

tolnych zwierząt wynika, że preparat ten zmniejszył u spryskiwanego pogłowia o 90,4% stopień zarażenia. Nie bez znaczenia dla masowego stosowania preparatu w terenie może mieć i ten fakt, że Dermaphos jest atoksyczny dla bydła i personelu przeprowadzającego zabiegi lecznicze czy profilaktyczne. Preparat stosowany w dużych nawet dawkach (270 mg na kg ciężaru ciała) nie powodował u leczonych zwierząt ani u ludzi zatrudnionych przy sprys-

kiwaniu jakichkolwiek objawów zatrucia.

Biorąc pod uwagę realne korzyści, jakie metoda spryskiwania może przynieść hodowli zwierząt, uważam, że powinna ona znaleźć powszechne zastosowanie w pierwszym rzędzie u jałownika i to na tych terenach, gdzie giez bydłęcy prawie z reguły występuje w dużej ilości.

Adres autora: dr Stanisław Patyk, Wrocław, ul. H. Sawickiej 5 m. 3.

KRYSTYNA WAWRZKIEWICZ

## Badania nad patogenizacją kandydiazy. II. Eksperymentalna kandydiaza u myszy

Katedra Mikrobiologii Wydziału Weterynarii WSR w Lublinie  
Kierownik: prof. dr T. JASTRZĘBSKI

Ogromna ilość prac opartych na obserwacjach klinicznych wskazuje na wzrastającą wagę problemu kandydiazy (4, 10, 12, 21), a w szczególności zagadnień związanych z patogenizacją schorzenia. Śledzenie sztucznych infekcji *C. albicans* u zwierząt doświadczalnych może w znacznym stopniu przyczynić się do postępu badań nad zagadnieniem patogenizacji tego schorzenia w ogóle.

Celem niniejszej pracy było prześledzenie procesu sztucznego, dootrzewnowego zakażenia myszy zjadliwym szczepem *C. albicans* z uwzględnieniem lokalizacji jakościowej i ilościowej zarazki, dynamiki procesu samooczyszczania się ustroju, oraz zmian morfologicznych jakim ulega *C. albicans* w zakażonym organizmie. Określono również procent śmiertelności zwierząt przy różnych dawkach zakażających i ustalono lokalizację grzyba w narządach padłych myszy w zależności od formy klinicznej schorzenia.

Dane z piśmiennictwa na temat lokalizacji grzyba przy sztucznym zakażeniu myszy nie są jednolite. Według Hurley i Winnera (7, 8) oraz Hurley (6) przy dożylnym zakażeniu myszek dawką 250 tys. do 4 mln komórek, miejscem lokalizacji zarazki są serce, mózg i nerki. Natomiast Kemp i Solotorovsky (11) stosując tę samą dawkę i sposób wprowadzenia *C. albicans* stwierdzili lokalizację grzyba w wątrobie, sercu i nerce, nie obserwowali go natomiast w mózgu. Obie grupy autorów nie wspominają przy tym wcale o lokalizacji *C. albicans* w trzustce, która wg Younga (25) jest obok nerek stałym miejscem lokalizacji zarazki przy dootrzewnowym podaniu. Uwidocznione rozbieżności zdań wśród autorów, jak również fakt, że następny etap pracy miał rozpatrywać wpływ pewnych preparatów na przebieg eksperymentalnej kandydiazy u myszy, spowodował podjęcie niniejszych badań.

### Materiał i metody

Badania przeprowadzone na białych myszach wagi ok. 20 g, które zakażano szczepem *C. albicans* nr 50 otrzymanym z Instytutu Gruźlicy w Warszawie. Zawiesinę grzyba podawano dootrzewnowo w dawce  $2 \times 10^8$  komórek na mysz; gęstość zawiesiny ustalano każdorazowo w hemocytometrze. Myszy zabijano sukcesywnie (po 3 sztuki) po 10 i 30 minutach, po 1, 2, 4, 16, 24 i 48 godzinach, oraz po 3, 5, 10 i 20 dniach do momentu zakażenia.

Od myszy tuż przed wykrwawieniem pobierano mocz, a w momencie wykrwawienia krew. Narządy myszy opłukiwano jałowym płynem fizjologicznym, a następnie homogenizaty wszystkich narządów mięsnych i mózgu, oraz próbki krwi i moczu wysiewano w ilości 0,1 ml na podłoże stałe Sabourauda. Posiewy inkubowano 48 godz. w 37°C po czym określano ilość kolonii grzyba. Testem filamentacji sprawdzano przynależność wyizolowanych grzybów do gatunku *C. albicans*. Równocześnie z posiewami wykonywano preparaty bezpośrednie z wszystkich badanych narządów celem określenia formy morfologicznej grzyba. Podobnie badano narządy myszy padłych, w wyniku zakażenia *C. albicans*.

### Wyniki i omówienia

Przeprowadzone badania wykazały bardzo szybkie rozprzestrzenienie się *C. albicans* w organizmie. Próbkę krwi i wszystkich badanych narządów pobrane w 10 minut po inokulacji dawały pozytywne hodowle grzyba, a po 30 minutach również próbki moczu.

Podobnie Kemp i Solotorovsky (11) stwierdzili po 10 minutach od chwili zakażenia obecność *C. albicans* w sercu, nerkach, wątrobie, śledzionie i płucach, przy czym śledziona i płuca były wg nich jałowe już w ciągu 16—24 godz. po infekcji.

Stopień zakażenia grzybem poszczególnych narządów myszy w różnym czasie po infekcji przedstawia tab. 1.

W tabeli nie uwzględniono danych odnośnie trzustki, ponieważ narząd ten był tak silnie zakażony grzybem, że przy standardowym rozcieńczeniu nie udało się dokładnie ustalić ilości zarazki. Najwyższą koncentrację komórek grzyba we wszystkich narządach z wyjątkiem nerek stwierdzono w okresie od 1—4

Tab. 1. Proces oczyszczania się narządów myszy zakażonych *Candida albicans* ( $2 \times 10^8$  komórek/szt i.p.).

Badany narząd	Czas badania po zakażeniu												Indeks narządowy bezwzględny w log	Indeks narządowy w odniesieniu do 1g tkanki	
	w godzinach														
	10	30	1	2	4	8	16	24	48	3	5	10			20
W tabeli celowo nie uwzględniono danych odnośnie trzustki - uzasadnienie w tekście															
Trzustka	10000	4000	4000	400000	400000	400000	4000	4000	4000	251	124	-	-	5,36	7,66
Śledziona	4000	233	257	40000	146	157	174	257	218	135	102	-	-	4,84	7,14
Wątroba	139	40000	4000	227	119	135	207	161	181	200	28	-	-	3,54	5,85
Nerka	18	50	57	127	71	16	67	48	13	15	2	-	-	3,54	5,84
Serce	35	72	47	110	110	27	30	39	14	10	3	-	-	1,57	3,87
Płuca	7	6	95	90	33	14	8	9	14	13	5	-	-	1,58	3,88
Mózg															
Indeks czasowy bezwzględny w log	3,87	3,87	3,15	4,87	4,82	3,63	2,87	2,88	2,87	2,01	1,64	0,0	0,0	1,35	3,65
Indeks czasowy w log w odniesieniu do 1g tkanki	6,17	6,17	5,45	7,17	7,12	6,13	5,17	5,18	5,17	4,32	3,94	0,0	0,0		

godzin po inokulacji. Najsilniej zakażone grzybem, w ciągu całego okresu infekcji były trzustka, śledziona i wątroba. Indeks narządowy w log w odniesieniu do 1 g tkanki wyniósł dla trzustki 8,0 śledziona 7,66 i dla wątroby 7,14. Znacznie słabiej zakażone były nerki (5,85) i serce (5,84); najniższe stężenie zarazka stwierdzono w płucach (3,87) i mózgu (3,88). We krwi i moczu grzyba nie stwierdzano już po 4 godzinach po infekcji, a pełne samooczyszczenie narządów występowało w okresie 10 dni od momentu wprowadzenia zarazka. Pakrywa się to z obserwacjami Winter i Foley (24) wg których nawet przy dawce  $8 \times 10^8$  *C. albicans* podanej i.p., u większości myszy zmiany w nerkach ulegały wygojeniu i nerki były wolne od zarazka w ciągu 10 dni po inokulacji. Najdłużej wysoka koncentracja zarazka utrzymywała się w trzustce ale i ten narząd uwalniał się od infekcji grzybiczej w okresie do 10 dni po inokulacji.

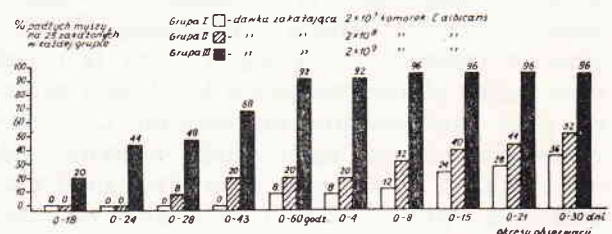
W preparatach bezpośrednich formy pączkujące grzyba obserwowano dopiero po 24 godzinach po zakażeniu. W preparatach z trzustki obecność *C. albicans* (w formie drożdżopodobnej lub wyjątkowo w postaci micelialnej) stwierdzano do 10 dnia po inokulacji, natomiast w innych narządach (wątroba, nerka i śledziona) do 5 dni. Wskazuje to, że w przypadkach podejrzenia kandydiazy przy rutynowym badaniu narządów mięsnych, należy zwracać szczególną uwagę na badanie trzustki.

Otrzymane wyniki dowodzą, że *C. albicans* wprowadzona dootrzewnowo u myszy posiada stosunkowo dużą inwazyjność umożliwiającą szybkie rozprzestrzenianie się zarazka w całym ustroju. Z drugiej zaś strony postępujące samooczyszczenie się ustroju pomimo znacznej dawki zakażającej i wstępnego namnażania się grzyba, wskazuje na aktywność działania sił obronnych ustroju, oraz niską patogenność zarazka. Mechanizm zwalczania infekcji nie jest całkowicie wyjaśniony. Wielu autorów przypisuje zasadniczą rolę układowi RES. Mashoff i Adam (17) podkreślają właściwości fagocytarne histiocytów w eliminacji z tkanek grzybów z rodzaju *Candida*. Louria, Fallon i Browne (16) tłumaczą szybki wzrost i namnażanie się *Candida* w świetle kanalików i kłębków nerkowych odizolowaniem grzyba od mechanizmów obronnych gospodarza. Obserwacje te znajdują uzupełnienie w badaniach Louria i Brayton (15), którzy wykazali *in vitro* że leukocyty normalnej surowicy ludzkiej fagocytują komórki *C. albicans*, oraz Hill i Gebhardt (5) którzy zaobserwowali różne stadia zwyrodnienia komórek grzybów drożdżopodobnych wewnątrz fagocytów.

Rolę układu fagocytarnego w zwalczaniu infekcji *C. albicans* potwierdzają także doniesienia kliniczne. Bybee i Rogers (2) donoszą o ostrych infekcjach *C. albicans* u pacjentów z obniżoną aktywnością fagocytarną w wyniku cukrzycy, Rankin (18) w wyniku chorób wątroby, a Braude i wsp. (1), oraz Jersild (9) w wyniku nowotworów układu siateczkowo-śródbłonkowego. Sielicka (22) kwestionuje pogląd o skuteczności fagocytozy jako mechanizmu obronnego w przypadku kandydiazy, stwierdziła bowiem że fagocytoza *in vitro* szczepów chorobotwórczych *C. albicans* jest stosunkowo niska i znacznie słabsza aniżeli szczepów niechorobotwórczych. Autorka w badaniach swoich stosowała surowicę końską i króliczą, podczas gdy Louria i Brayton oraz Hill i Gebhardt posługiwali się surowicą ludzką, co mogło wpłynąć na rozbieżność wyników a tym samym i poglądów na rolę fagocytozy w kandydiazie.

Oprócz fagocytozy, pewne znaczenie w zwalczaniu infekcji *C. albicans* posiadają humoralne i inne mechanizmy obronne ustroju. Silne działanie fungistatyczne *in vitro* posiada np. normalna surowica (3, 14, 19, 20), płyn jamy brzusznej (23), oraz wyciągi błon śluzowych spojówek (13).

Kolejny etap badań miał na celu określenie stopnia śmiertelności myszy w zależności od dawki zakażającej grzyba, oraz ustalenie lokalizacji zarazka w narządach padłych zwierząt przy różnych formach klinicznych schorzenia. Stwierdzono, że grzyb podany i.p. myszom w dawce  $2 \times 10^7$  komórek wywołuje w ciągu 30 dni obserwacji zejście śmiertelne zaledwie 36% zwierząt (rys. 1), przy czym myszy zaczynają padać dopiero trzeciego dnia po za-

Rys. 1. Śmiertelność myszy zakażonych i.p. *C. albicans* w zależności od dawki zakażającej.



każeniu. Zwiększenie dawki o 1 log przyspiesza nieco czas padania zwierząt i zwiększa odsetek zejść śmiertelnych do 52% (w okresie 30-dniowej obserwacji). *C. albicans* w dawce  $2 \times 10^9$  komórek powoduje ostry przebieg schorzenia u myszy, a śmiertelność osiąga blisko 100% w ciągu trzech dni po zakażeniu.

Na podstawie otrzymanych wyników można wnioskować, że podany szczep *C. albicans* posiada stosunkowo znaczną inwazyjność a niską patogenność, co biorąc pod uwagę dane z piśmiennictwa (11, 24, 25) wydaje się być właściwością większości szczepów *C. albicans*. U myszek padłych w wyniku zakażenia *C. albicans* stwierdzono istniejącą zależność pomiędzy lokalizacją grzyba w narządach a formą kliniczną kandydiazy.

U myszy (60 sztuk) padłych na postać ostrą tj. w ciągu trzech pierwszych dni po zakażeniu, grzyb izolowano ze wszystkich narządów mięsowych i mózgu, przy czym najliczniej występował on w trzustce i śledzionie.

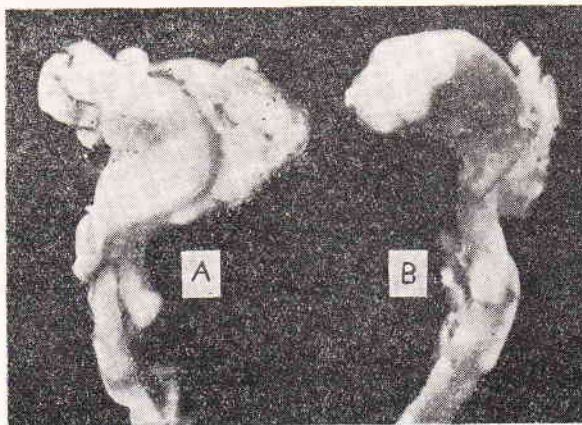
Makroskopowo stwierdzano kilkakrotne powiększenie trzustki i często naloty na śledzionie i nerkach.

W preparatach bezpośrednich z narządów obserwowano głównie postać drożdżopodobną, rzadziej formę micelialną grzyba.

Wyniki pozytywne uzyskiwano przy rozmazie ewentualnie posiewie całego narządu. W tym okresie grzyb rozsiany był w całym mięszu narządu i nie obserwowano jeszcze ukształtowanych zmian miejscowych.

W postaci podostrej myszy (30 sztuk) padały w okresie od trzech dni do dwóch tygodni, a grzyb izolowano głównie z trzustki i śledziony, oraz w niewielkich ilościach z nerek, wątroby i mózgu. Serce i płuca niekiedy już zupełnie nie zawierały grzyba.

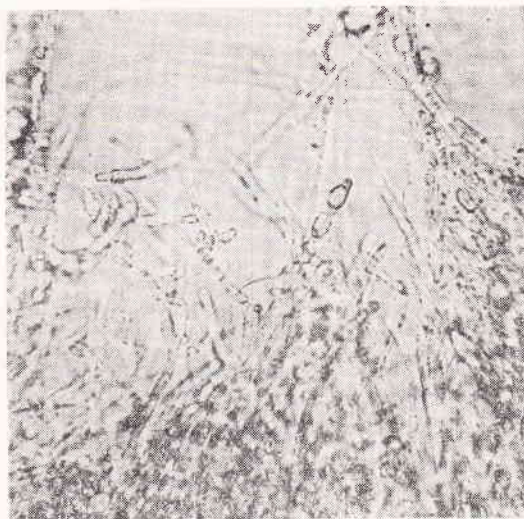
Zmiany makroskopowe w postaci ognisk obserwowano najczęściej w śledzionie, wątrobie (fot. 1) i nerkach. Trzustka i w tym przy-



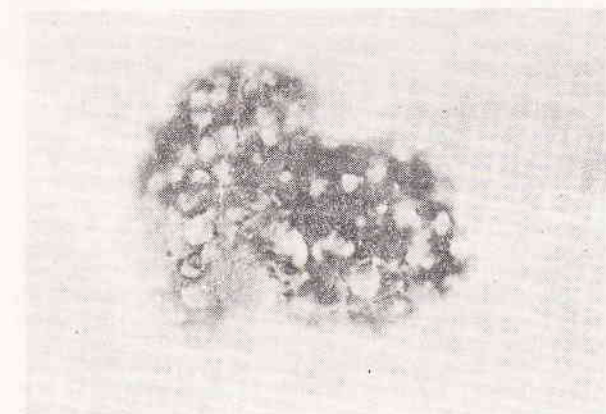
Fot. 2. Porównanie wielkości trzustki myszy padłej (po 10 dniach) w wyniku dootrzewnowej iniekcji *C. albicans* i myszy zdrowej.

A — trzustka myszy zakażonej *C. albicans*  
B — kontrola.

śmierć następowała między drugim a czwartym tygodniem po zakażeniu, głównym i najczęściej jedynym narządem zawierającym *C. albicans* były nerkki (15 badanych myszek). Grzyb stwierdzano w posiewach i preparatach bezpośrednich jedynie z miejsc chorobowo zmienionych, przy czym w preparatach przeważała zdecydowanie forma micelialna (fot.3).



Fot. 3. Forma micelialna *C. albicans* w nerce myszy padłej (po 17 dniach) w wyniku dootrzewnowej iniekcji grzyba. Preparat odciskowy, niebarwiony, pow. ok. 450 X.



Fot. 1. Wątroba myszy padłej po 8 dniach po dootrzewnowym zakażeniu *C. albicans*. Widoczne zmiany w postaci białych, twardych guzków zawierających komórki *C. albicans*.

padku była wielokrotnie powiększona (fot. 2) Formę micelialną grzyba stwierdzano głównie na preparatach z trzustki, rzadziej ze śledziony i nerek. Preparaty z innych narządów wykazywały obecność tylko formy drożdżopodobnej.

Przy formie chronicznej kandydiazy, tj. gdy

Również Hurley i Winner (7), Young (25) oraz Hurley (6) wskazują zgodnie na nerkki jako zasadnicze miejsce lokalizacji grzyba przy przewlekłej kandydiazie. Zasluguje na podkreślenie fakt, że zarówno przy formie ostrej jak i podostrej najwyższe stężenie zarazka stwierdzano w trzustce. Stężenie to było przeciętnie o 2—4 log wyższe niż w innych narządach. Przy uwalnianiu się ustroju myszy od flory grzybiczej, również trzustka była tym narządem, który oczyszczał się stosunkowo późno. W związku z tym wydaje się, że słusznym było by uważać trzustkę za główne miej-

sce lokalizacji *C. albicans* u myszy w przypadku ostrej lub podostrej infekcji, podobnie jak nerki w przypadkach chronicznych.

### Wnioski

1. Po dootrzewnowym zakażeniu myszy zjadliwym szczepem *C. albicans* w dawce  $2 \times 10^8$  komórek, grzyb można izolować z krwi i wszystkich narządów wewnętrznych już po 10 minutach po inokulacji, przy czym krew i mocz zakażonych zwierząt nie wykazują już obecności grzyba po 4 godzinach po zakażeniu, a narządy wewnętrzne po 10 dniach.

2. Najwyższe stężenia grzyba stwierdza się w trzustce, śledzionie i wątrobie, znacznie niższe w nerkach i sercu, a najmniejsze ilości zarazka obserwuje się w płucach i mózgu.

3. Szczep *C. albicans* nr 50 podany i. p. myszom w dawce  $2 \times 10^7$  komórek wywołuje w okresie 30 dni obserwacji zejście śmiertelne 36% zwierząt, przy dawce  $2 \times 10^8$  — 52% zwierząt, przy dawce  $2 \times 10^9$  śmiertelność myszy sięga blisko 100%. Szczep ten posiada znaczną inwazyjność, a stosunkowo niską patogenność.

4. Wykazano zależność pomiędzy lokalizacją *C. albicans* w narządach padłych myszy a formą kliniczną kandydiazy: przy formie ostrej zajęte są wszystkie narządy mięszkowe i mózg, a najwyższe stężenie grzyba stwierdza się w trzustce i śledzionie; przy formie podostrej grzyb izoluje się głównie z trzustki i śledziony; serce i płuca są niekiedy już zupełnie pozbawione flory grzybiczej; przy formie chronicznej, miejscem lokalizacji są nerki.

### Piśmiennictwo

1. Braude A., Feltes J., Brooks M.: J. Clin. Invest. 33, 1036, 1954.
2. Bybee J., Rogers D.: J. Lab. Clin. Med. 64, 1, 1964.
3. Caroline L. i wsp.: J. Invest. Derm. 42, 415, 1964.
4. Hauke H., Kielstein P., Johanning R., Gentch E.: Mh. Vetmed. 22, 647, 1967.
5. Hill D., Cebhardt L.: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 92, 640, 1956.
6. Hurley R.: J. Path. Bact. 92, 57, 1966.
7. Hurley R., Winner H.: J. Path. Bact. 86, 75, 1963.
8. Hurley R., Winner H.: Mycol. Mycol. Appl. 24, 337, 1964.
9. Jersild M.: Acta Med. Scand. 131 (Suppl. 213) 238, 1948.
10. Kashkin P., Krassilnicov N., Nekachalov V.: Mycopat. Mycol. Appl. 14, 173, 1961.
11. Kemp G., Solotorovsky M.: J. Immunol. 89, 777, 1962.
12. Kozinn P., Taschdjan C.: J.A.M.A. 198, 190, 1966.
13. Kozinn P., Caroline L., Taschdjan C.: Science 146, 1779, 1964.
14. Louria D., Brayton R.: Nature 201, 309, 1964.
15. Louria D., Brayton R.: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 115, 93, 1964.
16. Louria D., Fallon N., Browne H.: J. Clin. Invest. 39, 1435, 1960.
17. Masshoff W., Adam W.: Arch. Klin. Exptl. Derm. 204, 416, 1957.
18. Rankin J.: Med. Clin. Am. 47, 737, 1963.
19. Roth F., Goldstein M.: J. Invest. Derm. 36, 383, 1931.
20. Roth F., Boyd C., Sagami S., Blank H.: J. Invest. Derm. 32, 549, 1959.
21. Seelig M.: Bact. Rev. 30, 442, 1966.
22. Sieticka B.: Patologia Polska 11, 369, 1960.

23. Sumners D., Hasenclever H.: J. Bact. 87, 1, 1964.
24. Winter W., Foley G.: J. Infect. Dis. 98, 150, 1956.
25. Young G.: J. Infect. Dis. 120/2, 114, 1958.

Adres autora: dr Krystyna Wawrzekiewicz, Lublin, ul. Akademicka 11.

Бавжкевич К. — Исследования по патогенезу кандидиаза. II. Экспериментальный кандидиаз у мышей.

Мыши инфицировали грибом *Candida albicans* ( $2 \times 10^8$  клеток), а потом обескровливали в 10 мин., 30 мин., 1, 2, 4, 16, 24 и 48 часов, 3, 5, 10 и 20 дней после инокуляции (п. и.). Пробы мочи, крови, паренхиматозных органов и головного мозга посевали на среду по Sabouraud и определяли степень заражения грибом. *Candida albicans* изолировали уже в 10 мин. п. и. при чем кровь и моча инфицированных животных не оказывали присутствия гриба уже в 4 часа п. и., а внутренние органы в 10 дней п. и. Самую высокую концентрацию *Candida albicans* установили в поджелудочной железе, в селезенке и в печени, значительно менее высокую в почках и в сердце, а самую низкую в легких и в головном мозгу. Высокая концентрация *Candida albicans* больше всего держалась в поджелудочной железе. В непосредственных препаратах из поджелудочной железы наблюдали чаще всего формы с почками, а только в виде исключения — мицелиальные. В связи с этими наблюдениями в случаях подозрения на кандидиаз при рутинном исследовании паренхиматозных органов специальное внимание надо обратить на исследование поджелудочной железы.

Установили также что штамм *Candida albicans* № 50 введенный мышам интраперитонеально в дозе  $2 \times 10^7$  клеток вызывает в период 30 дней наблюдения смертельный исход у 36%, в дозе  $2 \times 10^8$  у 52% и в дозе  $2 \times 10^9$  почти у 100% мышей. Штамм имеет относительно невысокую патогенность при большой инвазивности. Установили тоже связь между локализацией *Candida albicans* в органах павших мышей а клинической формой кандидиаза.

Wawrzekiewicz K. — Investigations on the pathogenesis of candidiasis. II. Experimental candidiasis in mice.

Mice were infected with  $2 \times 10^8$  cells of *C. albicans* and then were bled after 10 and 30 minutes, 1, 2, 4, 16, 24 and 48 hours, and 3, 5, 10 and 20 days since infection. The samples of urine, blood, internal organs and brain were inoculated on Sabouraud's media and there was estimated the number of *C. albicans*. The fungus was isolated from blood and all internal organs as soon as 10 minutes since infection, but blood and urea of the infected animals became free from the fungus after 4 hours and the internal organs after 10 days since inoculation. The highest concentration of the fungus was found in pancreas, spleen and liver; lower numbers of *C. albicans* were noted in kidneys and heart, and the lowest ones in lungs and brain. High concentration of the fungus persisted for the longest period in pancreas. The presence of yeast forms of the fungus (exceptionally micellium form) the most often were found in direct preparations from pancreas. Therefore, it is important to examine also pancreas if there is any suspicion of candidiasis. It was found that the strain Nr 50 of *C. albicans* injected intraperitoneally into mice resulted in the death of the mice up to 100% at the dosis  $2 \times 10^9$ , 52% at  $2 \times 10^8$  and 36% at  $2 \times 10^7$  within 30 days of observation. So, it seems to be right to accept that although the strain was low-pathogenic but its invasionity was remarkable. It was estimated the dependence between the localization of *C. albicans* in internal organs of the mice and the clinical form of candidiasis.