

Z życia naukowego

47. Dzień Kliniczny Parazytologii Lekarskiej „Toksooplazmoza (toxoplasmosis): przebieg kliniczny, diagnostyka i terapia; inne zagadnienia mikologii i parazytologii”

47. Day of Medical Parasitology „Toxoplasmosis: clinical course, diagnostics and therapy; other problems concerning mycology and parasitology”

47. Dzień Kliniczny Parazytologii Lekarskiej odbył się 4 kwietnia 2008 roku w Łodzi. Został zorganizowany przez członków Łódzkiego Oddziału Polskiego Towarzystwa Parazytologicznego, Zespołu Mikologii Komitetu Parazytologii PAN, pracowników Zakładu Biologii i Parazytologii Lekarskiej oraz Zakładu Diagnostyki i Leczenia Chorób Pasożytniczych i Grzybic Katedry Biologii i Genetyki Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Tematem Dnia Klinicznego były „Toksooplazmoza: przebieg kliniczny, diagnostyka i terapia; inne zagadnienia mikologii i parazytologii”. Program Dnia Klinicznego obejmował 31 referatów i doniesień. Obrady otworzyła Przewodnicząca ŁO Polskiego Towarzystwa Parazytologicznego – prof. dr hab. Jolanta Kwaśniewska – witając serdecznie wszystkich przybyłych. Następnie Prorektor ds. Nauki prof. dr hab. Paweł P. Liberski podkreślił duże znaczenie edukacyjne łódzkich zjazdów poruszających różnorodnie i aktualne zagadnienia parazytologiczne. Podziękował organizatorom za wytrwałość w organizowaniu corocznych spotkań i życzył owocnych obrad.

Pierwsza część obrad, której przewodniczyli profesorowie: Paweł P. Liberski, Wanda Kocięcka, Jerzy Stefaniak, Teresa Woźniakowska-Gęsicka i doc. Małgorzata Paul, dotyczyła różnych aspektów chorób pasożytniczych, w tym toksoplazmozy. Wykład prof. Pawła P. Liberskiego (UM, Łódź) dotyczył neuropatologii chorób pasożytniczych. Przedstawiono kliniczny obraz różnych chorób pasożytniczych związanych z ośrodkowym układem nerwo-

wym człowieka. Zwrócono uwagę na trudności diagnostyczne postaci mózgowych licznych parazytoz, m.in. amebozy, choroby Chagasa, malarii, toksoplazmozy, schistosomozy, paragonimozy, cysticerkozy, echinokokozy, cenurozy, filarioz. Podkreślono, że infekcje pierwotniakami najczęściej przebiegają pod postacią ostrego zapalenia mózgu i opon z typowymi objawami ogniskowymi. W postaci mózgowej malarii często obserwuje się obrzęk mózgu z licznymi mikrokrwotokami. Mogą występować skupienia merozoitów, które należy różnicować z cystami *Toxoplasma gondii* (bradyzoity *T. gondii* występujące w cystach są większe od merozoitów *P. falciparum*). W przebiegu wągrzycy często notuje się wodogłowie, zaś w badaniu mikroskopowym mózgu wykrywa się liczne wągry *T. solium* (*cysticercus cellulosae*). Larwy typu *echinococcus* (pęcherz bąblowcowy) tworzą w OUN zmiany przypominające guz mózgu, natomiast larwy typu *cenurus* *Taenia multiceps* wywołują zapalenie opony pajęczkiej, manifestujące się porażeniem nerwu VI, drgawkami oraz wodogłowiem.

W wykładzie pt. „*Toxoplasma gondii* – pasożyt znany i nieznan” prof. Henryka Długońska (UŁ, Łódź) podkreśliła, iż *T. gondii* jest nadal intrygującym pasożytem i fascynującym obiektem badań dla parazytologów, immunologów, genetyków i biochemików. Zwróciła uwagę na wysoką częstość zarażenia *T. gondii* w populacji człowieka na Świecie (ponad 1 mld ludzi), różniącą się zjadliwość trzech szczepów klonalnych wyodrębnionych na podstawie analizy enzymatycznej /izoenzymy/ i polimorfizmu DNA, a także – różne rodzaje transmisji paso-

żyta: horyzontalną – częstą (cysty tkankowe, oocysty) i wertykalną – rzadką (przez łożysko). Podkreślono, że zjadliwość *T. gondii* zależy nie tylko od szczepu pasożyta, ale również od genotypu żywiciela. Obecnie uważa się, że głównym komponentem odpowiedzialnym za dużą zjadliwość szczepu linii I jest pojedynczy gen ROP18 kodujący białko ROPTRII. Roptrie są odpowiedzialne za biogenezę wakuoli pasożytniczej oraz zjadliwość pasożyta dla żywiciela. Wysoce zjadliwe organizmy *T. gondii* linii I przyciągają więcej neutrofilów do miejsca zarażenia (szok cytokinowy) i występują liczniej wewnątrz neutrofilów, prawdopodobnie wskutek intensywniejszej penetracji czy wewnątrzkomórkowej replikacji. W następnym wystąpieniu prof. T. Woźniakowska-Gęsicka, dr K. Kmieć (ICZMP, Łódź) omówiły przebieg kliniczny nabytej toksoplazmozy u dzieci, która stanowi ciągle aktualny i częsty problem w klinice pediatrycznej. Zwrócono uwagę na fakt, że przyczyną wysokiej prevalencji *T. gondii* u dzieci jest: niedojrzałość układu odpornościowego, wysoka aktywność dzieci w otaczającym środowisku oraz nieprzestrzeganie zasad higieny. Spośród 224 dzieci skierowanych do Poradni Chorób Odzwierzęcych ICZMP z rozpoznaniem lub podejrzeniem toksoplazmozy, ostrą postać toksoplazmozy rozpoznano u 52 dzieci. Na podstawie własnych obserwacji stwierdzono, że objawowa nabyta toksoplazmoza najczęściej przebiega pod postacią węzłową. Uzyskane wyniki potwierdziły, iż zarażenie pierwotniakiem *T. gondii* przebiega z obniżeniem odsetka limfocytów CD4+, podwyższeniem odsetka limfocytów CD8+ i obniżeniem wskaźnika CD4+/CD8+. Analiza sezonowości zachorowań wykazała, że zachorowania na toksoplazmozę występują przez cały rok, jednak w okresie letnio-jesiennym odnotowano największą liczbę rozpoznań (we wrześniu – 20,5%). Podkreślono, że objawy kliniczne nabytej toksoplazmozy dzieci, połączone z wykryciem swoistych immunoglobulin anty-*Toxoplasma gondii* w surowicy, stanowią wskazanie do leczenia, zwłaszcza w przypadkach przebiegających z obniżeniem parametrów odporności komórkowej. Wczesna terapia powoduje ustąpienie klinicznych objawów choroby oraz zapobiega jej i nawrotom.

Następnie przedstawiono ocenę kliniczną i immunoserologiczną współistniejących zakażeń odzwierzęcych toksoplazmozy i jersiniozy (W. Kocięcka i A. Werner; UM, Poznań). Podkreślono, że są to choroby odzwierzęce o odmiennej etiologii, lecz często o wspólnych drogach zarażenia i różno-

rodnej przewlekłej patologii wielonarządowej. Na podstawie przeprowadzonej analizy klinicznej w grupie 13 chorych ze współistniejącą toksoplazmozą i jersiniozą (potwierdzoną serologicznie) wykazano, że proces chorobowy ma przebieg długotrwały. W zespole objawów dominowały: dolegliwości ze strony układu ruchu, nadmierne pocenie się oraz limfadenopatia, głównie szyi. Współwystępowanie toksoplazmozy i jersiniozy może być przyczyną trudności diagnostycznych i terapeutycznych, opóźniając ustalenie aktywności procesu patologicznego i jego wiodącej roli w obrazie choroby. Nierozpoznana i nieleczona jersinioza we wczesnym okresie może prowadzić do przewlekłego, nawracającego reaktywnego zapalenia stawów.

Trudności diagnostyczne i lecznicze w toksoplazmozie wrodzonej na podstawie własnych obserwacji klinicznych omówił zespół z Warszawy (B. Lipka, B. Milewska-Bobula; IP-CZD). Prawidłowe etapy procesu diagnostycznego toksoplazmozy wrodzonej powinny obejmować badania: pediatryczne, okulistyczne, neurologiczne, audiologiczne, obrazowe (USG, TK, RM) i inne (EEG, VEP, BAEP) oraz swoiste (wykrywanie przeciwciał, izolacja pasożyta lub jego DNA). Niektóre z badań (okulistyczne, neurologiczne, obrazowe) nie są wykonywane rutynowo, bądź są trudno dostępne w mniejszych ośrodkach, a ich wynik zależy od doświadczenia lekarza i jakości sprzętu. Skuteczność terapii toksoplazmozy wrodzonej wiąże się z trafną decyzją o rozpoczęciu leczenia: ciężarnej, płodu i noworodka. Podstawowymi trudnościami leczniczymi są: dobór leków pre- i postnatalnie, wysokie koszty terapii, długi czas leczenia, różne schematy leczenia pre- i postnatalnego, a także niewystarczające doświadczenie klinicysty. Podkreślono, że z uwagi na podobieństwo kliniczne objawów toksoplazmozy wrodzonej do występujących w innych zarażeniach i chorobach, jak: zaburzenia metabolizmu, choroby uwarunkowane genetycznie, intoksykacje oraz niedojrzałość immunologiczną noworodków i niemowląt, a także trudności w interpretacji wyników badań – ustalenie rozpoznania bywa trudne, niekiedy opóźnione i powinno być podejmowane w ośrodkach referencyjnych. Tylko kompleksowa ocena i długotrwała obserwacja umożliwiając potwierdzenie zarażenia *T. gondii* i uniknięcie zbędnej farmakoterapii.

Ocena skuteczności leczenia toksoplazmozy wrodzonej rozpoznanej na podstawie regionalnego programu badań przesiewowych noworodków w województwie wielkopolskim została przedsta-

wiona przez dr hab. Małgorzatę Paul (UM, Poznań). Wrodzone zarażenie *T. gondii* potwierdzają: obecność swoistych IgM i/lub IgA w surowicy krwi po ukończeniu 7 doby życia, znaczący wzrost poziomu przeciwciał klasy G w 1. roku życia, obecność IgG o innej swoistości antygenowej lub syntetyzowanych w wyższym stężeniu niż immunoglobuliny matki (WB), utrzymywanie się dodatnich poziomów przeciwciał klasy G powyżej 12 miesiąca życia. Prawidłowa obserwacja serologiczna powinna sprowadzać się do oceny poziomu swoistych IgA, IgM i IgG anty-*T. gondii*, co 2 miesiące w 1. roku życia, następnie, co 4 miesiące, po ukończeniu leczenia w okresie wczesnego dzieciństwa i w wieku przedszkolnym, później 2 razy w roku w okresie szkolnym. Rodzaj oraz długość stosowanego leczenia przeciwpasożytniczego w toksoplazmozie wrodzonej powinny być dobierane indywidualnie w zależności od postaci klinicznej zarażenia oraz odpowiedzi immunologicznej pacjenta. Masowe badania serologiczne noworodków w kierunku swoistych przeciwciał klasy A i M, skojarzone z intensywnie prowadzonym, długotrwałym leczeniem pourodzeniowym, wydają się być obiecujące w zapobieganiu występowania ciężkich następstw klinicznych wrodzonego zarażenia *T. gondii*.

Zwrócono uwagę na fakt, że *T. gondii* jest jednym z przedmiotów zainteresowań międzynarodowego programu TORCH dotyczącego zapobieganiu infekcjom wrodzonym. Ocenia się, że odsetek zarażonych osób dorosłych w Polsce wynosi około 70% i zarażenie *T. gondii* jest dwukrotnie wyższe wśród ludności wiejskiej. Toksoplazmoza u kobiet w okresie rozrodczym stanowi bardzo poważny problem zdrowotny, nie tylko w odniesieniu do jednostki, ale także w aspekcie społecznym. Zarażenie kobiety *T. gondii* może prowadzić do: nieprawidłowego przebiegu ciąży, opóźnienia wzrastania wewnątrzmacicznego (IUGR), poronienia, porodu przedwczesnego, obumarcia wewnątrzmacicznego płodu (IUD), lub urodzenia dziecka z toksoplazmozą wrodzoną. W Polsce rejestruje się około 300 przypadków rocznie toksoplazmozy wrodzonej. Ocenę prevalencji *T. gondii*, w oparciu analizę stężenia swoistych anty-*T. gondii* immunoglobulin G i M w surowicy kobiet w okresie rozrodczym przedstawił zespół z Łodzi (A. Kurnatowska, M. Lipińska-Gołąb, A. Sieczkowski, I. Tomczewska; UM). Badaniami objęto próby populacji kobiet Pabianic, Włocławka i Łodzi (669 – niebędących w ciąży oraz 571 ciężarnych). Poziom swoistych immunoglobulin przeciwtoksoplazmowych klasy G oraz M oznaczano testa-

mi enzymatycznymi ELISA (Abbot, Organon). Stwierdzono, że prevalencja *T. gondii* wśród zbadanych kobiet w okresie rozrodczym wyniosła 50%. Odsetek kobiet ciężarnych, u których wykryto swoiste IgG był znamienne niższy ($p < 0,0001$) niż u nieciężarnych. Nie stwierdzono istotnego związku statystycznego między częstością dodatnich testów serologicznych z antygenem *T. gondii*, a stałym kontaktem z kotem, natomiast istniał związek statystyczny między dodatnim wynikiem testu na obecność swoistych IgG (+), a spożywaniem surowego mięsa przez badane kobiety.

Drugą częścią obrad, której przewodniczyli profesorowie: Andrzej Denys (UM, Łódź), Henryka Długońska (UŁ, Łódź), Józef Kur (PG, Gdańsk) i Izabela Planeta-Małecka (ICZMP, Łódź) obejmowała doniesienia głównie z zakresu diagnostyki i profilaktyki toksoplazmozy. Zespół z Łodzi i Gdańska (J. Gatkowska, A. Gąsior, J. Kur, H. Długońska; UŁ, PG) przedstawił ocenę aktywności szczepionek rekombinowanych mogących znaleźć w przyszłości zastosowanie w immunoprofilaktyce toksoplazmozy. Zwrócono uwagę, że ciągły rozwój immunologii i biologii molekularnej prowadzi do nowych strategii w konstruowaniu „idealnej” szczepionki. Ekspozowanie określonych sekwencji białkowych (epitopów) na powierzchni bakterii w postaci fimbrii zbudowanych z chimerycznych podjednostek białkowych adhezyny DraE otwiera nową drogę do biotechnologicznej produkcji szczepionek anty-*T. gondii*. Białko DraE ma zdolność wiązania się z receptorem DAF, a tym samym wnikania do komórek gospodarza i pobudzenia odpowiedzi komórkowej. Skonstruowano rekombinowane plazmidy ekspresyjne, które umożliwiają ekspresję trzech białek DRAE-epitop. Do sekwencji aminokwasowej białka DraE zostały wprowadzone epitopy pochodzące z następujących białek *T. gondii*: SAG1 (białko powierzchniowe pasożyta), GRA1 (antygen wydzielniczy), MAG1 (antygen ściany komórkowej i macierzy cyst tkankowych). W doświadczeniach własnych do immunizacji myszy szczepu C3H zastosowano różne preparaty białek: DraE; DraE-SAG1+DraE-GRA1+DraE-MAG1; reSAG1+reGRA1+reMAG1 oraz poliwalentny (tzn. mający wiele determinant) antygen *Toxoplasma* (TLA). Zwierzęta po immunizacji zarażano słabo zjadliwym, ale wysoce cystotwórczym szczepem DX *T. gondii* (10 cyst). W celu oceny odpowiedzi komórkowej zwierząt oznaczano liczbę cyst pierwotniaka w mózgach zarażonych myszy. Biorąc pod uwagę istotną redukcję liczebności cyst (89%) u myszy immuni-

zowanych szczepionką złożoną z rekombinowanych białek *T. gondii* (reSAG1+reGRA1+reMAG1) w porównaniu z kontrolą (PBS) potwierdzono jej wysoką aktywność ochronną. Silne właściwości immunogenne i immunoprotekcyjne użytych w doświadczeniu antygenów rekombinowanych *T. gondii*, wzbudzają nadzieję na ich wykorzystanie jako antygenów w szczepionkach.

W kolejnym doniesieniu dr Elżbieta Hiszczyńska-Sawicka (PG, Gdańsk) przedstawiła odpowiedź immunologiczną u owiec na DNA szczepionki kodujące białka antygenowe *T. gondii*. Zwrócono uwagę na fakt, że dostępna na rynku szczepionka TOXOVAX® zawierająca atenuowany szczep S48 *T. gondii* (nie tworzy cyst tkankowych) zabezpiecza owce przed ronieniem, ale posiada wiele wad, m.in.: jest nietrwała, potencjalnie niebezpieczna dla osób przygotowujących szczepionkę i pracowników farm, a ponadto stwarza ryzyko rewersji do patogenego fenotypu. Wobec powyższego faktu istnieje konieczność wyprodukowania szczepionki bezpiecznej i efektywnej. Aktualnie nie istnieje szczepionka DNA, która została zaakceptowana do użytku weterynaryjnego. W doświadczeniach własnych immunizowano owce szczepionką DNA kodującą antygen MAG1 *Toxoplasma gondii*. Fragment genu kodującego antygen MAG1/p65 (cyst matrix protein, MAG1/p65) bez własnej sekwencji sygnałnej i transmembranowej został wklonowany do eukariotycznego wektora ekspresyjnego. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że domięśniowa immunizacja zwierząt plazmidowym DNA (pMAG1 lub pMAG1+povIL-6) generuje silną odpowiedź przeciwciał. pMAG1 indukuje odpowiedź komórkową, przejawiającą się podwyższonym poziomem IFN. W układzie pMAG1+povIL-6 ekspresyjna IL-6 hamuje ekspresję IFN. W podsumowaniu podkreślono, że DNA szczepionka stymuluje humoralną i komórkową odpowiedź immunologiczną. Jej główną zaletą jest zdolność do generowania silnej odpowiedzi komórkowej z preferencjami do MHC I-zależnych CD8+ cytotoksycznych komórek T i MHC II-zależnych pomocniczych komórek T typu 1 (Th1).

Następnie dr Karolina Mrówka (UM, Poznań) omówiła analizę potencjalnych czynników ryzyka zarażenia pierwotniakiem *T. gondii* u pacjentów z ostrym zapaleniem węzłów chłonnych. Celem pracy było ustalenie korelacji między warunkami demograficznymi i zwyczajami sanitarno-żywnioowymi, a częstością występowania zarażeń *T. gondii* w próbie populacji województwa wielkopolskiego,

a także aktualna ocena stopnia świadomości społeczeństwa na temat głównych źródeł i dróg inwazji *T. gondii* w najbliższym środowisku człowieka oraz możliwości zapobiegania zarażeniu. W toku badań własnych stwierdzono, że najczęstszym czynnikiem ryzyka zarażenia *T. gondii* u badanych pacjentów było spożywanie surowych wędlin i surowego mięsa oraz jego próbowanie podczas przygotowywania posiłków. Fakt posiadania zwierząt w domu, a w szczególności dorosłego kota lub młodych kotciąt, okazał się nieistotny dla zarażeń *T. gondii* nabywanych w badanej próbie populacji Wielkopolski. Ważnym czynnikiem ograniczającym ryzyko inwazji *T. gondii* u kotów jest unikanie karmienia kotów surowym mięsem. Wiedza pacjentów na temat źródeł i czynników ryzyka zarażenia *T. gondii* w naszej strefie geograficznej oraz stopnia zagrożenia zdrowotnego dla osób z grup ryzyka wzrasta, co wynika z upowszechnionego dostępu do internetu oraz literatury popularno-naukowej.

Zespół z Łodzi (K. Dzitko, B. Dziadek, J. Gatkowska, H. Ławnicka, J. Komorowski, H. Długońska; UŁ, UM) przedstawił doniesienie pt. „Poziom wybranych hormonów a częstość zarażenia *Toxoplasma gondii* u ludzi”. Autorzy zwrócili uwagę na korelację pomiędzy stężeniem niektórych hormonów (prolaktyna, estrogen, progesteron, testosteron) a występowaniem przeciwciał anti-*T. gondii*. Z danych piśmiennictwa wynika, że u kobiet wraz ze wzrostem stężenia prolaktyny maleje prewalencja *T. gondii*. Natomiast u mężczyzn nie zaobserwowano istotnych różnic pomiędzy stężeniem PRL a częstością osobników seropozytywnych. Nadal jednak pozostaje kwestią sporną, czy to pierwotniak powoduje zmiany w stężeniu hormonów, czy też ich wzrost wpływa na częstość zarażenia *T. gondii*.

Dr Karolina Świtaj (UM, Warszawa) omówiła znaczenie genotypowania *T. gondii* dla określenia zjadliwości pasożyta. Podkreślono, że trzy różne szczepy *T. gondii* cechują się różną zjadliwością dla zwierząt laboratoryjnych (dla myszy LD₁₀₀~1 – typ I; LD₁₀₀~kilka tysięcy – typ II i III) oraz właściwościami biologicznymi (typ I – intensywne podziały; typ II intensywne tworzenie cyst), co istotnie wpływa na odmienny przebieg kliniczny toksoplazmozy. Analiza regionu NTS2 *T. gondii* wykazała, że w grupie pacjentów bez cech upośledzenia odporności postacią oczna toksoplazmozy była następstwem zarażenia zjadliwymi szczepami *T. gondii* typu I. W podsumowaniu zwrócono uwagę na fakt, że zastosowanie genotypowania ma kluczowe znaczenie dla określenia zjadliwości *T. gondii*.

Następnie omówiono ekstensywność zarażenia świń i dzików *T. gondii* w wybranych rejonach Polski na podstawie obecności specyficznych przeciwciał klasy G (J. Bień, B. Moskwa, K. Goździk, W. Cabaj; Instytut Parazytologii PAN, Warszawa). Badania wykazały przydatność testu „ELISA *T. gondii* Serum Screening” (Institute Porquier, Paryż, Francja) do diagnozowania obecności *T. gondii* u świń i dzików na podstawie specyficznych IgG. Uzyskany wysoki odsetek surowic dodatnich sugeruje szerokie rozprzestrzenienie pasożyta u badanych zwierząt, dlatego też mięso (wyroby z dziczyzny) powinny być brane pod uwagę jako czynnik ryzyka dla osób preferujących konsumpcję wędzonego lub półsurowego mięsa, bądź jego przetworów.

Przedstawiciel firmy bioMérieux, która jest światowym liderem w diagnostyce chorób panelu TORCH i testów serologii manualnej zaprezentował różne testy immunoserologiczne stosowane do diagnostyki toxoplazmozy: 1. technikę ELFA (VIDAS): VIDAS TOXO IgG – ilościowe wykrywanie przeciwciał IgG, VIDAS TOXO IgM – jakościowe wykrywanie przeciwciał IgM, VIDAS TOXO IgG Avidity – oznaczanie awidności przeciwciał IgG; 2. automatyczny analizator immunoserologiczny (System VIDIA) pracujący w technice chemiluminescencji z wydajnością wykonywania 80–100 testów na godzinę /VIDIA TOXO IgG, VIDIA TOXO IgM/; 3. immunosorbcyjne testy aglutynacyjne (ISAGA) do wykrywania przeciwciał przeciwko *T. gondii* umożliwiające ocenę stanu immunologicznego pacjentów z podejrzeniem zakażenia pierwotniakiem /Toxo-ISAGA IgA, Toxo-ISAGA IgM/; 4. testy bezpośredniej aglutynacji: IgG (Test Toxo-Screen DA do wykrywania przeciwciał IgG anty-toksoplazma w ludzkiej surowicy metodą bezpośredniej aglutynacji).

Kolejnej, III części obrad 47. Dnia Klinicznego Parazytologii Lekarskiej przewodniczyli: dr Zbigniew Bednarkiewicz (UM Łódź), prof. dr hab. Maria Dynowska (UWM, Olsztyn), prof. dr hab. Bożena Moskwa (Inst. Parazytologii PAN, Warszawa) i prof. dr hab. Eugeniusz Małafiej (ICZMP, Łódź).

Pierwszy referat przedstawiał uwagi metodyczne dotyczące analizy mikologicznej materiałów biologicznych pochodzących od ptaków (M. Dynowska, K. Góralska; UWM, Olsztyn). Autorki przedstawiły przykładowe szlaki transmisji grzybów potencjalnie chorobotwórczych dla człowieka oraz wyniki 4-letnich badań własnych różnorodności gatunkowej i prewalencji grzybów zasiedlających układ odde-

chowy i pokarmowy 9 gatunków zdrowych ptaków siewkowych (osobników młodych i dorosłych). Materiał pozyskiwano od ptaków podczas migracji wiosennej i jesiennej, w wybranych terenowych punktach obrączkarskich Zatoki Gdańskiej i okolic Olsztyna. Wyizolowano 41 gatunków grzybów z różnych grup systematycznych, z których większość zdecydowanie lepiej namnażała się w temperaturze pokojowej (stosowanej jako wyjściowa w analizach hydromikologicznych) niż w temperaturze 37°C. Autorki sugerują, iż wysoka temperatura ciała ptaków (40–42°C) hamuje metabolizm grzybów i aby go uruchomić grzyby wymagają stopniowej powolnej adaptacji temperaturowej. Gatunki, które szybciej rosły w temperaturze 37°C, mogą być stałymi komensalami ptaków; dla wolniej rosnących – ptaki mogą być tylko wektorem. Do izolacji grzybów z naturalnych rezerwuarów powinien być wprowadzony agar glukozowo-ziemniaczany (PDA) – podłoże stosowane w izolacji fitopatogenów ważnych także w mikologii lekarskiej (*Fusarium*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Botrytis* i in.). Przy wszelkich analizach ogniów epidemiologicznych należy brać pod uwagę możliwość modyfikacji standardu diagnostycznego uwzględniając środowisko, z którego pochodzą badane czynniki etiologiczne.

Kolejna praca auterek z Krakowa (A. Gniadek i A. B. Macura, UJ) dotyczyła środowiskowego ryzyka zarażeń grzybiczych w sali wzmożonego nadzoru noworodków. Wśród zakażeń szpitalnych, grzyby z rodzaju *Candida* są przyczyną ponad 90% wszystkich zarażeń grzybiczych w pierwszych tygodniach życia dziecka. Natomiast grzyby pleśniowe, należą do rzadziej spotykanych – stanowią nie więcej niż 1–2% wszystkich zakażeń szpitalnych. Są jednak odpowiedzialne za ciężkie zarażenia (patogeny te nazywane są *emerging pathogens*). Dla określenia środowiskowego ryzyka zarażeń grzybami pleśniowymi istotne jest podanie liczby zarodników grzybów izolowanych z pomieszczeń, identyfikacja mikologiczna wyhodowanych grzybów oraz, w przypadku grzybów o udowodnionej patogenności, określenie cytotoksyczności lub zdolności do wytwarzania mikotoksyn. Pobrano łącznie 30 próbek powietrza przy użyciu aparatu MAS 100 (Merck) oraz 120 odcisków (metoda Count-Tact), ze ścian, podłogi, sprzętów (wewnętrzna ścianka inkubatora, wanienska do kąpieli noworodka, waga, materacyk, stolik zabiegowy, umywalka do mycia rąk, bateria umywalki) oraz dłoni pielęgniarek pracujących w oddziale. Izolowane grzyby w większości należały do grzybów pleśniowych

(rodzaje *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*). Dominowały one w próbkach pobranych ze ścian i podłóg, sprzętów oraz dłoni, a w przypadku powietrza stanowiły 100% wszystkich wyhodowanych mikroorganizmów. Liczby grzybów uzyskane z powietrza sali wzmożonego nadzoru noworodka w większości przewyższały dopuszczalne wartości dla sal opatrunkowych. W osiemnastu próbkach średnie wartości były wyższe niż 200 j.t.k./m³, a w 6 przypadkach przewyższały 1200 j.t.k./m³, 17 szczepów z rodzaju *Aspergillus* poddano testowi cytotoksyczności MTT (*modified tension test*), polegającemu na ocenie biologicznej aktywności toksyn grzybów (cytotoksyczność dla komórek świńskich) i wszystkie one były cytotoksyczne; w większości – wysoko. Autorki pracy podkreśliły, że źródłem zarażeń grzybami na oddziałach położniczo-noworodkowych może być powietrze zawierające oportunistyczne grzyby pleśniowe.

„Zastosowanie metody MSSCP do wykrycia różnic genetycznych w obrębie genu ERG11 *Candida albicans*” – to tytuł wystąpienia mgr J. Strzelczyk, prof. A. Wiczowskiego (SUM Zabrze) i mgr A. Ślemp-Migiel (SPZOZ, Nowy Targ). Gen ERG11 koduje 14- α -demetylazę lanosterolu, enzym zaangażowany w syntezę ergosterolu, składnika ściany komórkowej grzybów. Leki azolowe, często stosowane w terapii przeciwgrzybiczej, blokują działanie tego enzymu, a oporność *C. albicans* na te leki wynika z mutacji bądź nadekspresji genu ERG11. Po wyizolowaniu DNA ze 122 szczepów *C. albicans*, pochodzących z materiałów klinicznych chorych hospitalizowanych w Samodzielnym Publicznym Szpitalu w Nowym Targu, techniką PCR określono i uzyskano (stosując 4 pary starterów obejmujące różne mutacje spotykane w genie ERG11) fragmenty genu ERG11. Metoda MSSCP (ang. *Multitemperature Single Strand Conformation Polymorphism* – Wielotemperaturowy Polimorfizm Jednoniciowych Konformacji DNA) wykazała istnienie różnych profili elektroforetycznych tych fragmentów. Wskazuje to na występowanie zmienności genetycznej w obrębie genu ERG11 – polimorfizmów lub mutacji.

Następnie zespół z Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku (J. Wasilewska, B. Tomaszewska, M. Sawicka-Żukowska, M. Żukiewicz, M. Kaczmarek, A. Majewska) przedstawił pracę dotyczącą klinicznych aspektów glistnicy. We wprowadzeniu autorzy przedstawili sytuację epidemiologiczną glistnicy. W Polsce wg niektórych autorów 1–18%, wg innych 40–50% populacji stanowią osoby zara-

żone (8–30% wśród dzieci), w zależności od regionu. W prezentowanej pracy oceniono częstość występowania zarażenia *Ascaris lumbricoides* u dzieci z Dąbrowy Białostockiej i okolic (wieś i małe miasta) oraz dokonano oceny obrazu klinicznego zarażenia w badaniach retrospektywnych kart informacyjnych. Na podstawie badania kału metodą sedymentacji stwierdzono, że glistnica występowała z częstością 24 i 28% odpowiednio w 2005 i 2006 roku. Wśród obserwowanych objawów najczęściej występowały bóle brzucha i objawy ze strony układu oddechowego, rzadziej wymioty, biegunka, objawy skórne i obniżenie łaknienia. Schorzenia współistniejące to: zapalenie płuc, ostre i nawracające infekcje dróg oddechowych, ostre zaburzenia żołądkowo-jelitowe, astma oskrzelowa, AZS i pokrzywka. U około 7% dzieci stwierdzono równocześnie giardiozę.

„Wyniki obserwacji wstępnych nadwrażliwości pokarmowej u dzieci z zakażeniem *Candida* spp.” to tytuł kolejnego doniesienia (J. Wasilewska, M. Kaczmarek; UM, Białystok). Dane piśmiennictwa wskazują, że patologiczny wzrost *Candida* sp. w jelicie może powodować wzrost przepuszczalności bariery jelitowej dla białek pokarmowych i uczulenie na antygeny pokarmowe – wzrost miana IgG i IgE przeciw owoalbuminie i wywołać alergię pokarmową. Autorzy oceniali dzieci z atopowym zapaleniem skóry i nadmierną kolonizacją jelita przez *Candida* spp. Stwierdzili u nich częstsze, niż u dzieci bez zarażenia *Candida* spp., występowanie IgE-zależnej nadwrażliwości na białko jaja kurzego i niealergiczną reakcję na gluten (pieczywo). Korzystny efekt kliniczny u badanych dzieci obserwowano po eliminacji tych pokarmów.

Zarażenia grzybicze dotyczą ponad 40% ludności Świata. Wśród nich znaczący udział mają dermatofity, powodujące grzybice skóry i jej przydatków. Zespół z Łodzi i Gdańska (A. Dobrowolska UŁ, B. Krawczyk i J. Leibner-Cisak PG, A. Kaszuba UM) w swoim doniesieniu przedstawił technikę PCR MP (*PCR Melting Profile*) w różnicowaniu genetycznym dermatofitów. Ocena metodą PCR MP genomowego DNA trawionego endonukleazą *HindIII*, izolowanego z komórek 10 szczepów *Trichophyton rubrum* pochodzących od pacjentów z regionu łódzkiego, pozwoliła na wyodrębnienie w badanej kolekcji dermatofitów 4 grup, podczas gdy metoda RAPD (z użyciem opisanego w literaturze startera Baeza1) – jedynie 2. Przedstawiona metoda, o ogromnym potencjale różnicującym, stanowi nową alternatywę w identyfikacji i różnicowaniu oraz

pozwała na ocenę różnorodności genetycznej szczepów dermatofitów.

Zastosowanie techniki PCR do wykrywania dermatofitów z rodzaju *Trichophyton*, *Epidermophyton* i *Microsporum* uzyskanych bezpośrednio z próbek pacjentów – to tytuł wystąpienia dr A. Brillowskiej-Dąbrowskiej (PG, Gdańsk). Autorka przedstawiła algorytm diagnostyki molekularnej dermatofitów, a także zalety i wady metody PCR. Metoda molekularna umożliwiła krótki czas oczekiwania na diagnozę, ogranicza ryzyko kontaminacji próbki w laboratorium przez grzyby występujące w środowisku oraz wykazuje wyższą czułość i specyficzność w porównaniu do metod konwencjonalnych. Jednak nie pozwala na identyfikację gatunkową grzybów z rodzaju *Trichophyton* innych niż *T. rubrum* oraz na rozróżnienie gatunków *M. canis* i *M. audouinii*.

W kolejnym referacie omówione zostało zastosowanie genu syntazy chitynowej I (*chsI*) jako wyznacznika genetycznego w molekularnej identyfikacji dermatofitów (J. Dębska, A. Dobrowolska; UŁ, Łódź). Identyfikacja molekularna, badanie pokrewieństwa między niektórymi grzybami chorobotwórczymi, może polegać na analizie polimorfizmu różnych markerów genetycznych (operony rDNA, niektóre regiony mitochondrialnego DNA, zasadowe proteazy, enolaza grzybowa, rRNA o współczynniku sedymentacji 18 S i 26 S, syntaza chitynowa) specyficznych dla gatunku lub szczepu. Uzyskane wyniki badań pozwoliły stwierdzić, że gen *chsI*, nie stosowany dotychczas w molekularnej identyfikacji dermatofitów, pozwala na różnicowanie *T. rubrum* i *T. mentagrophytes*. Zastosowane w metodzie PCR-RFLP endonukleazy pozwoliły na rodzajową (*Sau3A I*) i gatunkową (*Mvn I*, *Hpa II*) identyfikację badanej kolekcji dermatofitów.

W wystąpieniu zatytułowanym „Molekularne metody różnicowania gatunków *Cryptosporidium*” autorki (W. Rożej, M. Waloch, E. Gołąb; NIZP-PZH, Warszawa) zwróciły uwagę, iż wśród ludzi występuje powszechna podatność na zarażenie tym pierwotniakiem, dawka infekcyjna jest bardzo niska (1–10 oocyst), a grupy ryzyka stanowią dzieci do 2 lat oraz osoby z obniżoną czynnością układu odpornościowego. Spośród wielu gatunków *Cryptosporidium* dla człowieka patogennych jest 7 (*C. canis*, *C. felis*, *C. hominis*, *C. meleagridis*, *C. muris*, *C. parvum*, *C. suis*), dla których rezerwuarami są zwierzęta domowe (psy, koty), bydło, także ptaki hodowlane (indyk) czy zwierzęta dzikie (mysz, wilk, dzik). Metodami wykrywania tego pasożytniczego pierwotniaka są: barwienie (metoda Ziehl-Neelsena,

rodamina, akrydyna, auramina), immunofluorescencja bezpośrednia (np. zestaw MeriFluor®*Cryptosporidium*/Giardia firmy Meridan), test immunoenzymatyczny ELISA w kierunku specyficznego dla *Cryptosporidium* spp. koproantygeny w kale oraz badania molekularne, które pozwalają na różnicowanie gatunków (PCR, nested-PCR, PCR-RFLP, Real time PCR, sekwencjonowanie nukleotydów). W badaniach 503 próbek kału (347 – od zdrowych zwierząt domowych oraz 156 – od dzieci w wieku od 1 miesiąca do 9 lat, w tym 34 od dzieci zdrowych i 122 od dzieci z biegunką o nieokreślonej etiologii hospitalizowanych w dwóch warszawskich szpitalach) oocysty pasożyta wykryto w 42 próbkach od zwierząt (12,1% psów i 8,6% kotów) oraz w 36 próbkach kału dzieci z biegunką. U żadnego ze zbadanych 34 zdrowych dzieci nie wykryto oocyst. Metodami molekularnymi określono, że izolaty należały do gatunku *C. parvum*, dla którego żywicielem jest mysz domowa. Autorki podkreśliły, że częste bezobjawowe infekcje *Cryptosporidium* wśród domowych psów i kotów mogą odzwierciedlać obecność tego pasożyta w środowisku w okolicach Warszawy.

W ostatnim wystąpieniu części III przedstawiono ocenę prewalencji grzybów u chorych z ostrymi zespołami wieńcowymi leczonych pierwotną angioplastyką wieńcową (Z. Bednarkiewicz, A. Jaskółowska, J. Z. Peruga, J. Kwaśniewska; UM, Łódź). Badaniami objęto 105 chorych, z rozpoznaniem ostrego zespołu wieńcowego, u których wykonano posiewy z krwi, materiału z jamy ustnej, skóry z okolicy nakłucia tętnicy (przed stosowaniem rutynowych środków dezynfekcyjnych) oraz dodatkowo z dystalnego fragmentu cewnika angioplastycznego używanego podczas zabiegu. Wyizolowano 71 szczepów grzybów należących do rodzajów *Candida* i *Rhodotorula* od 62,8% osób (u 61,9% z posiewów jamy ustnej i u 5,71% – z posiewów skóry z okolicy nakłucia tętnicy). Nie stwierdzono obecności grzybów w krwi pacjentów oraz w posiewach z cewnika angioplastycznego.

Obradom IV części zjazdu przewodniczyli: prof. dr hab. Tomasz Ferenc (UM, Łódź), prof. dr hab. Maciej Kaczmarek (UM, Białystok), prof. dr hab. Ewa Małecka-Panas (UM, ICZMP, Łódź) oraz prof. dr hab. Andrzej Wiczkowski (SUM, Zabrze). Pierwszy referat sesji przedstawiony przez zespół z Instytutu Centrum Zdrowia Matki-Polki dotyczył częstości zakażeń wirusem cytomegalii u dzieci (wiek 1–20 miesięcy) z pneumocystozą (E. Małafiej, E. Śpiewak, E. Wierzbicka). *Pneumocystis ca-*

rinii występujący dość powszechnie u ludzi powoduje zapalenie płuc w warunkach nabytych zespołów niedoboru immunologicznego, u wcześniaków, osób z nowotworami złośliwymi, leczonych immunosupresyjnie, w ciężkiej przewlekłej postaci niedożywienia, przy niedoborach cynku (martwicze zapalenie jelita cienkiego) i przy współistniejącej cytomegalii. Autorzy stwierdzili obecność przeciwciał anty-CMV u 75,0% dzieci z dodatnimi wynikami badań w kierunku pneumocystozy i u 42,9% z wykluczoną infekcją *P. jirovecii*. W grupie pacjentów bez pneumocystozy w żadnym przypadku nie wykryto przeciwciał klasy M, obecne były IgG o średnim mianie 26,7. Natomiast w grupie zarażonych obserwowano zarówno współistnienie IgG i IgM, jak również jedynie IgG o średnim mianie 28,7.

W kolejnym wystąpieniu zespół z Kliniki Gastroenterologii UM Łódź (M. Niedworok, M. Kolas, B. Sordyl, I. Płaneta-Małecka, E. Małecka-Panas) przedstawił ocenę eozynofilii, stężenia immunoglobuliny E i eozynofilowego białka kationowego w krwi obwodowej w monitorowaniu aktywności zarażenia i leczenia toksokarozy u dzieci. Dla diagnostyki toksokarozy poszukuje się metody, która pozwoliłaby odróżnić stan aktywnego zarażenia *Toxocara canis* od skutków poliklonalnej stymulacji limfocytów B. Brak jest skutecznej metody monitorowania leczenia tej choroby. Badaniami objęto 45 dzieci (3–18 lat) z rozpoznaniem, wcześniej nieleczonym zarażeniem *T. canis* oraz 41 dzieci (2–18 lat) z negatywnymi wywiadami w kierunku alergii, bez chorób pasożytniczych, u których nie stwierdzono przeciwciał przeciw nicieniom. Stwierdzono, że średnie miano przeciwciał przeciw *T. canis*, liczba eozynofiliów, średnie stężenie IgE oraz stężenie eozynofilowego białka kationowego ulegały obniżeniu w trakcie leczenia toksokarozy. Dlatego też, autorzy pracy uznali dwa ostatnie wymienione parametry krwi obwodowej za przydatne do monitorowania skuteczności leczenia toksokarozy u dzieci.

„Grzyby drożdżopodobne w przewodzie pokarmowym u dzieci w materiale własnym” to tytuł wystąpienia zespołu z Łodzi (B. Fortak, J. Trojanowska-Lipczyk, I. Płaneta-Małecka i E. Małecka-Panas; ICZMP, UM). Zbadano dzieci w wieku 3–18 lat z nawracającymi bólami brzucha i z dodatnimi wynikami badań mikologicznych. Przeprowadzono gastroskopię, badania histologiczne pobranych wycinków z błony śluzowej przetyku, żołądka, jelita cienkiego oraz badanie mikologiczne materiału z jamy ustnej, gardła, odbytu i pobranych wycinków.

U wszystkich dzieci wykazano zmiany zapalne błony śluzowej przewodu pokarmowego; grzyby poza jamą ustną i odbytem stwierdzono u ponad 77% dzieci. U 95% zbadanych wykrywanym gatunkiem była *C. albicans*.

Ocena mikroflory jelitowej u dzieci z zasiedleniem błony śluzowej przewodu pokarmowego grzybami z rodzaju *Candida* była przedmiotem pracy zespołu z ICZMP i UM, w Łodzi (J. Trojanowska-Lipczyk, B. Fortak, E. Dynska, M. Kolas i E. Małecka-Panas). Poszczególne odcinki przewodu pokarmowego zasiedlone są przez swoiste bakterie, które klasyfikowane są do 30–40 gatunków stanowiących 99% tych drobnoustrojów. Niekiedy obserwuje się nadmierną kolonizację przewodu pokarmowego przez bakterie, co określane jest jelitowym przerostem bakteryjnym. W ocenie tego zjawiska wykorzystuje się wodorowy test oddechowy po doustnym podaniu 10 g laktulozy. Bakterie w wyniku fermentacji produkują dwutlenek węgla oraz metan i wodór. Gazy te wchłaniane do krwi, przedostają się do płuc, a następnie są wydychane. Po podaniu znanej porcji substratu dla bakterii możemy, po ilości wydychanych cząsteczek wodoru i czasie ich pojawienia się, wnioskować, w jakim odcinku jelita znajdują się bakterie i w jakiej ilości. Oceniono 30 dzieci w wieku od 5 do 17 lat, z przewlekłymi bólami brzucha, u których stwierdzono zasiedlenie przewodu pokarmowego grzybami z rodzaju *Candida*. Powietrze pobierano na czczo, co 15 minut przez pierwszą godzinę, a następnie po 30 minutach i po godzinie. Analizę powietrza wydychanego przeprowadzono używając GASTROLYZERA marki Bedfont. Stwierdzono u jednego dziecka (3,33%) przerost bakteryjny w jelicie cienkim, u 12 dzieci (40%) przerost w jelicie grubym, u 6 dzieci (20%) przerost w jelicie cienkim i grubym. Bez przerostu było 11 dzieci (36,7%). Autorki podkreśliły, iż w diagnostyce i leczeniu zarażeń przewodu pokarmowego grzybami należy uwzględnić złożony charakter mikroflory jelitowej.

Ocenę *in vitro* wrażliwości szczepów grzybów z rodzaju *Candida* izolowanych od pacjentów hospitalizowanych i leczonych ambulatoryjnie na mikonazol, itraconazol i worykonazol przedstawili pracownicy z UM w Łodzi (A. Kurnatowska, P. Kurnatowski i J. Kwaśniewska). Leki azolowe to największa grupa chemioterapeutyków przeciwgrzybiczych, które blokują etap demetylacji 14- α -lanosterolu w biosyntezie ergosterolu – składnika błon komórkowych grzyba. Określono najmniejsze stężenia leków hamujące wzrost badanego szczepu

grzyba (MIC) dla 117 szczepów *C. albicans* wyizolowanych od pacjentów leczonych ambulatoryjnie oraz dla 65 szczepów *C. albicans*, 7 szczepów *C. parapsilosis*, 7 szczepów *C. tropicalis* i 5 szczepów *C. glabrata* wyizolowanych od pacjentów hospitalizowanych. Stwierdzono, że aktywność itrakonazolu wobec szczepów *C. albicans*, wyodrębnionych od pacjentów obu grup była wyższa niż mikonazolu, oraz że szczepy *C. albicans* od pacjentów leczonych ambulatoryjnie okazały się istotnie bardziej wrażliwe na zastosowane leki niż szczepy pochodzące od pacjentów hospitalizowanych.

Mgr A. Ślemp-Migiel (Podhal. Szp. Specj., Nowy Targ) i prof. A. Wiczowski (SUM, Zabrze) zaprezentowali analizę zależności pomiędzy aktywnością enzymatyczną a opornością na azole *C. albicans*. Materiałem badanym były szczepy wyizolowane z różnych materiałów biologicznych (plwocina, ropa, mocz, krew, aspirat z oskrzeli) pochodzących od chorych hospitalizowanych w Podhalańskim Szpitalu Specjalistycznym w Nowym Targu w latach 2005–2007. Badanie wykonano za pomocą testów ATB Fungus (bioMérieux) i testu API Zym (bioMérieux). Oznaczono wartości MIC dla flukonazolu, itrakonazolu i worykonazolu oraz aktywność 19 enzymów hydrolitycznych. Spośród wszystkich badanych szczepów *C. albicans* wyselekcjonowano dwie grupy po 61 szczepów wrażliwych i opornych na azole. Stwierdzono, że wraz ze wzrostem MIC dla flukonazolu maleje aktywność:

esterazy C4, lipazy esterazowej, fosfohydrolazy naftolowej, α -glukozydazy i N-acetylo- β -glukozaminidazy. Natomiast ze wzrostem MIC dla flukonazolu wzrasta aktywność aryamidazy leucynowej, aryamidazy cystynowej. Wraz ze wzrostem oporności na flukonazol wzrasta aktywność aryamidazy leucynowej i aryamidazy cystynowej, enzymów uczestniczących w metabolizmie białek, co może mieć znaczenie dla inwazyjności zbadanych szczepów. Szczepy *C. albicans* odporne na flukonazol w porównaniu ze szczepami wrażliwymi mają mniejszą aktywność esterazy, lipazy esterazowej, α -glukozydazy i fosfohydrolazy, enzymów hydrolitycznych biorących udział w metabolizmie komórkowym, co najprawdopodobniej może mieć znaczenie dla wzrostu oporności badanych szczepów.

Na zakończenie obrad prof. Ewa Małecka-Panas w imieniu Prezydium i uczestników podziękowała Komitetowi Organizacyjnemu za przygotowanie kolejnego Sympozjum, wskazując jednocześnie na potrzebę organizowania takich interdyscyplinarnych spotkań. Następnie, Przewodnicząca Łódzkiego Oddziału PTP, prof. Jolanta Kwaśniewska podziękowała wszystkim uczestnikom i zaprosiła na kolejny 48. Dzień Kliniczny Parazytologii Lekarskiej.

Anna Wójcik, Joanna Błaszowska
Zakład Biologii i Parazytologii Lekarskiej
Uniwersytet Medyczny, Łódź