach europejskiego rejestru przypadków *E. multilocularis* koordynowanego przez Katedrę Chorób Zakaźnych Uniwersytetu w Ulm (European Registry of Alveolar Echinococcosis). Wiek pacjentów w momencie rozpoznania inwazji *E. multilocularis* wahał się od 28 do 61 lat (średnia wieku 46,1 lat). Badani pacjenci zamieszkiwali od wielu lat tereny wo-



jewództwa warmińsko-mazurskiego ( $n = 7$ ); tylko jedna osoba pochodziła z województwa lubuskiego. Miejsce urodzenia pacjentów z alweokokozą również pokrywało się z regionami kraju o szczególnie wysokim ryzyku zarażenia tasiemcem: 6 pacjentów wywodziło się z województwa warmińsko-mazurskiego, natomiast pozostałe 2 osoby odpowiednio z Mazowsza oraz z Litwy.

Diagnostykę obrazową zmian ogniskowych w wątrobie przeprowadzono za pomocą aparatu Aloka Prosound SSD 5500 (Japonia) z głowicą typu convex o częstotliwości 3,5 MHz. W wybranych przypadkach, w których obraz ultrasonograficzny wątroby był niejednoznaczny lub podejrzewano możliwość odległych przerzutów do ośrodkowego układu nerwowego, wykonywano uzupełniające badanie tomograficzne jamy brzusznej lub głowy z podaniem kontrastu naczyniowego, z zastosowaniem aparatu typu Synerview 600 firmy Picker.

W immunologicznym rozpoznawaniu inwazji *E. multilocularis* wykorzystano klasyczny test immunoenzymatyczny ELISA ze swoistym antygenem Em2<sup>plus</sup> (kombinacja Em2 oraz II/3-10), o czułości diagnostycznej nie przekraczającej 90% (Bordier Affinity Products, Crissier, Szwajcaria). W celu zwiększenia wykrywalności alweokokozy, wprowadzono po raz pierwszy w Polsce analizę profilu immunologicznego swoistych przeciwciał metodą immunoblottingu (Western blot), która jest techniką referencyjną w serologicznym rozpoznawaniu tej inwazji.

Podejrzenie bąblowicy wielokomorowej *E. multilocularis* wysuwano na podstawie (i) obecności nieregularnych zmian ogniskowych w wątrobie w badaniach obrazowych (Rys. 1), (ii) wykrycia swoistych przeciwciał surowiczych w kierunku antygeny Em2<sup>plus</sup>, (iii) stwierdzenia obecności immunoglobulin skierowanych przeciwko antygenom o masie 16 i 18 kDa w referencyjnej technice immunoblottingu



Rys. 1. Typowa zmiana ogniskowa w wątrobie w wyniku inwazji *E. multilocularis*. Obraz ultrasonograficzny, Aloka Prosound SSD 5500 (Japonia). Kolekcja własna



(Ito i wsp. 1998), natomiast ostateczne potwierdzenie przeprowadzono w oparciu o (iv) badanie histopatologiczne materiału uzyskanego na drodze chirurgicznej, uwidoczniające struktury nieregularnych pęcherzyków PAS-dodatnich, odczynowy rozrost tkanki łącznej, ogniska martwicy i zwapnień, a także zmiany strukturalne hepatocytów oraz (v) badania molekularne wskazujące na obecność DNA pasożyta w skrawkach tkanki wątroby.

Określenie rozległości zmian wywoływanych przez rozrost postaci larwalnej *E. multilocularis* oraz określenie stopnia zaawansowania klinicznego i rokowania w bąblowicy wielokomorowej przeprowadzono w oparciu o międzynarodową klasyfikację PNM (ang. parasite-neighbouring organs-metastases), uwzględniającą lokalizację zmian ogniskowych w wątrobie w stosunku do wnęki, włączenie w proces chorobowy okolicznych tkanek, narządów i węzłów chłonnych, a także nacieczenie naczyń krwionośnych i dróg żółciowych, obecność odległych przerzutów do płuc i ośrodkowego układu nerwowego, na podstawie wykonanych badań obrazowych i histopatologicznych, zweryfikowanych oceną chirurgiczną *in situ* podczas zabiegu operacyjnego (Pawłowski i wsp. 2001).

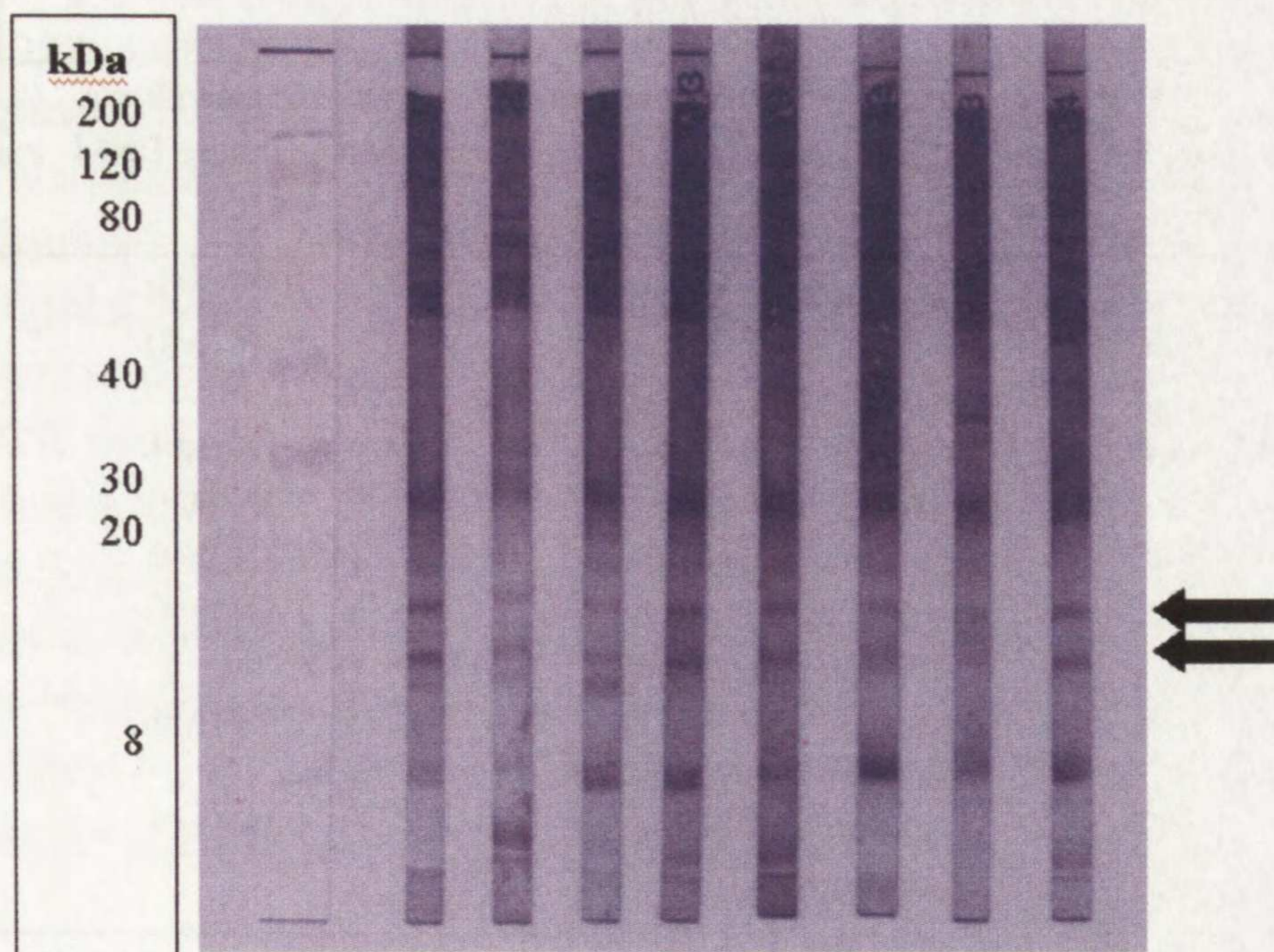
#### WYNIKI I DYSKUSJA

Spośród 8 pacjentów zarażonych *E. multilocularis*, rozległe zmiany obejmujące wnękę wątroby oraz oba jej płaty stwierdzono u 7 osób; tylko u jednego pacjenta pasożyt lokalizował się na obwodzie prawego płata wątroby bez naciekania głównych dróg żółciowych, ani naczyń wnęki wątroby. Poszerzenie dróg żółciowych obwodowych i wewnątrzwątrobowych, ich przemieszczenie, niedrożność lub ucisk pęcherzyka żółciowego zaobserwowano u 4 chorych. Okoliczne tkanki i narządy (węzły chłonne przyaortalne, okołokawalne, przepona, trzustka, prawa nerka i nadnercze) były włączone w proces chorobowy u 5 osób; u 3 z nich zaobserwowano nacieczenie odpowiednio (1) aorty piersiowej i żyły głównej dolnej, (2) aorty brzusznej i pnia trzewnego oraz (3) żyły głównej dolnej, zwiększające ryzyko powstania rozsiewu drogą krwiopochodną. U 3 pacjentów wykryto odległe ogniska przerzutowe: (1) w płucach, (2) w płucach, opłucnej i mózdzku oraz (3) w opłucnej, mózgowiu i mózdzku, z objawami obrzęku mózgu, niedowładu połowicznego prawostronnego i uogólnionych drgawek toniczno-klinicznych z utratą świadomości.

Obecność potencjalnych czynników ryzyka zarażenia *E. multilocularis* potwierdzono u wszystkich badanych. W wywiadzie epidemiologicznym, większość pacjentów zgłaszała zwyczaj częstego, sezonowego zbierania owoców runa leśnego (grzyby, jagody, borówki) lub zamieszkiwała w pobliżu lasu ( $n = 6$ ). Wykonywanie zawodu związanego z leśnictwem, myślistwem lub rolnictwem zanotowano u 5 osób. Tylko u dwóch pacjentów potwierdzono bezpośredni kontakt z lisem.



Poziom swoistych przeciwciał IgG w kierunku kompleksu antygenowego Em2<sup>plus</sup> *E. multilocularis* wynosił u badanych 8 pacjentów od 0,959 do 2,793 (OD średnio  $1,628 \pm 0,639$ ). Na uwagę zasługuje fakt występowania krzyżowej odpowiedzi immunologicznej z antygenami *E. granulosus*. Dodatkowo wyniki testu immunoenzymatycznego ELISA w kierunku bąblowicy jednojamowej uzyskano u 7 spośród 8 pacjentów; tylko u jednego z badanych wynik testu był wątpliwy. Wynika stąd konieczność interpretowania dodatniego odczynu serologicznego w kierunku echinokokozy z dużą ostrożnością oraz każdorazowego wykonywania uzupełniającego badania na obecność inwazji *E. multilocularis*. Technika immunoblottingu, charakteryzująca się wysoką swoistością diagnostyczną, pozwoliła na serologiczne potwierdzenie wszystkich 8 przypadków alweokokozy. W surowicy krwi obwodowej wykryto obecność immunoglobulin IgG przeciwko antygenom o masie 16 i 18 kDa, wysoce swoistym dla tasiemca *E. multilocularis*. Dodatkowo uwidoczniono prążki przeciwciał reagujących z antygenami 7 oraz 26-28 kDa, charakterystycznymi dla rodzaju *Echinococcus*. Obecność dwóch wąskich prążków przeciwciał dla antygenów Em16 i Em18 okazała się wartościowym markerem immunologicznym inwazji *E. multilocularis*, pozwalającym na jej różnicowanie z echinokokożą *E. granulosus* (Rys. 2). Zastosowana technika Western blot nie wykazywała niespecyficznych reakcji krzyżowych w przypadkach niepasżytnicznych torbieli prostych wątroby, ropni bakteryjnych, nowotworów złośliwych wątroby i jamy brzusznej, naczynek lub bąblowicy jednojamowej.



Rys. 2. Analiza profilu immunologicznego swoistych przeciwciał w kierunku *E. multilocularis* z zastosowaniem techniki Western blot. Strzałki wskazują prążki swoistych przeciwciał IgG skierowanych przeciwko antygenom Em16 i Em18



Ostateczne potwierdzenie alweokokozy zostało przeprowadzone w oparciu o badanie histopatologiczne wycinka zmiany ogniskowej w wątrobie, wykrywające strukturę nieregularnych, różnej wielkości pęcherzyków postaci larwalnej pasożyta, barwiących się metodą Schiffa (PAS). W 6 wybranych przypadkach wykryto obecność DNA *E. multilocularis* techniką polimerazowej reakcji łańcuchowej (PCR).

U wszystkich pacjentów zastosowano rozległy zabieg chirurgiczny, skojarzony z intensywnie prowadzonym leczeniem przeciwpasożytniczym albendazolem (Zentel, SmithKline Beecham). W ocenie stanu klinicznego, istotną progresję choroby zaobserwowano u 5 spośród 8 chorych (62,5%), natomiast u dwóch pacjentów stan określono jako stabilny. U większości chorych stwierdzano najbardziej zaawansowany IV stopień inwazji *E. multilocularis* (n = 6). Tylko u jednej pacjentki uzyskano regresję choroby w wyniku wczesnego ustalenia rozpoznania klinicznego, na podstawie wykazania immunizacji w kierunku swoistych antygenów pasożyta Em16 i Em18 oraz możliwości wykonania radykalnego zabiegu chirurgicznego stosunkowo ograniczonej zmiany ogniskowej, nie naciekającej głównych naczyń krwionośnych (pacjent nr 4). Dwóch pacjentów z rozległymi zmianami w wątrobie i sąsiadujących narządach zmarło wkrótce po zabiegu chirurgicznym (pacjenci nr 2 i 7). Inny przypadek zakończył się zgonem w ciągu 3 miesięcy od zabiegu transplantacji wątroby (pacjent nr 5) (Tabela 1).

Tabela 1. Potencjalne czynniki ryzyka zarażenia oraz ocena stanu klinicznego pacjentów z alweokokozą

Pacjent	Płeć	Wiek (w latach)	Czynniki ryzyka zarażenia	Międzynarodowa klasyfikacja PNM	Stopień zaawansowania klinicznego
1.	M	31	gospodarstwo rolne	P3N1M0	III b
2.	K	61	gospodarstwo rolne	P4N1M0	IV
3.	M	31	zbieranie runa leśnego	P1N1M1	IV
4.	K	60	zbieranie runa leśnego	P3N0M0	III a
5.	M	42	zbieranie runa leśnego	P4N0M0	IV
6.	K	28	gospodarstwo rolne	P4N1M0	IV
7.	M	56	myśliwy	P3N1M1	IV
8.	K	60	transport i obróbka drewna	P4N1M1	IV
			gospodarstwo rolne		
			zbieranie runa leśnego		

Zarażenie ludzi *E. multilocularis* w Polsce rozpoznawane jest w okresie znacznie zaawansowanego rozrostu pasożyta, kiedy jest już zbyt późno na przeprowadzenie radykalnej resekcji co najmniej 2 segmentów wątroby lub hemihepatektomii (Chomicz i wsp. 2003). W Europie Zachodniej, tylko 35% pacjentów zgłasza się



w początkowym okresie choroby, umożliwiającym wykonanie częściowej resekcji wątroby (Bresson-Hadni i wsp. 2003). W ciężkich klinicznie przypadkach rozsiewu pasożyta drogą krwiopochodną, naciekającego duże naczynia krwionośne jamy brzusznej (układ wrotny, żyła główna dolna, aorta), mało skuteczna okazuje się także transplantacja wątroby. W grupie 47 pacjentów z Europy Zachodniej, u których wykonano transplantację wątroby w ciągu ostatnich 20 lat, 9 chorych zmarło podczas zabiegu lub w krótkim okresie pooperacyjnym, a odsetek 5-letnich przeżyć bez nawrotu choroby osiągał 58%. Stąd też u chorych z alweokokozą, ograniczono wskazania do transplantacji wątroby, zawężając je wyłącznie do przypadków z zajęciem wnęki wątroby, objawami marskości, nadciśnienia wrotnego, wodobrzusza lub nawracających stanów zapalnych dróg żółciowych. W wyniku leczenia immunosupresyjnego lub zbyt późnego kontynuowania terapii albendazolem po zabiegu, ryzyko nawrotu bąblowicy wielojamowej oraz odległych przerzutów u chorych po transplantacji wątroby jest wysokie (Bresson-Hadni i wsp. 2003). Leczenie przeciwpasożytnicze stosowane przed transplantacją pozwala na prewencję nawrotów bąblowicy lub ich opóźnienie. Natomiast potransplantacyjne stosowanie benzimidazoli wpływa na stabilizację procesu i redukcję pozostawionych fragmentów pasożyta (Bresson-Hadni i wsp. 1999).

We wczesnym rozpoznawaniu i leczeniu przypadków alweokokozy, na obszarach wysokiego ryzyka występowania choroby, kluczową rolę odgrywa współdziałanie służb weterynaryjnych oraz wielospecjalistycznego zespołu badawczego, złożonego z parazytologa klinicznego, gastroenterologa, chirurga, radiologa, onkologa, immunologa oraz biologa molekularnego. Szczególny charakter rozwoju postaci larwalnej pasożyta, cechujący się destrukcyjnym, naciekającym sąsiadujące i odległe tkanki wzrostem, zbliżonym do nowotworowego, wymaga szczegółowej diagnostyki różnicowej z pierwotnymi nowotworami złośliwymi wątroby, a także z wtórnymi ogniskami przerzutowymi do wątroby. Stąd też w każdym przypadku nieregularnej zmiany ogniskowej w wątrobie, zaleca się barwienie wycinków histopatologicznych metodą Schiffa oraz uzupełniające badanie immunologiczne surowicy krwi obwodowej w kierunku obecności swoistych przeciwciał anty-Em16 i Em18 referencyjną techniką immunoblottingu. Rokowanie pacjentów zarażonych *E. multilocularis* w dużej mierze jest uzależnione od uwzględnienia tej inwazji pasożytniczej w diagnostyce różnicowej zmian ogniskowych w wątrobie, stwierdzanych w badaniach ultrasonograficznych jamy brzusznej i ich niezwłocznego kierowania do specjalistycznych ośrodków referencyjnych.

#### LITERATURA

- Bresson-Hadni S., Koch S., Beurton I., Vuitton D.A., Bartholomot B., Hrusovsky S., Hyde B., Leny D., Minello A., Becker M.C., Vanlemmens C., Manton G.A., Miguet J.P. 1999. Primary disease recurrence after liver transplantation for alveolar echinococcosis: long-term evaluation in 15 patients. *Hepatology* 30: 857-864.



- Bresson-Hadni S., Koch S., Miguet J.P., Gillet M., Manton G.A., Heyd B., Vuitton D.A. 2003. Indications and results of liver transplantation for *Echinococcus* alveolar infection: an overview. *Langenbecks Archives of Surgery* 388: 231-238.
- Chomicz L., Szubert A., Fiedor P., Stefaniak J., Myjak P., Zbrowska J., Polański J.A. 2003. Human cystic and alveolar echinococcoses as indication to liver transplantation. *Proceedings of Transplantation* 35: 2260-2261.
- Ito A., Ma L., Paul M., Stefaniak J., Pawłowski Z.S. 1998. Evaluation of Em18-, Em16-, antigen B-Western blots, Em2plus-ELISA and four other tests for differential serodiagnosis of alveolar and cystic echinococcosis patients in Poland. *Parasitology International* 47: 95-99.
- Malczewski A., Rocki B., Ramisz A., Eckert J. 1995. *Echinococcus multilocularis* (Cestoda), the causative agent of alveolar echinococcosis in humans: first record in Poland. *Journal of Parasitology* 81: 318-321.
- Pawłowski Z.S., Eckert J., Vuitton D.A., Ammann R.W., Kern P., Craig P.S., Dar K.F., De Rosa F., Filice C., Gottstein B., Grimm F., Macpherson C.N.L., Sato N., Todorov T., Uchino J., von Sinner W., Wen H. 2001. Echinococcosis in humans: clinical aspects, diagnosis and treatment. In: *WHO/OIE manual on echinococcosis and animals: a public health problem of global concern*. (Eds. J. Eckert, M.A. Gemmell, F.X. Meslin, Z.S. Pawłowski). World Organisation for Animal Health and World Health Organization, Paris: 20-71.
- Stefaniak J. 2002. Alweokokoza wątroby. *Medycyna po Dyplomie* 11: 236-243.

Zaakceptowano do druku 14 czerwca 2004