

OCENA RYZYKA WYSTĘPOWANIA NIESPECYFICZNYCH REAKCJI KRZYŻOWYCH Z ANTYGENEM Em2^{plus} *ECHINOCOCCUS* *MULTILOCCULARIS* U PACJENTÓW Z NOWOTWORAMI WĄTROBY

MAŁGORZATA PAUL¹, JERZY STEFANIAK¹, WITOLD RYCHLICKI¹, ELŻBIETA
KACPRZAK¹, MAŁGORZATA MAZUR-ROSZAK² I MIECZYŚLAW KOMARNICKI³

¹Katedra i Klinika Chorób Tropikalnych i Pasożytniczych, Akademia Medyczna,
ul. Przybyszewskiego 49, 60-355 Poznań; ²Katedra i Klinika Onkologii, Akademia Medyczna, ul.
Łąkowa 1/2, 61-848 Poznań; ³Katedra i Klinika Hematologii i Chorób Rozrostowych Układu
Krwiotwórczego Akademia Medyczna, ul. Szamarzewskiego 84, 60-569 Poznań

ABSTRACT. Evaluation of a risk of a cross-reactivity with *Echinococcus multilocularis*-specific Em2^{plus} antigen in patients with liver cancers. The incidence of non-specific reactions with Em2^{plus} *E. multilocularis* antigen in patients with liver malignancies, and the risk of a supradiagnosis of alveolar echinococcosis (AE) in space-occupying lesions in the liver due to neoplastic proliferative diseases were studied. Analysis of specific IgG serum antibody against Em2^{plus} antigenic complex was performed in 11 AE patients in comparison to 76 individuals with malignant neoplasms of abdominal or extra-hepatic location, including some patients with primary hepatocellular cancer or distant metastases to liver, and 42 patients with benign hepatic lesions. Only one false borderline result was reported in a case with colorectal cancer, and dissemination to liver. Low risk of false positive results with *E. multilocularis*-specific Em2^{plus} antigen in patients with liver malignancies makes the test valuable for practical reasons in a differential diagnosis of irregular tumor masses visualized by imaging techniques.

Key words: alveococcosis, differential diagnosis, *Echinococcus multilocularis*, Em2^{plus} antigen, liver cancers.

WSTĘP

Zarażenie postacią larwalną tasiemca *Echinococcus multilocularis* przybiera u człowieka formę przewlekłej, obarczonej wysoką śmiertelnością choroby wątroby, przypominającej powolny rozrost nowotworowy. Pasożyt lokalizuje się przeważnie w prawym płacie wątroby w pobliżu wnęki, tworząc nieregularną, słabo odgranieczoną od otoczenia zmianę ogniskową, powodującą niedrożność lub przemieszczenie dróg żółciowych oraz infiltrację naczyń wątrobowych i żyły wrotnej. Naciekający charakter wzrostu pasożyta, za pośrednictwem długich wypustek, powoduje zajęcie okolicznych tkanek i narządów takich jak przepona, płuca, osierdzie, serce, jama otrzewnowa, żołądek, dwunastnica, trzustka, nerki, węzły chłonne,

a także ściana jamy brzusznej. Ryzyko tworzenia odległych ognisk przerzutowych do płuc i mózgowia, szerzących się drogami naczyń krwionośnych i limfatycznych, często sugeruje rozsiany, zaawansowany proces nowotworowy. Mało charakterystyczny, zwykle skąpoobjawowy w początkowym okresie choroby, przebieg kliniczny oraz wyniki badań obrazowych jamy brzusznej, uwidaczniają niejednorodną, hiper- i hipoechogenną strukturę imitującą obraz guza wątroby. Dodatkowo tworzące się w późnym okresie ogniska martwicy, zwłóknień oraz centralnych lub peryferyjnych zwapnień, często utrudniają rozpoznanie inwazji pasożytniczej.

Testy immunodiagnostyczne, wykrywające przeciwciała w kierunku swoistego dla *E. multilocularis* naturalnego antygenem Em2, mogą być bardzo pomocne w rozstrzygnięciu rozpoznania klinicznego. Są one wykorzystywane zarówno w (i) badaniach seroepidemiologicznych, u osób pochodzących z terenów o wysokim skażeniu środowiska inwazyjnymi jajami tasiemca oraz wśród zawodowych grup ryzyka, jak i w (ii) ocenie skuteczności leczenia i określenia ryzyka powstawania nawrotów choroby w przypadkach potwierdzonej alweokokozy (Gottstein i wsp. 1989, 2001; Bresson-Hadni i wsp. 1994; Craig i wsp. 2000). Swoisty antygen Em2 uzyskiwany jest z oczyszczonych chromatograficznie ekstraktów tkankowej postaci larwalnej *E. multilocularis*. Inny, rekombinowany antygen pasożyta II/3-10, powstały na drodze klonowania molekularnego na *E. coli*, wykazuje zbliżone parametry diagnostyczne do antygenem Em2. Czulość analityczna testów immunoenzymatycznych opartych na wymienionych antygenach wynosi odpowiednio 90 i 92%, a przy zastosowaniu ich kombinacji wzrasta do 99% (Gottstein i wsp. 1993). Stąd też połączenie antygenowe Em2-II/3-10 *E. multilocularis* jest coraz szerzej stosowane w serologicznym rozpoznawaniu tej inwazji pasożytniczej jako test pierwszej linii diagnostycznej.

Celem pracy było (i) określenie częstości występowania nieswoistej odpowiedzi immunologicznej z antygenem Em2^{plus} *E. multilocularis* u pacjentów z chorobami nowotworowymi wątroby i przewodu pokarmowego oraz (ii) ocena ryzyka niewłaściwego rozpoznawania alweokokozy u osób ze zmianami ogniskowymi wątroby o charakterze rozrostowym.

MATERIAŁ I METODY

Ocenę poziomu swoistych przeciwciał IgG przeciwko antygenowi Em2^{plus} *E. multilocularis*, przeprowadzono w surowicy krwi obwodowej u 11 pacjentów z alweokokozą (7 kobiet i 4 mężczyzn) w wieku od 28 do 65 lat (średnio 48,0 lat), hospitalizowanych lub konsultowanych w Klinice Chorób Tropikalnych i Pasożytniczych Akademii Medycznej w Poznaniu, w porównaniu do 76 pacjentów z chorobami rozrostowymi o lokalizacji wątrobowej i pozawątrobowej, w tym 41 kobiet w wieku 32-75 lat (średnia 54,9 lat) oraz 35 mężczyzn w wieku 35-73 lat (średnia 56,3 lat).

Rozpoznanie bąblowicy wielokomorowej potwierdzono na podstawie (i) badania histopatologicznego wycinka tkanki wątroby, uzyskanego na drodze laparoskopii lub zabiegu chirurgicznego, uwidaczniającego struktury nieregularnych, różnej wielkości pęcherzyków PAS-dodatnich z towarzyszącym odczynowym rozrostem tkanki łącznej włóknistej oraz ogniskami martwicy i zwapnień, przy braku obecności onkocytów, oraz (ii) uzupełniającego badania immunodiagnostycznego w kierunku obecności przeciwciał IgG skierowanych przeciwko swoistym dla *E. multilocularis* antygenom o masie 16 i 18 kDa (Em16 i Em18) z zastosowaniem referencyjnej techniki immunoblottingu.

W grupie 76 pacjentów onkologicznych, znajdowało się 31 osób (40,8%) z nowotworami złośliwymi wątroby o charakterze pierwotnym (*carcinoma hepatocellulare*, *adenocarcinoma hepatis*) lub przerzutowym, 11 pacjentów (14,5%) z guzami przewodu pokarmowego (rak żołądka, okrężnicy, odbytnicy) oraz 34 osoby (44,7%) z chorobami nowotworowymi o lokalizacji pozawątrobowej (chłoniaki ziarnicze i niezziarnicze, czerniak, szpiczak mnogi, rak sutka, płuc, żuchwy, jądra, mięsak Ewinga). Odległe ogniska przerzutowe do wątroby, w przebiegu raka okrężnicy, żołądka, sutka lub ziarnicy złośliwej, stwierdzono u 21 osób (27,6%). U 3 chorych z przerzutami do wątroby nie wykryto pierwotnej lokalizacji nowotworu.

Możliwość krzyżowej odpowiedzi immunologicznej z antygenem *E. multilocularis* sprawdzono również w oparciu o badanie 25 surowic pochodzących od pacjentów z echinokokozą *E. granulosus* oraz 10 próbek pobranych od osób z innymi chorobami pasożytniczymi wątroby i przewodu pokarmowego (tasiemczyca, schistosomoza).

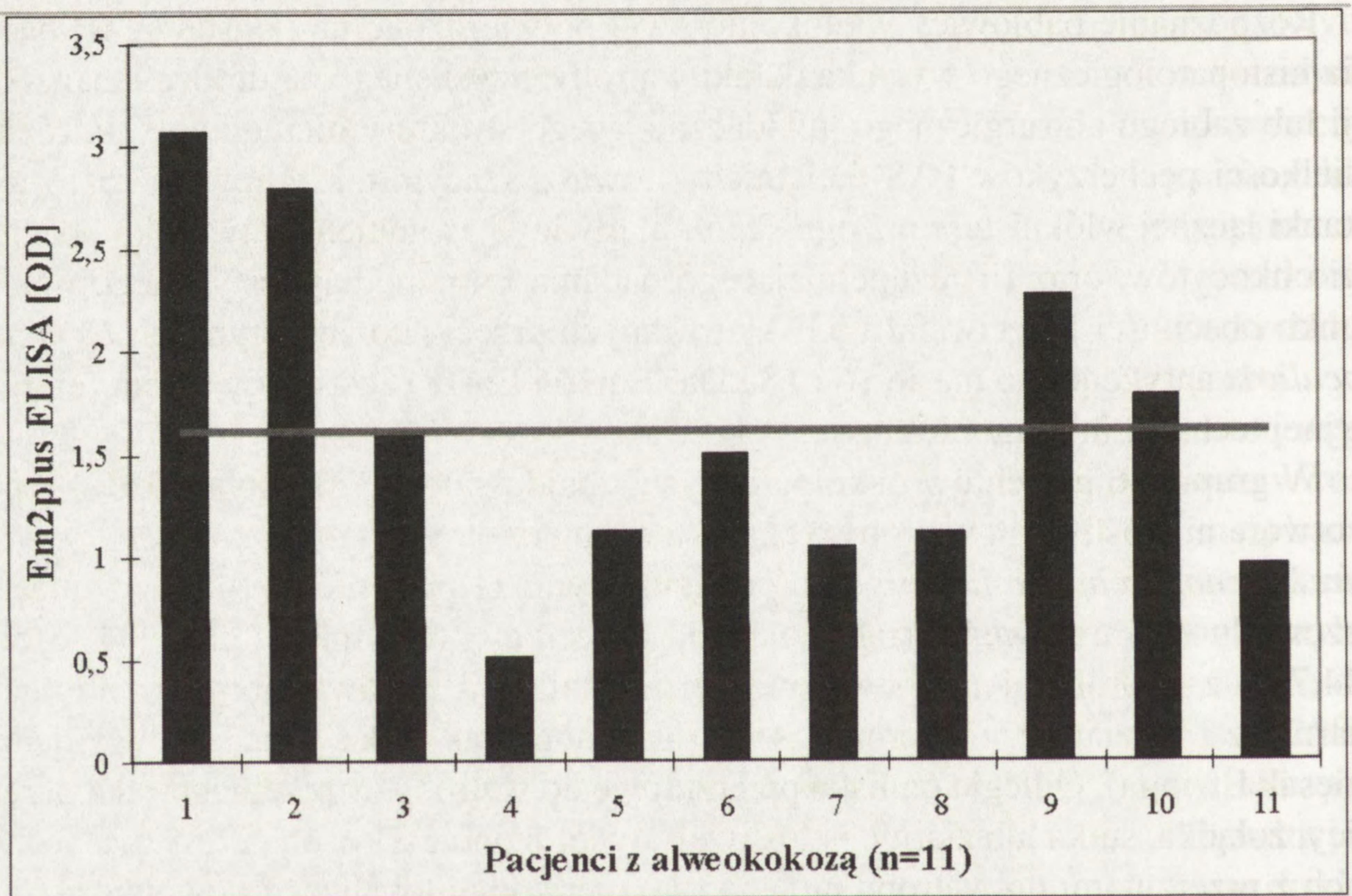
Grupę kontrolną stanowiły surowice pobrane od 42 pacjentów (31 kobiet i 11 mężczyzn) z łagodnymi zmianami ogniskowymi wątroby (niepasożytnicze torbiele proste, wielotorbielowatość wątroby i nerek, naczyniaki) w wieku od 32 do 72 lat (średnia 53,7 lat).

Oznaczenie poziomu immunoglobuliny klasy G przeciwko swoistemu dla *E. multilocularis* kompleksowi antygenowemu Em2^{plus} (kombinacja Em2 oraz II/3-10) przeprowadzono za pomocą zestawu diagnostycznego opartego na klasycznej technice immunoenzymatycznej ELISA, zgodnie z zaleceniami producenta (Bordier Affinity Products, Crissier, Szwajcaria).

WYNIKI I DYSKUSJA

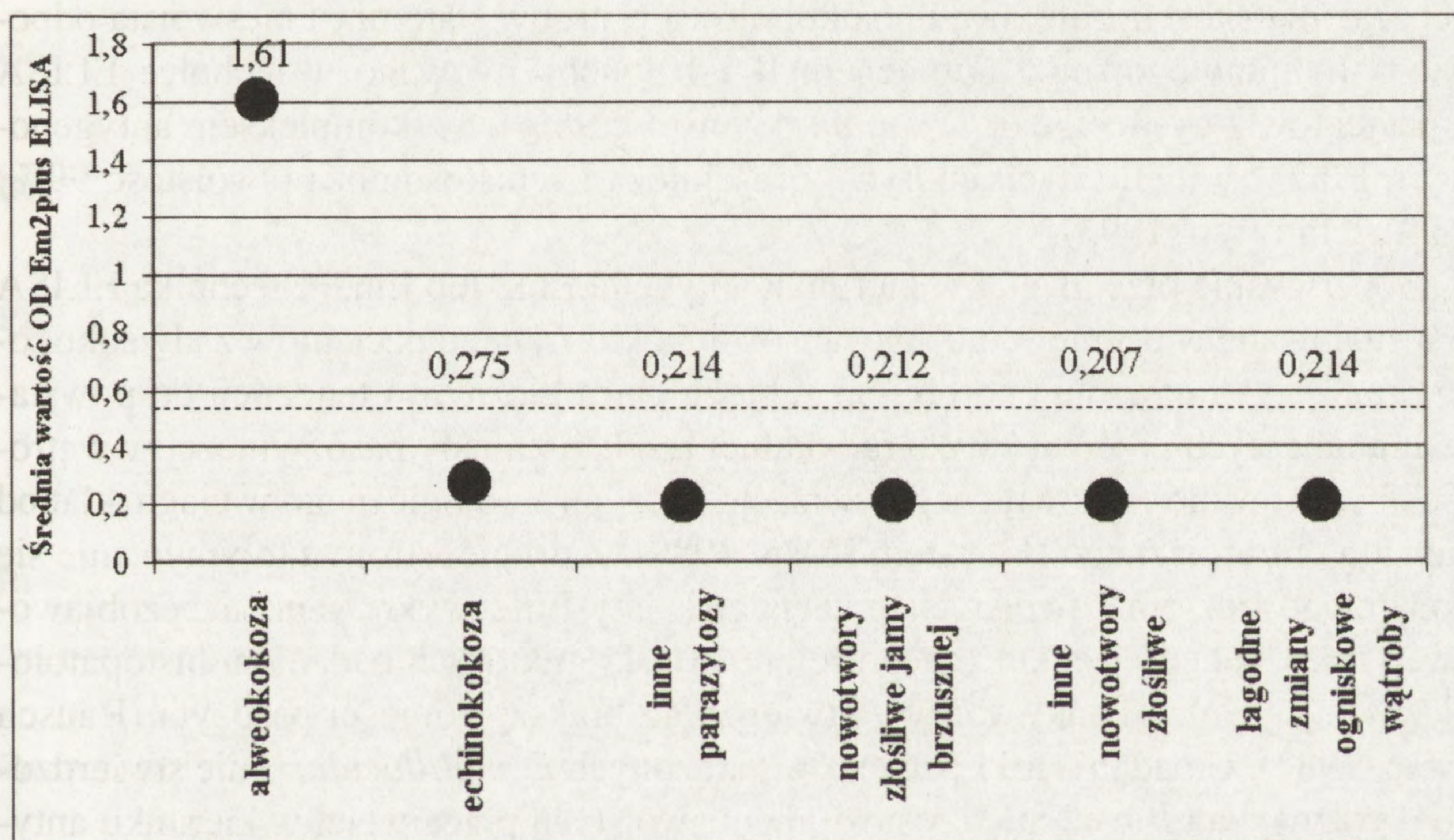
Średni poziom swoistych przeciwciał anti-Em2^{plus} *E. multilocularis* dla kontrolnej surowicy dodatniej dołączonej do zestawu osiągał $1,778 \pm 0,136$, natomiast średnia wartość gęstości optycznej dla surowicy ujemnej wynosiła $0,181 \pm 0,003$. Wartość odcięcia testu (cut-off) pochodząca z 4 pomiarów kontrolnej surowicy granicznej dostarczonej przez producenta wynosiła $0,486 \pm 0,033$.

Poziom swoistych przeciwciał w kierunku kompleksu antygenowego Em2^{plus}



Rys. 1. Wartości swoistych przeciwciał IgG anti-Em2^{plus} *E. multilocularis* u 11 pacjentów z potwierdzoną alweokokoza wątroby. Linia pozioma wskazuje średnią wartość gęstości optycznej (OD)

ELISA był dodatni u wszystkich 11 pacjentów z potwierdzoną inwazją *E. multilocularis* i wahał się od 0,508 do 3,064 (średnia 1,610 (0,802) (Rys. 1). Spośród 25 surowic pochodzących od pacjentów z bąblowicą jednojamową uzyskano jeden wynik fałszywie dodatni (OD = 0,538) oraz jeden wynik graniczny (OD = 0,483), a zakres pomiarów gęstości optycznej wynosił 0,199 – 0,538 (średnia 0,275 ± 0,080). Częstość występowania niespecyficznych reakcji krzyżowych wśród chorych z inwazją *E. granulosus* wynosiła 8%. Nie wykazano natomiast wyników fałszywie dodatnich z surowicami pacjentów zarażonych *T. saginata* i *S. mansoni* (0,182 – 0,242, średnia 0,203 ± 0,029). U 42 pacjentów z łagodnymi zmianami ogniskowymi wątroby o etiologii nienowotworowej i nieparazytnej, wszystkie uzyskane wyniki w kierunku antygenu Em2^{plus} były ujemne i wynosiły 0,181 – 0,339 (średnia 0,214 ± 0,029). Spośród 42 pacjentów z nowotworami złośliwymi wątroby i przewodu pokarmowego stwierdzono jeden graniczny poziom przeciwciał u chorego z rakiem okrężnicy i odbytnicy oraz odległymi ogniskami przerzutowymi do wątroby, mogącymi imitować inwazję *E. multilocularis* (OD = 0,481). Zakres wartości OD w tej grupie chorych z chorobami rozrostowymi w obrębie jamy brzusznej był przeważnie niski i wahał się od 0,172 do 0,481 (średnio 0,212 ± 0,053). U żadnego z innych 34 chorych z nowotworami złośliwymi o lokalizacji pozawątrobowej nie stwierdzono obecności przeciwciał w kierunku *E. multilocularis* (0,174-0,335, średnia 0,207 ± 0,029). Średnie wartości gęstości optycznej pomiaru przeciwciał w za-



Rys. 2. Średnie wartości gęstości optycznej (OD) testu Em2^{plus} ELISA w badanych grupach pacjentów. Linia przerywana wskazuje wartość odcięcia testu (cut-off)

stosowanym teście Em2^{plus} ELISA w badanych grupach pacjentów przedstawiono na Rys. 2.

Łącznie, wśród 111 surowic pochodzących od pacjentów niezarażonych *E. multilocularis* uzyskano 3 wyniki nieujemne. Swoistość diagnostyczna zastosowanego testu Em2^{plus} ELISA była wysoka i wynosiła 97,3% dla wszystkich badanych przypadków oraz 92,0% dla pacjentów z bąblowicą jednojamową *E. granulosus*. Natomiast czułość diagnostyczna testu ELISA w badanym materiale wynosiła 100%. Wynika stąd konieczność przeprowadzania bardziej precyzyjnej oceny profilu immunologicznego swoistych przeciwciał przeciwbąblowcowych techniką Western blot dla weryfikacji wyników uzyskanych testem klasycznym i ostatecznego rozpoznania gatunku bąblowca (Ito i wsp. 2003). Alweokokoza i bąblowica jednojamowa różnią się bowiem istotnie w wyborze skutecznego postępowania terapeutycznego i ustalaniu rokowania klinicznego (Pawłowski i wsp. 2001). Stosunkowo niewielkie ryzyko krzyżowej odpowiedzi immunologicznej w kierunku kompleksu antygenowego Em2^{plus} *E. multilocularis* u pacjentów z nowotworami złośliwymi o różnej lokalizacji sprawia, że metoda ta może być z powodzeniem stosowana w diagnostyce różnicowej zmian ogniskowych w wątrobie jako rutynowy test przesiewowy.

W literaturze istnieją już doniesienia o braku reakcji fałszywie dodatnich z antygenem Em2 *E. multilocularis* u pacjentów z innymi zarażeniami pasożytniczymi, nowotworami wątroby, szpiczakiem mnogim, chorobami układowymi tkanki łącz-

nej oraz marskością żółciową i poalkoholową wątroby. Natomiast nieswoistą odpowiedź immunologiczną z antygenem II/3-10 zaobserwowano w technice ELISA u pacjentów z cysticerkozą *T. solium* (swoistość 98%), a z kompleksem antygenowym Em2^{plus} u nielicznych chorych z fascjolozą i schistosomozą (swoistość 99%) (Gottstein i wsp. 1993).

Wykrywanie przeciwciał w kierunku antygeny Em2 lub Em2^{plus} techniką ELISA jest stosowane w ocenie stanu zaawansowania klinicznego pacjentów z alweokokozą oraz ryzyka nawrotu choroby po zabiegu chirurgicznym i tendencji do powstawania odległych przerzutów. Po radykalnej resekcji zmiany pasożytniczej w wątrobie obserwowano całkowitą negatywizację odczynu serologicznego w ciągu 4 lat od zabiegu chirurgicznego (Gottstein i wsp. 1989). Z drugiej strony utrzymywanie się dodatniego poziomu swoistych przeciwciał anty-Em2 wykrywano u bezobjawowych mieszkańców endemicznego rejonu Alaski, u których badaniem histopatologicznym wycinka tkanki wątroby stwierdzano brak żywotności pasożyta (Rausch i wsp. 1987). U badanych 11 pacjentów zarażonych *E. multilocularis* nie stwierdzono wyraźnej zależności między poziomem swoistych przeciwciał w kierunku antygeny Em2^{plus}, a stopniem zaawansowania rozwoju postaci larwalnej pasożyta.

WNIOSKI

(1) Oznaczanie swoistych przeciwciał surowicznych w kierunku swoistego antygeny Em2^{plus} *E. multilocularis* powinno być każdorazowo zalecane w przypadku wykrycia w badaniach obrazowych jamy brzusznej nieregularnej zmiany ogniskowej w wątrobie, sugerującej proces nowotworowy.

(2) Niewielkie ryzyko wyników fałszywie dodatnich z antygenem Em2^{plus} ELISA u pacjentów z pierwotnymi i przerzutowymi nowotworami złośliwymi wątroby, decyduje o praktycznej wartości diagnostycznej tego testu i jego zastosowaniu w diagnostyce różnicowej chorób pasożytniczych i rozrostowych wątroby.

LITERATURA

- Bresson-Hadni S., Laplante J.J., Lenys D., Rohmer P., Gottstein B., Jacquier P., Mercet P., Meyer J.P., Miguet J.P., Vuitton D.A. 1994. Seroepidemiologic screening of *Echinococcus multilocularis* infection in a European area endemic for alveolar echinococcosis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 51: 837-846.
- Craig P.S., Giraudoux P., Shi D., Bartholomot B., Barnish G., Delattre P., Quere J.P., Harraga S., Bao G., Wang Y., Lu F., Ito A., Vuitton D.A. 2000. An epidemiological and ecological study of human alveolar echinococcosis transmission in south Gansu, China. *Acta Tropica* 2: 167-177.
- Gottstein B., Jacquier P., Bresson-Hadni S., Eckert J. 1993. Improved primary immunodiagnosis of alveolar echinococcosis in humans by an enzyme-linked immunosorbent assay using the Em2^{plus} antigen. *Journal of Clinical Microbiology* 31: 373-376.
- Gottstein B., Saucy F., Deplazes P., Reichen J., Demierre G., Busato A., Zuercher C., Pugin P. 2001. Is high prevalence of *Echinococcus multilocularis* in wild and domestic animals associated with

- disease incidence in humans? *Emerging Infectious Diseases* 7: 408-412.
- Gottstein B., Tschudi K., Eckert J., Ammann R. 1989. Em2-ELISA for the follow-up of alveolar echinococcosis after complete surgical resection of liver lesions. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 83: 389-393.
- Ito A., Sako Y., Yamasaki H., Mamuti W., Nakaya K., Nakao M., Ishikawa Y. 2003. Development of Em18-immunoblot and Em18-ELISA for specific diagnosis of alveolar echinococcosis. *Acta Tropica* 85: 173-182.
- 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 Organization for Animal Health and World Health Organization, Paris: 20-71.
- Rausch R.L., Wilson J.F., Schantz P.M., McMahon B.J. 1987. Spontaneous death of *Echinococcus multilocularis*: cases diagnosed serologically (by Em2 ELISA) and clinical significance. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 36: 576-585.

Zaakceptowano do druku 14 czerwca 2004