

Sesja 11

Grzyby chorobotwórcze oraz grzybice ludzi i zwierząt

Miejsce leczenia ogólnego w nowoczesnej terapii dermatomikoz

The position of general treatment in the new therapy of dermatomycoses

Zygmunt Adamski

Zakład Mikologii Lekarskiej Akademii Medycznej w Poznaniu

Obecnie obserwuje się stały wzrost częstości występowania infekcji grzybiczych skóry, jej przydatków, błon śluzowych, a także oportunistycznych zakażeń uogólnionych. Wpływa na to wiele czynników, m.in. nasilanie się tzw. czynników predysponujących (genetycznych, środowiskowych i nabytych) oraz paradoksalnie rozwój medycyny, związany z coraz szerszym stosowaniem antybiotyków, leków immunosupresyjnych, z rozwojem transplantologii i intensywnej terapii, a także starzenie się społeczeństwa. Również częste rozpoznawanie infekcji grzybiczych skóry i jej przydatków czyni tę problematykę niezwykle ważną i interesującą dla środowiska medycznego i nie tylko.

Coraz częściej dermatolodzy oraz lekarze medycyny rodzinnej w terapii dermatomikoz sięgają po preparaty przeznaczone do stosowania ogólnego. Ma to szczególne znaczenie w przypadku grzybicy paznokci, grzybicy skóry owłosionej głowy oraz wszystkich zakażeń grzybiczych zajmujących duże obszary skóry, mających tendencję do nawrotów, przewlekłego przebiegu lub wykazujących oporność w terapii miejscowej.

Celem pracy jest zwrócenie uwagi na postęp jaki dokonał się w terapii mikologicznej w ostatnim pięćdziesięcioleciu oraz zainteresowanie lekarzy możliwością wprowadzania leków ogólnych do terapii zakażeń grzybiczych.

Przedstawione informacje, dotyczące cech farmakologicznych preparatów, przeciwwskazań do ich stosowania, możliwych działań niepożądanych, a także interakcji z innymi lekami stosowanymi przez chorych, mają ułatwić lekarzom podjęcie decyzji kiedy, komu i w jakiej sytuacji terapię ogólną dermatomikoz możemy zaproponować. Przedstawione schematy leczenia mają na celu wskazanie lekarzom odpowiedniego dawkowania polecanych preparatów.

Grzyby izolowane od gadów

Fungi isolated from Reptiles

M. J. Biegańska i G. Kamiński

Pracownia Mikologii, Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, SGGW, ul. Ciszewskiego 8, Warszawa

Wzrastające zainteresowanie domową hodowlą gadów sprawia, że zwierzęta te coraz częściej stają się pacjentami lecznic weterynaryjnych. Z badań przeprowadzonych wcześniej w Pracowni Mikologii Wydz. Medycyny Weterynaryjnej w Warszawie wynikało, iż u osobników wykazujących objawy kliniczne występują m.in. grzyby z rodzajów *Candida*, *Malassezia* i *Trichosporon*. Niewiele jednak wiadomo o mikroorganizmach zasiedlających skórę i błony śluzowe zdrowych zwierząt w warunkach naturalnych lub hodowlanych. Stąd też interpretacja wyników badań mikrobiologicznych materiałów pobranych od gadów jest bardzo trudna. Nie wiadomo także czy drobnoustroje kolonizujące organizmy gadów, trzymanych w domach prywatnych jako tzw. "pets", nie mogą stać się źródłem zakażenia dla ludzi i innych zwierząt domowych. Niniejsza praca ma na celu wstępne określenie rodzajów grzybów najczęściej występujących u zdrowych węży oraz ustalenie, które z nich można uznać za gatunki komensalne. Badaniami objęto grupę zdrowych osobników (samce i samice) z jednej hodowli prywatnej, należących do 2 rodzin *Boidae* (Dusicielowate) i *Pythonidae* (Pytony). Najczęściej ze skóry oraz błon śluzowych jamy ustnej i kloaki izolowano drożdże z rodzaju *Trichosporon*. Ponadto uzyskano wzrost pleśni z rodzajów *Aspergillus*, *Penicillium* i *Paecilomyces* oraz *Mucor*.

Zwierzęta jako potencjalne źródło zakażeń grzybiczych u ludzi

Animals as a potential source of human fungal infections

Bożena Dworecka-Kaszak

Pracownia Mikologii, Katedra Nauk Przedklinicznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, SGGW, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa; Tel/fax 022 5936067; E-mail: bozena.kaszak@sggw.pl

Obfitość i różnorodność występujących w przyrodzie gatunków grzybów mikroskopowych oraz ekspansywna działalność człowieka powoduje, że coraz więcej grzybów uważanych dotąd za typowe saprotrofy staje się oportunistami. Łatwość adaptacji grzybów do zmian środowiskowych, a także stosunkowo niewielkie zapotrzebowanie wzrostowe na składniki odżywcze sprawia, że w sprzyjających temu warunkach grzyby zasiedlają nowe nisze ekologiczne, takie jak np. organizm żywego gospodarza-żywiciela. Jako organizmy oportunistyczne grzyby wykazują niewielką swoistość w stosunku do gospodarza — człowieka lub zwierząt, a mechanizmy patogenezы i możliwości transmisji zakażenia zwierzę-człowiek są jeszcze ciągle mało poznane. Hipotetycznie wszystkie grzyby, które są w stanie wykształcić mechanizmy warunkujące ich termo- i tleno-tolerancje mogą być czynnikiem etiologicznym zakażeń grzybiczych egzo- i endogennych. Mało wiadomo również na temat produkowanych przez grzyby toksyn o zdefiniowanym działaniu — w większości przypadków patomechanizm zakażeń grzybiczych związany jest z immunostymulującym działaniem komponentów ściany komórkowej grzybów; bądź immunosupresyjnym, lub też immunomodulującym. Większa zapadalność na grzybicę nie zawsze jest wynikiem większej ekspansji grzybów, lecz często zwiększonej ekspozycji gospodarza na grzyby obecne w środowisku. W przypadkach dermatomikoz należy zawsze brać pod uwagę zwierzęta jako potencjalne źródło zakażeń dla człowieka, czego dobrym przykładem są zakażenia od zwierząt dawniej egzotycznych np. świnek morskich czy węży, dziś traktowanych jako tzw. „pets”. Przy systemomikozach uwzględniać należy fakt, że potencjalnie istnieje możliwość transmisji zakażeń, nawet tych pozornie endogennych, ze zwierząt na ludzi. Oddzielny problem stanowią miktotoksykozy, w których należy brać pod uwagę możliwość kumulacji miktotoksyn w spożywanych tkankach zwierzęcych.

Grzyby wodne występujące w wodach wybranych jezior augustowskich

Occurrence aquatic fungi in several augustowskie lakes

Bożena Kiziewicz

Zakład Biologii Ogólnej, Akademia Medyczna w Białymstoku; Email:bkizbiol@amb.edu.pl

Jednym z ważniejszych zagrożeń środowiska naturalnego człowieka jest zanieczyszczenie wody, gleby i powietrza różnymi związkami chemicznymi, będącymi głównie wytworem działalności człowieka, jak też czynnikami naturalnymi.

Spośród wielu kryteriów pomocnych w ustaleniu różnego rodzaju zanieczyszczeń na uwagę zasługują badania mikologiczne, gdyż według wielu autorów grzyby są dobrymi wskaźnikami biologicznymi czystości wód.

Biota grzybowa występująca w wodach powierzchniowych jest dotychczas rzadkim obiektem badań zarówno w Polsce, jak i na świecie. Dlatego też słuszne i celowe jest podejmowanie badań dotyczących tej problematyki.

Celem badań było ustalenie składu gatunkowego grzybów wodnych występujących w kilku jeziorach augustowskich. Do izolowania poszczególnych gatunków grzybów zastosowano metodę przynęt. W wodzie jezior stwierdzono występowanie 20 gatunków grzybów w tym 9 znanych jako pasożyty lub nekrotrofy ryb. Wśród wykrytych gatunków grzybów największą liczbę stanowiły grzyby należące do klasy *Peronosporomycetes*. Takie gatunki jak *Aphanomyces frigidophilus*, *Achlya flagellata*, *Dictyuchus magnusii*, *Saprolegnia subterranea* i *Pythium oedochilum* okazały się nowymi dla wód powierzchniowych Polski. Wykonane badania dostarczają nieznanymi dotychczas danych dotyczących różnorodności gatunkowej grzybów wodnych w Polsce.

Choroby grzybicze ryb

Fungal diseases of fish

Bożena Kiziewicz i Emilia Wojno

Zakład Biologii Ogólnej Akademii Medycznej, ul. Kilińskiego 1, 15-089 Białystok; E-mail: bkizbiol@amb.edu.pl

Grzyby są częstą przyczyną chorób ryb. Na podatność ryb na infekcje grzybicze wywierają wpływ m.in. cyrkulacja wody, temperatura, zawartość tlenu, materii organicznej, biogenów, zagęszczenie populacji.

Pleśnie są przyczyną strat w hodowli ryb w wylęgarniach, w gospodarstwach rybnych stawowych, jeziorowych i rzecznych. Grzyby kolonizują ikrę oraz liczne tkanki w różnych stadiach rozwojowych ryb. Grzyby osiedlają się często na skórze, płetwach, skrzelach, rzadziej w mięśniach i w wątrobie zwierząt. Pleśniawka ryb wywoływana jest przez grzyby z rodzajów: *Achlya*, *Aphanomyces*, *Dictyuchus*, *Leptomitius*, *Saprolegnia* i *Thraustotheca*. Spośród rodzaju *Saprolegnia* pleśniawkę powodują gatunki, takie jak: *S. delica*, *S. diclina*, *S. hypogyna*, *S. ferax*, *S. monoica* i *S. parasitica*.

Z grzybów z rodzaju *Achlya* na ikrze i rybach występują często *A. debaryana*, *A. dubia*, *A. flagellata*, *A. polyandra* i *A. prolifera*. *Achlya dubia* i *Achlya flagellata* opisane były jako groźne pasożyty ryb na terenie Egiptu i Indii. Znaczne straty w hodowli ryb spowodował także *Aphanomyces laevis* w Tajwanie. Gatunek ten wykrywano nie tylko na zranionych rybach, ale i na płazach wodnych. Grzyb ściekowy *Leptomitius lacteus*, gatunek występujący w wodach zanieczyszczonych, oprócz tego, że rozkłada płynną materię organiczną, jest często wykrywany na rybach. Pasożytuje on również na ikrze, narybku i dorosłych osobnikach.

Metody diagnostyki stosowane w mikologii

Diagnostic methods used in mycology

Piotr Kurnatowski i Alicja Kurnatowska

Katedra Biologii i Parazytologii Lekarskiej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi: E-mail: pkurnatowski@yahoo.com

Do niedawna w diagnostyce mikologicznej zajmowaliśmy się genotypowymi cechami grzybów (morfologiczne, biochemiczne). Ostatnio rozwijamy możliwości analizy genotypowej szczepów akseńicznych wyizolowanych z określonych płynów ustrojowych i innych materiałów. Protokoły badania obejmują kolejno: * preparaty bezpośrednie oceniane w mikroskopie świetlnym (w 0,85% NaCl, także z dodatkiem 0,1% sarafiny, lub tuszu indyjskiego), * trwale barwione różnymi metodami (np. wg Giemsy lub Wrighta, hematoksyliną i eozyną, metodami Pappenheima lub Heidenhaina — hematoksylina żelazista oraz Gomoriego w modyfikacji Grocotta — srebrzenie), * zakładanie *in vitro* hodowli makroskopowych oraz mikrodowli (podłoża Sabourauda z glukozą-SGA lub maltozą-SMA i Czapka-CzA) lub *in vivo* (zwierzęta laboratoryjne); w tych preparatach oraz w hodowlach i mikrohodowlach określa się cechy fenotypowe anamorficzne — morfologiczne, np. struktury grzybni, strzępek, zarodników oraz makrostruktur kolonii. Odrębnie opisuje się cechy fenotypowe — biochemiczne, ostatnio wykorzystując komercyjne zestawy; bada się w szczepach akseńicznych zdolność grzybów do fermentacji cukrów (zymogram) oraz przyswajania węgla lub azotu (auksanogram), a także wytwarzania enzymów hydrolitycznych. W analizie genotypów wykorzystuje się klasyczną technikę PCR, z jej licznymi odmianami, takimi jak: RT-PCR, nested PCR, multiplet PCR, RFLP-PCR, Real Time PCR, które stosowane są w laboratoriach mikologicznych głównie do badań jakościowych w wykrywaniu kandydozy, kryptokokozy, aspergilozy i fuzariozy; w zależności od wykrywanego patogenu i materiału biologicznego poddanego badaniu, czułość i specyficzność techniki PCR waha się odpowiednio w granicach od 65 do 100% i od 70 do 100%. W diagnostyce wykorzystuje się także poszukiwanie swoistych przeciwciał w surowicy lub innych płynach ustrojowych po zastosowaniu określonych antygenów grzyba, a także wykrywanie swoistych antygenów — z użyciem przeciwciał. Odrębną grupę stanowią metody oparte o wykrywanie metabolitów (D-arabinitol) grzybów.

Trzeba dodać, że pobrane do badań materiały biologiczne od pacjentów należy badać różnymi metodami natychmiast po ich uzyskaniu.

Poszukiwanie grzybów potencjalnie chorobotwórczych dla człowieka w wodach Zalewu Sulejowskiego i Jeziora Charzykowskiego

Potentially pathogenic fungi in the waters of Sulejów Reservoir and Charzykowskie Lake

Piotr Kurnatowski¹, Anna Różga¹, Anna Wójcik¹, Błażej Różga² i Piotr Babski²

¹Katedra Biologii i Genetyki Medycznej, Uniwersytet Medyczny, Pl. Gen. J. Hallera 1, 90-647 Łódź;

E-mail: pkurnatowski@wp.pl

²Katedra Termobiologii, Instytut Biofizyki, Uniwersytet Łódzki, ul. S. Banacha 12/16, 0-237 Łódź

Stacja Przyrodnicza „Suszek”

Obecność grzybów w hydrosferze wymaga zwrócenia szczególnej uwagi na gatunki patogeniczne dla człowieka oraz te, które mogą być stosowane jako wskaźniki czystości wód.

Celem pracy była ocena występowania potencjalnie chorobotwórczych grzybów w wodach Zalewu Sulejowskiego i Jeziora Charzykowskiego.

Izolowanie grzybów i oznaczanie gatunków przeprowadzano zgodnie z wcześniej opisaną procedurą opracowaną w Zakładzie Biologii i Parazytologii Lekarskiej UM w Łodzi.

Z wód Zalewu Sulejowskiego wyizolowano 28 gatunków grzybów potencjalnie chorobotwórczych dla człowieka i zwierząt, zaliczonych do *Ascomycota* (*Candida ciferrii*, *C. colliculosa*, *C. famata*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. humicola*, *C. inconspicua*, *C. kefyry*, *C. krusei*, *C. lambica*, *C. lipolytica*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *C. pelliculosa*, *C. rugosa*, *C. tropicalis*, a także *Saccharomyces cerevisiae*, *Geotrichum candidum*, *G. penicillatum*, *G. capitatum*, *Kloeckera apiculata*, *Kloeckera japonica*) i *Basidiomycota* (*Rhodotorula glutinis*, *R. rubra*, *Cryptococcus albidus*, *C. laurentii*, *Trichosporon cutaneum*, *T. pullulans*).

Natomiast z pobranych prób wody Jeziora Charzykowskiego wyizolowano 18 gatunków grzybów zaliczonych do *Ascomycota* (*Candida inconspicua*, *C. colliculosa*, *C. lusitaniae*, *C. tropicalis*, *C. pelliculosa*, *C. kefyry*, *C. glabrata*, *C. ciferrii* oraz *C. parapsilosis*; *Kloeckera apiculata*) i *Basidiomycota* (*Rhodotorula rubra*, *R. minuta* i *R. glutinis*; *Cryptococcus albidus*, *C. neoformans*, *C. laurentii* i *C. terreus*; *Trichosporon cutaneum*).

Zbadane wody mogą być właściwym środowiskiem rozwoju postaci anamorficznych grzybów potencjalnie chorobotwórczych, związanych z workowcami (*Ascomycota*) lub z podstawczakami (*Basidiomycota*), wytwarzających się także w ustroju człowieka i innych ssaków.

Praca finansowana w ramach projektów badawczych Nr 2 P04G 04927 i 6P04G 03318.

Saprotroficzne grzyby glebowe w bioregulacji pasożytniczych geohelmintów

Saprotrophic soil fungi in bioregulation of parasitic geohelminths

W. Kuźna-Grygiel¹, M. Jaborowska¹, K. Mazurkiewicz-Zapałowicz²
i L. Kołodziejczyk¹

¹Katedra i Zakład Biologii i Parazytologii Medycznej, Pomorska Akademia Medyczna w Szczecinie;
E-mail: kuzgryg@sci.pam.szczecin.pl

²Zakład Hydrobiologii, Akademia Rolnicza w Szczecinie

Celem pracy było porównanie antagonistycznego oddziaływania wybranych gatunków grzybów pleśniowych na rozwój embrionalny dwóch gatunków geohelmintów: *Ascaris suum* i *Toxocara canis*. Doświadczenie przeprowadzono z 5 gatunkami grzybów: *Paecilomyces fumosoroseus*, *Metarhizium anisopliae*, *Trichothecium roseum*, *Fusarium culmorum* i *Trichoderma viride*, z którymi inkubowano jaja nicieni w ciągu 60 dni, w temp. 26°C. Zapłodnione jaja pozyskiwano z końcowych odcinków macic *A.suum* i *T.canis*. Gatunki badanych grzybów zostały wcześniej wyizolowane z gleby i pasażowane na podłożu standardowym Czapek — Dox Agar w temperaturze 26°C.

Wyniki. Obecność grzybów w hodowli jaj znacznie wydłużały embriogenezę *A. suum* i *T. canis*, przy czym znacznie istotniejsze spowolnienie rozwoju odnotowano w jajach *T. canis* w porównaniu z *A. suum*. W obserwacjach mikroskopowych, stwierdzono wysoki odsetek zaburzeń morfologicznych rozwijających się zarodków *Ascaris suum* i *Toxocara canis* w obecności każdego z badanych gatunków grzybów. Deformacje zarodków odnotowano w okresie bruzdkowania, gastrulacji i kształtowania się larw. Generalnie wyższy odsetek uszkodzonych zarodków i martwych larw pod wpływem grzybów stwierdzono w hodowlach jaj *T. canis*.

Wniosek. Antagonistyczne oddziaływanie grzybów pleśniowych na jaja geohelmintów zależy od gatunku grzyba, jak i od gatunku nicienia.

Leczenie miejscowe grzybic

Local treatment of fungal infections

Romuald Maleszka i Violetta Ratajczak-Stefańska

Katedra i Klinika Chorób Skórnych i Wenerycznych Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie

Grzyby chorobotwórcze pasożytujące na skórze i jej przydatkach oraz na błonach śluzowych powodują odczyn zapalny, którego nasilenie zależy zarówno od układu odpornościowego żywiciela, jak i właściwości zakażającego grzyba. Zakażenia te wywoływane są głównie przez dermatofity i drożdże, a niekiedy także przez grzyby pleśniowe. Głównym kryterium upoważniającym do rozpoznania grzybic i rozpoczęcia terapii jest wyizolowanie i identyfikacja grzyba od pacjenta, który ma być leczony. Obecnie stosowane środki przeciwgrzybicze stanowią olbrzymią grupę różnorodnych leków, na którą składają się zarówno preparaty wprowadzone do leczenia w ostatnich latach, jak i szereg starszych leków, które nadal są zalecane przez lekarzy, często jako uzupełnienie podstawowej terapii. Obserwowany wzrost rozpoznawanych grzybic wymaga poszukiwania coraz skuteczniejszych i mniej uciążliwych dla chorego metod ich miejscowego leczenia.

Cel pracy: Przedstawiono ogólne zasady, jakimi należy się kierować przy podejmowaniu miejscowego leczenia grzybicy oraz główne czynniki decydujące o jego skuteczności.

Materiał i metody: Omówienie mechanizmów działania najczęściej stosowanych współczesnych leków przeciwgrzybiczych oraz praktyczne ich zastosowanie w leczeniu miejscowym wybranych zakażeń grzybiczych.

Wyniki: Na podstawie dostępnego piśmiennictwa i własnych obserwacji przedstawiono propozycje skutecznego miejscowego leczenia występujących w naszym klimacie powierzchniowych zakażeń grzybiczych. Za jedną z głównych przyczyn niepowodzeń w miejscowym leczeniu grzybicy uznano stan kliniczny chorych. Duży wpływ na wyniki leczenia ma też znaczna aktywność enzymatyczna grzybów, z czym wiąże się duża możliwość adaptacyjna do warunków środowiskowych ich bytowania, zmieniających się również pod wpływem miejscowo stosowanych leków. Inną ważną przyczyną wpływającą na końcowy wynik leczenia jest także brak odpowiedniej dezynfekcji rzeczy noszonych przez chorego.

Wnioski: (1) Współczesna miejscowa terapia przeciwgrzybicza powinna być poprzedzona właściwym rozpoznaniem klinicznym, które jest możliwe jedynie na podstawie prawidłowej diagnostyki laboratoryjnej. (2) Na wyniki miejscowego leczenia przeciwgrzybiczego, oprócz rodzaju zaleconego leku i staranności jego stosowania, wyraźny wpływ ma również stan kliniczny chorego i właściwości zakażającego grzyba.

Hodowla *Pneumocystis carinii* *in vitro*

In vitro cultivation of *Pneumocystis carinii*

Alicja Sobolewska i Tadeusz H. Dzbeński

Państwowy Zakład Higieny, Zakład Parazytologii Lekarskiej, ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa; E-mail: asobolewska@pzh.gov.pl

Pneumocystis carinii (*jirovecii*) jest patogenem powodującym pneumocystozowe zapalenie płuc (PCP), głównie wśród osób z obniżoną odpornością, w tym u pacjentów z AIDS, wrodzonymi niedoborami odporności, oraz u osób poddanych leczeniu środkami immunosupresyjnymi. Diagnostyka PCP polega obecnie na badaniu próbek materiału pobranego z dróg oddechowych w kierunku *Pneumocystis* lub jego DNA, ponieważ nie opracowano wydajnej metody hodowli tego organizmu *in vitro*. Brak możliwości hodowania *Pneumocystis in vitro*, oprócz implikacji diagnostycznych, wpływa również hamująco na rozwój badań dotyczących szerzenia się tego organizmu, jego cyklu rozwojowego, właściwości biochemicznych i immunologii zakażeń.

Obecne badania zostały podjęte w celu opracowania własnej modyfikacji metody hodowli aksenicznej *Pneumocystis carinii*, opisaną w 1999 roku przez Merali i wsp. *Pneumocystis* niezbędny do zapoczątkowania hodowli izolowano z tkanek płucnych szczurów poddanych immunosupresji, a następnie posiewano na bezkomórkowe podłoże wzrostowe w płytkach z membranami kolagenowymi, które pozwalały na częstą wymianę podłoża bez naruszania wzrostu przylegających organizmów. Podłoże wzrostowe składało się z podłoża MEM z solami Earle'a i było wzbogacone m.in. S-adenozyl-L-metioniną, putrescyną, pirofosforanem żelazowym i surowicą końską. Pasaże wykonywano co 7 dni. Wzrost sprawdzano poprzez liczenie cyst w preparatach barwionych metodą Diff-Quik oraz za pomocą metody Real-Time PCR przy zastosowaniu Sybr Green.

Stwierdzono wzrost liczby *Pneumocystis* w hodowlach uzależniony od wielkości inokulum. Stosując inokulum rzędu $1,0 \times 10^5$ - $5,2 \times 10^5$ cyst na hodowlę uzyskano 175-krotny wzrost liczby organizmów po 7 dniach hodowli. Rzeczywisty wzrost pasożyta mierzony metodą Real-Time PCR był 286 razy większy od wielkości wprowadzonego inokulum i wahał się od $4,8 \times 10^8$ do $5,0 \times 10^9$ kopii DNA na hodowlę. Wykazano możliwość utrzymania hodowli co najmniej przez 7 tygodni, stwierdzając jednocześnie w części hodowli zmiany morfologiczne organizmów, poczynając od 28-35 dnia po założeniu hodowli.