

Katarzyna Pancer, Marek Tomasz Szkoda, Włodzimierz Gut

ZAWLECZENIA ZAKAŻEŃ WIRUSEM DENGA W POLSCE I ICH ROZPOZNANIE

Zakład Wirusologii Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego
– Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie

STRESZCZENIE

Zakażenia wirusem denga przenoszone są przez komary: w krajach tropikalnych wektorem jest najczęściej *Aedes aegypti*, w krajach chłodniejszych - *Aedes albopictus*. Począwszy od 2010r. rodzime zakażenia wirusem denga wykrywane są także w Europie. Wyróżnia się 4 serotypy DENV, ale nie stwierdzono zależności między postacią choroby a typem wirusa. Jednak kolejne zakażenie innym typem DENV niż pierwotne może prowadzić do ciężkiego, zagrażającego życiu, zachorowania. Szacuje się, że zakażeniu wirusem denga ulega rocznie ok. 100 milionów osób, z tego u około połowy (głównie dzieci) rozwijają się objawy gorączki denga (GF), postaci krwotocznej (DHF) lub postaci septycznej (DSS). Śmiertelność w ciężkich postaciach dengi jest wysoka. Warunkiem koniecznym do wystąpienia ciężkiej postaci choroby jest obecność przeciwciał klasy IgG skierowanych przeciwko antygenom określonego serotypu wirusa denga, związanych z uprzednim zachorowaniem wywołanym innym serotypem; lub przekazanych dziecku przez zakażoną matkę. Prawidłowo przeprowadzona diagnostyka wymaga zastosowania różnych metod diagnostycznych. W obrębie *Flaviviridae* obserwuje się krzyżowe reakcje, które mogą prowadzić do uzyskania fałszywie dodatniego wyniku badania. Stosowanie diagnostyki różnicującej z zakażeniami innymi flawiwirusami jest szczególnie ważne na terenie Polski, rejonie endemicznego występowania zakażeń wirusem kleszczowego zapalenia mózgu, z uwzględnieniem historii dotychczasowych szczepień pacjenta przeciw KZM lub żółtej gorączce.

Słowa kluczowe: zakażenia wirusem denga, zawleczenia wirusa denga do Polski, rozpoznanie zakażeń

WSTĘP

Kilka miliardów ludzi stale zamieszkuje rejony występowania zakażeń wirusami denga (DENV). Głównym wektorem przenoszącym zakażenia wirusa denga na ludzi jest komar *Aedes aegypti*, bytujący w tropikach i na obszarach subtropikalnych, rzadziej inne komary z rodzaju *Aedes*. Głównym rezerwuarem wirusa są zakażeni ludzie, którzy mogą stanowić rezerwuara zarazki przez 4-5 dni, maksymalnie do 12 dni od wystąpienia pierwszych objawów klinicznych, ale także 2 dni przed wystąpieniem pierwszych objawów. W tym okresie może dojść do transmisji wirusa na żerującego komara. W organizmie komara okres wylęgania wirusa trwa 4-10 dni, ale zakażone komary są zdolne do przenoszenia zakażenia przez resztę swojego życia [1,2].

Komarem, który może być także wektorem wirusów denga jest *Aedes albopictus*, pierwotnie występujący w Azji, który obecnie rozprzestrzenił się także w Ameryce Północnej i Europie dzięki zdolnościom adaptacyjnym do chłodniejszych warunków środowiska. Zasiedlanie przez *Ae. albopictus* nowych terenów może prowadzić do introdukcji wirusów denga na nowe obszary zmieniając tym samym sytuację epidemiczną gorączki denga w Europie. Aktualnie komar ten występuje na Maderze, na której w 2012 roku zaobserwowano zachorowania wywołane wirusem denga u ludzi. Ponadto komar *Ae. albopictus* zasiedlił obszary nad Morzem Śródziemnym i Czarnym [3,4] - tereny turystycznie atrakcyjne dla osób podróżujących z Polski.

Celem pracy było przedstawienie zagadnień związanych z rozpoznaniem importowanych zakażeń wirusami denga oraz ocena ryzyka zawleczenia tych zakażeń do Polski.

SYTUACJA EPIDEMIOLOGICZNA ZAKAŻEŃ WIRUSEM DENGA NA ŚWIECIE I W POLSCE

Zakażenia wirusem denga występują w ponad 100 krajach świata, od regionu Azji Południowo-Wschodniej poprzez kraje Bliskiego Wschodu, Afrykę, Amerykę Środkową i Południową po kraje zachodniego Pacyfiku. WHO szacuje, że zasięg występowania zakażeń tym wirusem obejmuje około połowy populacji ludzkiej. Od 50 lat obserwuje się znaczny i stały wzrost liczby zgłaszanych do WHO przypadków. Ogółem w 2010 roku zgłoszono ok. 2,3 mln zachorowań, tym samym stwierdzono 1,7-krotny wzrost w stosunku do danych z 2008r. i ta tendencja nadal się utrzymuje (ryc.1). W latach 50 XX wieku ogniska zachorowań obserwowano głównie na Filipinach, w latach 70 XX wieku przypadki gorączki denga o cięższym przebiegu zgłaszano w 9 krajach, a począwszy od lat 80 XX wieku obserwowano liczne ogniska zachorowań na Karaibach, w Ameryce Południowej oraz w Azji. W USA rodzime zakażenia wirusem denga zaczęto zgłaszać dopiero w XXI wieku. Obecnie najwięcej zakażeń zgłaszane jest w krajach obu Ameryk (<50%) oraz Zachodniego Pacyfiku (ryc.2) (1,4-8).

W Europie do 1928 r. zakażenia wirusem denga obserwowano na Bałkanach oraz w krajach śródziemnomorskich. W latach późniejszych notowano jedynie importowane przypadki zachorowań, aż do 2010r., gdy doszło do lokalnych transmisji zakażenia w Chorwacji oraz w południowej Francji (4,9). Wektorem zakażenia był *Aedes albopictus*, który dobrze znosi chłodniejszy niż tropikalny lub subtropikalny klimat oraz hibernację. W październiku 2012r. opisano ognisko zakażeń wirusem denga na Maderze. Łącznie od 26 września 2012 do 4 lutego 2013r. zgłoszono tam ponad 2 tys. przypadków u ludzi. Ponadto zgłoszono 78 przypadków importowanych do krajów europejskich, w tym: do Anglii – ogółem 23, Niemiec- 19, Francji – 3, Szwecji – 5, Finlandii – 7, Danii – 2, Austrii – 2, Norwegii – 2, oraz po jednym do Chorwacji, Słowenii, Hiszpanii, Szwajcarii (3,4).

Narastający ruch osobowy pomiędzy krajami na wszystkich kontynentach wiąże się z możliwością zawleczenia zakażenia. Liczba importowanych do krajów europejskich, w tym prawdopodobnie także do Polski, zachorowań wywołanych przez wirusa denga stale rośnie. Zachorowania wywołane zakażeniem podczas pobytu na terenie endemicznego występowania wirusa denga mogą wystąpić podczas pobytu za granicą, jak również po powrocie do kraju. Część tych zachorowań może pozostać nierozpoznana, a tylko cięższe przypadki są diagnozowane i potwierdzane laboratoryjnie. W Anglii, Walii i Irlandii Płn. w la-

tach 2009-2012 potwierdzono laboratoryjnie ogółem 1 234 zachorowania: w 2009 r. – 177; w 2010r. – 449, w 2011 r. – 235; w 2012 r. – 373 (w tym 20 nabytych na Maderze). W okresie I-IV. 2013 r. zgłoszono 141 przypadki, w tym 3 nabyte podczas pobytu na Maderze (10). Niestety w niektórych krajach europejskich, m.in. w Portugalii, zachorowania wywołane przez wirusy denga nie podlegają obowiązkowi zgłaszania, dlatego dane epidemiologiczne są niekompletne.

Na tym tle analiza zgłaszanych co roku w Polsce zachorowań wywołanych przez wirusa denga wskazuje na prawdopodobne niedoszacowanie. Ogółem w Polsce w latach 2005-2013 zgłoszono 29 zachorowań, w tym w 2010 r.- 6, 2011r. – 5 i w 2012 r.-5, a w 2013 – 0. Spośród 22 pacjentów z rozpoznaniem zakażenia wirusem denga hospitalizowanych w Szpitalu Zakaźnym w Warszawie w okresie 2002-2011 większość stanowiły osoby podróżujące do Indii oraz Indochin (Wietnam, Laos, Tajlandia) (11).

OBJAWY ZAKAŻENIA WIRUSEM DENGA (1,2,12)

Wyróżnia się trzy podstawowe postacie zakażenia wirusem denga:

1. Zakażenie bezobjawowe lub skąpoobjawowe, klinicznie przypominające przeziębienie
2. Gorączka denga (DF)
3. Ciężka postać dengi (DS) obejmująca zarówno postać krwotoczną denga (DHF) oraz postać wstrząsową (DSS)

Gorączka denga (DF) jest to ostra choroba wysypkowa z wysoką gorączką (40°C) trwającą 2-7 dni, obejmująca 2 lub więcej spośród następujących objawów klinicznych: silne bóle głowy, ból oczu, bóle mięśni i stawów, wysypka, nudności, wymioty, powiększenie węzłów chłonnych lub leukopenia. Gorączkę denga najczęściej rozpoznaje się u niemowląt, małych dzieci i dorosłych. U dzieci może być przyczyną zgonu.

Ciężka postać zakażenia wirusem denga (DS), określana dawniej jako gorączka krwotoczna denga (DHF), jest potencjalnie śmiertelną chorobą z powodu utraty płynów, niewydolności nerek oraz niewydolności oddechowej z towarzyszącymi objawami krwotocznymi i uogólnionej niewydolności narządowej. Odpowiednio wczesne rozpoznanie i wprowadzone leczenie może zmniejszyć ryzyko zgonu z 20% do 1%.

Warunkiem koniecznym do wystąpienia ciężkiej postaci zakażenia (w tym gorączki krwotocznej) jest obecność przeciwciał klasy IgG skierowanych przeciwko antygenom określonego serotypu wirusa związanym z:

1. uprzednim zakażeniem pacjenta wywołanym przez wirusa należącego do innego serotypu (bez względu na postać pierwotnego/wcześniejszego zakażenia)

2. uprzednim zakażeniem kobiety w ciąży lub matki karmiącej - w przypadku niemowląt obecność matczynej swoistej IgG modyfikuje pierwotne zakażenie dziecka do ciężkiej postaci.

Inne czynniki wpływające na ciężkość przebiegu zakażenia wirusami denga to status immunologiczny zakażonego, związany zarówno z wiekiem (słabsza odpowiedź u osobników bardzo młodych i u osób starszych), jak i występowaniem innych przewlekłych chorób (2,13).

Nie stwierdzono wpływu serotypu wirusa denga (1-4) na ciężkość zakażeń.

Liczba zgłaszanych przypadków dotyczy przede wszystkim zakażeń objawowych. Wysoka śmiertelność w zakażeniach wirusem denga dotyczy przede wszystkim osób z objawami krwotocznej gorączki lub postaci wstrząsowej. Ponadto wyższą śmiertelność obserwuje się na początku wystąpienia ogniska epidemicznego. Szacuje się, że w 2007r. doszło do ok. 100 mln zakażeń wirusem denga, z tego ok. 500 tys., zostało zdiagnozowanych i zgłoszonych, a 12,5 tys. chorych zmarło (1,4). Natomiast w okresie I-IV.2014 r. w krajach obu Ameryk zgłoszono ponad 272 tys. przypadków gorączki denga i 2708 zachorowań z objawami ciężkiej postaci, w tym 87 zgonów (7).

Ze względu na wpływ swoistej IgG na ciężkość zakażenia nie stosuje się czynnej immunoprofilaktyki. Dodatkowym problemem jest brak swoistego leczenia, w przypadkach ciężkich zachorowań stosuje się terapię objawową.

DIAGNOSTYKA ZAKAŻEŃ WIRUSEM DENGA

Podstawowym kryterium sugerującym lekarzowi w Polsce zakażenie wirusem denga jest pobyt chorego w rejonie występowania zakażeń tym patogenem. Diagnostyka zakażeń wirusami denga prowadzona jest tylko w przypadkach objawowych czyli gorączki denga lub ciężkiej postaci choroby, w tym gorączki krwotocznej (1).

Diagnostyka różnicowa tych zakażeń, oparta o badanie przedmiotowe i podmiotowe wsparta mikrobiologiczną i serologiczną diagnostyką, pozwala na prawidłowe różnicowanie z zakażeniami wywołanymi przez inne wirusy. Gorączki krwotoczne mogą bowiem być wywoływane także przez RNA wirusy należące do rodzin: *Arenaviridae*, *Bunyaviridae*, *Filoviridae*.

Odrębny problem stanowi różnicowanie zakażeń w obrębie spokrewnionych ze sobą genetycznie i antygenowo flawiwirusów. Wirusy denga, żółtej gorączki oraz kleszczowego zapalenia mózgu należą do licznej, obejmującej 53 gatunki rodziny *Flaviviridae*. Objawy zakażenia tymi wirusami zależą od wzajemnych

interakcji pomiędzy drobnoustrojem i gospodarzem i mogą obejmować postacie od łagodnych stanów gorączkowych z dołączającą się niekiedy wysypką, poprzez uszkodzenie narządów wewnętrznych i uogólnione zmiany immunopatologiczne objawiające się począwszy od zaburzenia krzepnięcia - aż do zakażenia ośrodkowego układu nerwowego (13). Laboratoryjne potwierdzenie zakażenia uzależnione jest od wielu czynników, jednym z najważniejszych jest wstępne rozpoznanie kliniczne, wsparte danymi epidemiologicznymi, które pozwalają właściwie ukierunkować diagnostykę laboratoryjną (1,2,4,14).

Diagnostyka laboratoryjna zakażeń wirusem denga obejmuje (ryc.3):

1. badania wirusologiczne (badania molekularne, izolacja wirusa*),
2. badania serologiczne (wykrywanie IgM, IgG),
3. wykrywanie antygeny wirusa.

*- izolacja wirusa denga w Polsce i w wielu krajach europejskich jest możliwa jedynie w laboratorium o podwyższonym poziomie bezpieczeństwa (BSL3/4).

Na wybór metody oraz wynik badania laboratoryjnego mają wpływ:

1. czas jaki upłynął od zakażenia do chwili pobrania materiału do badań,
2. rodzaj pobranego do badań materiału,
3. sposób jego przechowywania, warunki transportu,
4. metody diagnostyczne możliwe do wykonania w danym laboratorium.

Potwierdzenie obecności genomu wirusa możliwe jest przy użyciu techniki PCR z etapem odwrotnej transkrypcji (RT-PCR). Materiałem do badań mogą być próbki surowicy, osocza, płynu mózgowo-rdzeniowego lub tkanki pobranej w trakcie fazy ostrej choroby z gorączką. Rozpoznanie zakażenia DENV metodą PCR jest możliwe w ciągu pierwszych 5 dni od wystąpienia objawów.

Ponieważ wykrycie RNA wirusa jest możliwe jedynie w pierwszych dniach zakażenia (gdy pacjent najczęściej przebywa za granicą), większość rozpoznanych przypadków importowanych oparto o wyniki badań serologicznych. Odpowiedź immunologiczna na zakażenie wirusem denga prowadzi do powstania swoistych przeciwciał IgM i IgG skierowanych głównie przeciw białkom osłonki wirusa. Charakter odpowiedzi immunologicznej zależy od tego, czy dana osoba przechodzi zakażenie DENV po raz pierwszy czy po raz kolejny w swoim życiu oraz czy jest to zakażenie tym samym czy też innym typem serologicznym wirusa. Ze względu na podobieństwo antygenowe flawiwirusów ogromny wpływ na wyniki badań diagnostycznych ma historia przebytych zakażeń lub szczepień przeciw flawiwirusom, w tym przeciwko kleszczowemu zapaleniu mózgu oraz żółtej gorączce.

Pierwotne zakażenie DENV charakteryzuje się powolnym narastaniem mian przeciwciał IgM i IgG. Przeciwciała IgG wykrywane są w niskim mianie na koniec pierwszego tygodnia choroby i miano tych przeciwciał powoli wzrasta. Natomiast podczas wtórnego zakażenia, miano przeciwciał IgG rośnie bardzo szybko i nasilone są reakcje krzyżowe z antygenami innych flawiwirusów. Kinetyka przeciwciał IgM jest bardziej zmienna. Stwierdzany poziom IgM jest znacznie niższy podczas wtórnego zakażenia DENV, a tym samym w niektórych przypadkach kolejnych zakażeń obserwowane są ujemne wyniki oznaczeń poziomu swoistych IgM (ryc.3).

W zakażeniu pierwotnym, jak i wtórnym wskazane jest badanie pary surowic pobranych w różnych etapach zachorowania. Niestety w praktyce badanie par surowic z wczesnego okresu choroby wraz z surowicą pobraną od ozdowieńca lub też śledzenie dynamiki zmian miana przeciwciał w klasach IgG i IgM jest praktycznie niemożliwe.

Należy także zwrócić uwagę, na występujące krzyżowe reakcje w surowicach chorych zakażonych innymi flawiwirusami. Ponieważ w Polsce endemicznie występuje wirus kleszczowego zapalenia mózgu i dostępne są szczepienia przeciw KZM, więc zjawisko krzyżowych reakcji stanowi podstawowy problem diagnostyczny. Ponadto od wielu lat stosowane są, szczególnie u osób podróżujących, szczepienia przeciwko żółtej gorączce. Rozróżnienie przeciwciał homologicznych (swoistych dla wirusa denga) i heterologicznych czyli reagujących krzyżowo z innymi flawiwirusami, wymaga zastosowania metod opartych o neutralizację wirusa (test neutralizacji, test redukcji łyśinek) przeprowadzanego w warunkach podwyższonego bezpieczeństwa biologicznego (laboratorium BSL3/4) (1,2,4,14).

Testy do poszukiwania antygeny osłonki wirusa lub białka NS1 wirusa denga mają zastosowanie głównie w fazie ostrej pierwotnego zakażenia (do 9 dnia od wystąpienia objawów), ponieważ podczas zakażenia

wtórnego występują już immunokompleksy wirus-IgG w surowicy pacjenta. Ponadto testy te nie pozwalają na różnicowanie typu wirusa. Obecnie wprowadzane komercyjnie zestawy do wykrywania białka NS1 (testy ELISA lub oparte o techniki histologiczne) są poddawane ocenie pod względem dokładności diagnostycznej oraz możliwości badania w przypadkach pierwotnych i wtórnych zakażeń wirusem denga (1,14).

Klasyfikacja przypadku zakażenia wywołanego przez wirusy denga. Odrębnym problemem jest interpretacja wyników oraz klasyfikacja przypadku przez lekarza prowadzącego. Ostatnio Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) zaproponowała nowe schematy klasyfikacji przypadków i postępowania diagnostycznego, które są w trakcie testowania w wybranych krajach (4). W Polsce obowiązuje klasyczna klasyfikacja ECDC z 2008 r. (tab.1) (2).

PODSUMOWANIE

Diagnostyka zakażeń wirusem denga w Polsce wymaga szczególnej uwagi ze względu na endemiczne występowanie w naszym kraju wirusa kleszczowego zapalenia mózgu (KZM). Zakażenia tym wirusem oraz stosowanie czynnej immunoprofilaktyki może spowodować uzyskanie fałszywie dodatniego wyniku w teście serologicznym (ELISA itp.) ukierunkowanym na wykrywanie przeciwciał anti-denga - w wyniku licznych krzyżowych reakcji w obrębie *Flaviviridae*.

Otrzymano: 12.05.2014 r

Zaakceptowano do publikacji: 16.10.2014 r.

Adres do korespondencji:

Katarzyna Pancer

Zakład Wirusologii NIZP-PZH

Chocimska 24, 00-791 Warszawa

e-mail: kpancer@pzh.gov.pl