

46. Dzień Kliniczny Parazytologii Lekarskiej „Inwazje grzybami i pasożytami u pacjentów onkologicznych oraz inne zagadnienia mikologii i parazytologii”

46. Day of Medical Parasitology „Invasive fungal and parasitic infections in oncological patients and other problems concerning mycology and parasitology”

46. Dzień Kliniczny Parazytologii Lekarskiej odbył się 20 kwietnia 2007 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 „Inwazje grzybami i pasożytami u pacjentów onkologicznych oraz inne zagadnienia mikologii i parazytologii”. Program Dnia Klinicznego obejmował 26 referatów i doniesień. Obrady otworzyła Przewodnicząca ŁO Polskiego Towarzystwa Parazytologicznego — prof. dr hab. Jolanta Kwaśniewska — witając serdecznie wszystkich przybyłych.

Pierwszą część obrad, której przewodniczyli Profesorowie: Alicja Chybicka, Maria Dynowska, Krzysztof Lewandowski i Teresa Woźniakowska-Gęsicka, rozpoczęła prezentacja dotycząca zakażeń grzybiczych u dzieci chorych na nowotwory (prof. A. Chybicka, AM, Wrocław). Częstość zachorowań na nowotwory wynosi u dzieci 1200 przypadków na rok. Nowotwory pojawiają się w każdym wieku i są statystycznie drugą — po wypadkach, urazach i zatruciach, a pierwszą wśród chorób — przyczyną zgonów dzieci. Zakażenia (wirusowe, bakteryj-

ne, grzybicze, pierwotniakowe i mieszane) są z kolei przyczyną 30% zgonów u pacjentów z nowotworami. Wzrost częstości grzybic wiąże się z zaburzeniami odporności i zwiększoną liczbą stosowanych inwazyjnych procedur medycznych. Autorka omówiła kryteria rozpoznania zarażenia grzybiczego, metody diagnostyczne stosowane w kandydozie układowej, leki, profilaktykę przeciwgrzybiczą oraz terapię empiryczną pacjentów z neutropenią, kandydozą wątroby i śledziony, kandydemią i aspergilozą. Przedstawiła także doświadczenia własne w diagnostyce i leczeniu grzybic u pacjentów Kliniki Transplantacji Szpiku, Onkologii i Hematologii Dziecięcej.

W następnym wystąpieniu dotyczącym grzybic w praktyce hematologicznej prof. K. Lewandowski (UM, Poznań) zwrócił uwagę na fakt, że z ok. 200 gatunków patogennych dla człowieka, tylko nieliczne grzyby wywołują choroby u zdrowych osób. W ostatnich dekadach XX. wieku pojawiły się nowe, lub uprzednio rzadkie grzybice, nastąpił wzrost zachorowań i śmiertelności, pojawiły się szczepy grzybów odporne na leki. Ryzyko infekcji grzybiczej u chorych z nowotworami wynika z uszkodzenia układu immunologicznego wskutek chemioterapii, radioterapii, stosowania kortykosteroidów, niedożywienia oraz z nieimmunologicznych czynników ryzyka: stosowania szerokowidmowych antybiotyków przeciwbakteryj-

nych, zabiegów chirurgicznych, uszkodzenia błon śluzowych podczas chemioterapii. Chorzy po SCT (steam cell therapy) podlegają szczególnie wysokiemu ryzyku infekcji grzybiczej: kandydoza pojawia się u 12% pacjentów, śmiertelność przez nią spowodowana wynosi 25%. Natomiast aspergiloza (główna przyczyną zgonów po allo-BMT) występuje z częstością 11% i śmiertelnością aż 95%. Najczęstsze patogeny oportunistyczne wykrywane u pacjentów z neutropenią i po SCT to *Candida albicans* i inne gatunki rodzaju *Candida* (*C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*) oraz *Aspergillus fumigatus*. Obserwuje się narastającą prewalencję nowych patogenów: gatunków rodzaju *Aspergillus* innych niż *A. fumigatus*, *Fusarium*, *Trichosporon*, *Acremonium*, *Scedosporium*, a także gatunków należących do Zygomycetes i pleśni *Dematiaceous*. Aby zmniejszyć ryzyko infekcji po SCT konieczne jest ograniczenie możliwości ekspozycji na grzyby (unikanie pomieszczeń poddawanych rekonstrukcji lub renowacji, sale z HEPA filtracją, mycie rąk, dekontaminacja lub dezynfekcja żywności, unikanie żywności zanieczyszczonej grzybami, unikanie przebywania w ogrodach, na budowach) oraz stosowanie profilaktycznych leków przeciwgrzybiczych i modulacja mechanizmów odpornościowych gospodarza. Autor omówił także kontrowersje związane z koncepcją leczenia wyprzedzającego (pre-emptive) — profilaktycznego stosowania środków przeciwgrzybiczych (pierwotnej chemioprophylaktyki przeciwgrzybiczej — PAC). Zwrócił uwagę na wywołaną stosowaniem PAC selekcję patogenów grzybiczych u chorych wysokiego ryzyka. Empiryczna terapia przeciwgrzybicza w przypadku podejrzenia inwazyjnej infekcji grzybiczej jest standardem u chorych z nowotworami w okresie neutropenii, stale gorączkujących pomimo antybiotykoterapii. W związku z wprowadzeniem nowych leków i strategii postępowania istnieje potrzeba opracowania nowych wytycznych leczenia grzybic.

”Inwazyjne grzyby — narastający problem w leczeniu onkologicznym dzieci” to temat wystąpienia zespołu Kliniki Chorób Dzieci i Kate-

dry Pediatrii UM w Łodzi (dr M. Stolarska, dr N. Adrianowska, prof. J. Bodalski). Omówiono sytuacje, w których występuje największe ryzyko inwazyjnego zarażenia drożdżami i grzybami pleśniowymi u chorych onkologicznych, a także diagnostykę, objawy kliniczne inwazyjnej kandydozy i aspergilozy oraz przypadki grzybic u dzieci z potwierdzoną chorobą nowotworową leczonych w Klinice w latach 1992-2006 (wśród 715 dzieci u 13 wystąpiły inwazyjne grzyby, przeżyło 5 dzieci).

Autorki z Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego (Olsztyn) — prof. M. Dynowska i mgr K. Góralska — przedstawiły doniesienie dotyczące spektrum taksonomicznego i wybranych właściwości grzybów wyizolowanych z różnych ontocenoz pacjentów onkologicznych (rak płuc i rak krtani) oraz chorych na POChP i gruźlicę. Wskazały, że coraz więcej gatunków grzybów ujawnia zakodowany ewolucyjnie potencjał patogeniczności. Monitoring mikologiczny powinien stać się standardem, aby uchwycić kierunek zmian zachodzących w strukturze i charakterystyce biologicznej spektrum etiologicznego szeregu grzybic, szczególnie niebezpiecznych dla pacjentów onkologicznych.

W następnym referacie prof. H. Batura-Gabryel i dr B. Brajer (UM, Poznań) omówiły występowanie gatunków *Candida* u chorych na raka płuc. Zarażeniu grzybami sprzyjają czynniki jatrogenne, immunologiczne i zależne bezpośrednio od osoby chorej (stan odżywienia, protezy zębowe, nałogi, zakażenia współistniejące). Badania wykazały u chorych na raka płuc bardzo wysoką gęstość grzybów w płwocinie (ok. 2 mln 500 kolonii/1ml wobec 700 u zdrowych). U osób zdrowych stwierdzano jedynie *C. albicans*, natomiast u chorych z nowotworem płuc gatunek ten stanowił 80,6% izolatów; pozostałe gatunki to *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. parapsilosis* i *C. lusitaniae*. U ponad 59% chorych na raka płuc występowały inwazje wieloogoniskowe.

Pracownicy Kliniki Chorób Dzieci, I Katedry Pediatrii, UM Łódź (dr A. Szczepaniak-Kubat, dr M. Bulas, doc. W. Młynarski) przedstawili

dwa przypadki pacjentów z zespołem Nijmegen, u których rozwinęły się grzybice układowe. Zespół, wynikający z nieprawidłowych mechanizmów naprawy DNA, powodujący zwiększone ryzyko chorób limfoproliferacyjnych oraz zaburzenia odporności komórkowej i humoralnej, dotyczy głównie populacji słowiańskiej. W pierwszym omawianym przypadku (dziewczynka, lat 5), po nagłym pogorszeniu podczas leczenia choroby podstawowej, uzyskano dodatni posiew krwi i oznaczono gatunek — *C. krusei*. Zastosowano amfoterycynę B, jednak nastąpił zgon w przebiegu posocznicy grzybiczej. W drugim przypadku, (dziewczynka, lat 18), po zakończeniu intensywnej chemioterapii, pojawiły się silne bóle głowy, bez związku z pozycją ciała i porą dnia. Po wielu badaniach, dopiero jakościowe wykrywanie DNA grzybiczego w materiale klinicznym metodą PCR w surowicy i płynie mózgowo-rdzeniowym, dało wynik wskazujący na obecność *Aspergillus* sp. Terapia przeciwgrzybicza (amfoterycyna i 5-fluorocytozyna, a następnie: worykonazol i 5-fluorocytozyna) spowodowała poprawę stanu klinicznego i ustąpienie objawów neurologicznych.

W wystąpieniu „Aspergiloza — stan zagrożenia życia u pacjentów z neutropenią — doświadczenia własne” (dr J. Trelińska, dr F. Pierlejewski, dr B. Zalewska-Szewczyk, UM Łódź) przedstawiono 2 przypadki pacjentek z ostrą białaczką limfoblastyczną. U jednej z nich stwierdzono grzyby z rodzaju *Candida* w posiewach z gardła i owrzodzenia w pachwinie; nigdy nie stwierdzono fungemii. Pacjentka ta zmarła w wyniku pęknięcia aorty, której ściana została zniszczona przez toczący się proces grzybiczy — w obrazie mikroskopowym widoczne były liczne kolonie *Aspergillus* sp., a w miejscu pęknięcia wśród skrzepów wykryto fragmenty grzybni. U drugiej z pacjentek narastały objawy zapalenia płuc i opłucnej, jednak badania bakteriologiczne i mikologiczne były ujemne. W badaniu RTG i CT rozpoznano aspergilomę, co potwierdził późniejszy dodatni wynik diagnostyki w kierunku *Aspergillus* metodą PCR.

Profilaktyka i leczenie grzybic u dzieci z chorobą nowotworową były tematem wystąpienia prof. E. Zielińskiej (UM Łódź). Autorka przypomniała objawy kliniczne rozsianego zarażenia grzybiczego i kliniczne wskazówki do rozpoznania grzybic narządowych. Przedstawiła nowe kierunki diagnozy fungemii — wykrywanie obecności komponentów ściany komórkowej, antygenów cytoplazmatycznych, metabolitów, badanie sekwencji DNA, a także powikłania profilaktyki lekami z grupy związków azolowych i koncepcje empirycznej terapii przeciwgrzybiczej. Podkreśliła, że leczenie prawdopodobnej lub udowodnionej inwazji grzybami wciąż obciążone jest dużym ryzykiem niepowodzenia.

W kolejnej prezentacji mgr E. Ochman (Centrum Onkologii, Warszawa), omawiając czynniki etiologiczne zarażeń grzybiczych u pacjentów podkreśliła, że diagnostyka mikologiczna jest sztuką interpretacji uzyskanych wyników posiewów materiału klinicznego w kierunku grzybów. Organizmy te są obecne na skórze, błonach śluzowych, czy w przewodzie pokarmowym i nie każde ich wyhodowanie z materiału od pacjentów oznacza grzybicę. Może to być przejściowa kolonizacja. Uzyskanie grzybów w posiewie z moczu może świadczyć o zanieczyszczeniu mikroorganizmami z okolicy odbytu, pochwy czy spod napletka. Niektóre gatunki mogą stanowić zanieczyszczenia z pokarmu (gatunki z rodzajów: *Mucor*, *Geotrichum*, *Penicillium*, *Aspergillus*). Badania mikologiczne należy powtarzać kilkakrotnie, analizować dynamikę zmian w kolejnych posiewach. Podstawą diagnostyki jest prawidłowe pobranie materiału klinicznego, a także właściwa interpretacja liczby uzyskanych kolonii.

Grzyby kontaminujące protezy głosowe u chorych po całkowitym usunięciu krtani — to temat wystąpienia mgr M. Borek, prof. P. Kuratowskiego, prof. A. Morawiec i dr J. Nowickiej (UM Łódź). Oceniając prewalencję grzybów na silikonowych protezach głosowych wyizolowano 100 szczepów grzybów od 41 osób. Były to szczepy: *C. albicans* — 35%, *C. krusei*

— 18%, *C. glabrata* — 15%, *C. tropicalis* — 15%, *C. kefyr* — 7%, *C. famata* — 3%, *C. guilliermondii* — 1%. Na powierzchni protezy głosowej grzyby tworzą biofilm, co niekorzystnie wpływa na napięcie zastawki i może powodować konieczność częstej jej wymiany z powodu przeciekania płynów oraz pożywienia do dróg oddechowych. Większość szczepów *C. albicans* wykazywała oporność w stosunku do zbadanych leków przeciwgrzybiczych (flukonazol — 67%, ketokonazol — 94%, nystatyna — 81%); jedynie na itraconazol 3% szczepów było opornych. Podobnie szczepy *C. krusei* i *C. glabrata* charakteryzowała oporność w stosunku do zbadanych leków przeciwgrzybiczych (odpowiednio 94% i 100% opornych na flukonazol, 56% i 94% — na itraconazol, 83% i 94% — na ketokonazol i 83% i 56% — na nystatynę).

Omawiając strategię leczenia i zapobiegania inwazyjnym grzybicom prof. P. Kurnatowski i dr M. Kurnatowski (UM, Łódź) zwrócili uwagę na leczenie empiryczne, czyli włączenie lub modyfikację leczenia przeciwgrzybiczego, najczęściej stosowane u pacjentów z neutropenią bądź gorączkującego bez ustalonej przyczyny przez okres 72–168 godzin (pomimo stosowania szerokowidmowych antybiotyków przeciwbakteryjnych). Grupę wysokiego ryzyka stanowią pacjenci z kolonizacją wieloogniskową, obniżoną liczbą neutrofilii ($0.1 - 0.5 \times 10^9/L$), poddawani radioterapii, z ostrą białaczką szpikową, biorcy szpiku, poddawani chemioterapii w ostrej białaczce, z neutropenią ($< 0.1 \times 10^9/L$), kolonizacją wywołaną przez *Candida tropicalis*, z objawami odrzucenia przeszczepu, leczeni przez okres powyżej 1 tygodnia kortykosteroidami w dawce $> 1\text{mg/kg}$ i liczbą neutrofilii $< 1 \times 10^9/L$, otrzymujący kortykosteroidy przez okres powyżej 2 tygodni w dawce wyższej niż 2 mg/kg.

W ostatnim wystąpieniu części pierwszej dr M. Wiśniewska-Lis, przedstawicielka firmy Pfizer (Polska), omówiła miejsce worykonazolu (VFEND) w terapii inwazyjnych zarażeń grzybiczych. Preparat ten wykazuje wyższą skuteczność wobec gatunków z rodzaju *Asper-*

gillus spp. w porównaniu z amfoterycyną oraz daje wyższy odsetek przeżycia w inwazyjnej aspergiliozie w porównaniu z amfoterycyną. Uznany jest za pierwszą linię leczenia kandydemii u pacjentów bez neutropenii, wykazuje aktywność zarówno wobec szczepów *C. albicans*, jak i innych gatunków z tego rodzaju, jest jedynym lekiem zalecanym w terapii ciężkich zakażeń szczepami *Fusarium* i *Scedosporium*. Występuje w wygodnych postaciach (i.v./ p.o.); jego stosowanie jest korzystne ekonomicznie — krótsza hospitalizacja pacjentów (którzy przeżyli) w OIOM w porównaniu z konwencjonalną amfoterycyną B. W ogólnosiątkowym porównawczym badaniu kandydemii (Global Comparative Candidaemia Study GCCS) stwierdzono, że VFEND powoduje mniejszą liczbę działań niepożądanych związanych z leczeniem; jedynie u 4% pacjentów leczonych lekiem VFEND odnotowano zaburzenia widzenia.

Drugiej części obrad przewodniczyli Profesorowie: Henryka Długońska (UŁ, Łódź), Bożena Moskwa (PAN, Warszawa) i Izabela Płaneta-Malecka (ICZMP, Łódź). Pierwszy wykład poświęcony był zjawisku apoptozy w pasożytach (dr T. W. Łapiński, prof. D. Prokopowicz — AM, Białystok). Autorzy podkreślili, że aktualnie prowadzone badania wskazują na dużą rolę procesów apoptozy w rozwoju chorób pasożytniczych, procesach tolerancji pasożytów przez organizm, a także aktywacji programowanej śmierci w komórkach pasożytniczych. Obrona pasożytów przed zniszczeniem polega m. in. na pobudzeniu apoptozy w monocytach i makrofagach. W ostrym okresie zarażenia dochodzi do aktywacji apoptozy w limfocytach T i komórkach fagocytarnych, co zmniejsza możliwości skutecznej obrony organizmu. W późnym, przewlekłym okresie pasożytozy występuje hamowanie apoptozy poprzez stymulację modulatorów supresyjnych (Bcl-2) hamujących kaskadowe reakcje kaspaz. Zmniejsza się prezentacja antygenów na komórce, co wpływa na utrudnienie rozpoznania komórek zarażonych i ich usuwanie. Stwierdzono, że *Entamoeba histolytica*, *Acanthamoeba* sp. i *Naegleria gruberi* w okresie przylegania do ko-

mórek pobudzają ich receptory programowanej śmierci. Po wchłonięciu pełzaków przez neutrofile dochodzi do aktywacji cytoplazmatycznych aktywatorów apoptozy, co hamuje mechanizmy obronne żywiciela. *Giardia intestinalis*, w komórkach wyściełających ściany dróg żółciowych, pobudza błonowe receptory śmierci, co aktywuje kaspazę 3 i uruchamia kaskadową reakcję pobudzenia innych kaspaz. *T. vaginalis* w komórkach epithelialnych i neutrofilach pobudza syntezę proteazy cysteinowej, czynnika będącego aktywatorem apoptozy. Pasożyt ten hamuje aktywność białek Bcl-2 i Bcl-x (inhibitory apoptozy). Autorzy podkreślili, że zagadnienie wpływu pasożytów na procesy programowanej śmierci komórek żywiciela stanowi nowy kierunek badań, który pozwoli na lepsze zrozumienie patogenezy chorób pasożytniczych oraz stworzy możliwość wprowadzenia nowych metod terapeutycznych.

W kolejnym referacie prof. H. Długońska (UŁ, Łódź) przedstawiła sabotaż odpowiedzi immunologicznej przez pasożytnicze pierwotniaki (*Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii*). Zwróciła uwagę na ważną rolę w aktywności przeciw pasożytniczej żywiciela makrofagów, które fagocytozują, zabijają wewnątrzkomórkowo (reaktywne formy tlenu i azotu), ograniczają pulę żelaza i niezbędnych aminokwasów, wytwarzają prozapalne cytokiny oraz hamują prezentację antygenów pasożyta. Autorka podkreśliła, że nieskuteczne reakcje odpornościowe żywiciela związane są ze zjawiskami: uniku odpornościowego, wycisku molekularnego lub molekularnego piractwa stosowanego przez pasożyta. Obszernie przedstawiła strategię inwazji i przeżycia pasożytów wewnątrzkomórkowych (*Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania* spp.). Obecnie wiadomo, że gatunki z rodzaju *Leishmania* hamują powstanie fagolizosomu i hamują apoptozę, wywołują zmianę makrocząsteczek powierzchniowych (m.in. fosfolipazy), wychwytyują wolny tlen, hamują ekspresję antygenów MHC oraz transkrypcję genu IL-12. Przeżycie pasożytów w makrofagach opiera się na interferencji ze szlakami przekazywania sygnału pro-

zapalnego, zależnie od rodzaju wewnątrzkomórkowej niszy pasożyta. Potencjalne bezpośrednie mechanizmy interferencji polegają na wydzielaniu do cytoplazmy komórki żywiciela czynników pasożyta hamujących apoptozę (IAP) lub manipulowaniu mitochondriami związanymi z PVM (błoną wakuoli pasożytniczej). Natomiast pośrednie mechanizmy opierają się na hamowaniu (w tym uwalnianiu cytochromu c do cytoplazmy) lub indukcji (NFkB-indukcja transkrypcji genów docelowych) „maszynerii proapoptotycznej”.

Tematem kolejnego referatu było zastosowanie metody qPCR w diagnostyce toksoplazmozy (doc. D. Nowakowska — ICZMP, Łódź). Zwrócono uwagę na fakt, że zachorowalność na toksoplazmozę w ciąży wynosi 5 na 1000 kobiet ciężarnych, natomiast zachorowalność na toksoplazmozę wrodzoną mieści się w zakresie od 1,5 na 1000 do 2 na 1000 noworodków. *T. gondii* typu II jest przyczyną toksoplazmozy wrodzonej w Polsce; w większości przypadków (90%) genotyp II pasożyta wykrywa się w ciężkich postaciach toksoplazmozy wrodzonej. Trudności diagnostyczne zarażenia *T. gondii* skłaniają do stosowania coraz czulszych metod molekularnych, takich m.in. jak *multiplex nested PCR*, PCR z genem B1 *T. gondii*, qPCR. Stosując ilościowy PCR (qPCR) zbadano związek między nasileniem parazytemii ocenianej na podstawie liczby kopii powtarzalnego fragmentu DNA *T. gondii* (zawierającego 529 bp) w próbkach płynów owodniowych i płynów mózgowo-rdzeniowych noworodków a objawami toksoplazmozy. Stwierdzono istotny związek pomiędzy wysoką liczbą powtarzalnego fragmentu DNA pasożyta a zgonem, powiększeniem wątroby i śledziony. Ilościowy PCR stanowi niezwykle przydatną metodę diagnostyczną umożliwiającą szybką weryfikację zarażenia ciężarnej oraz wyodrębnienie noworodków z grupy ryzyka infekcji wewnątrzmacicznej. Szybkość oznaczeń, wysoka czułość i specyficzność pozwalają na zastosowanie tej metody diagnostycznej (qPCR) w celu optymalnego prowadzenia ciąży oraz szybkiego wdrożenia leczenia w przypadku rozpoznania toksopla-

zmozy wrodzonej.

Kolejne doniesienie (Dr N. Jalili, Dr D. Kobzowá, Dr Babál P. Novák, Słowacja) poświęcone było pierwszemu zarejestrowanemu przypadkowi dirofilariozy w Słowacji, w 2005 roku. Podkreślono, że dirofilarioza jest chorobą odzwierzęcą występującą głównie w krajach tropikalnych, sporadycznie w Europie. Na świecie, u kotów i psów pasożytują: *Dirofilaria immitis*, *D. repens*, *Acanthocheilonema (Dipetalonema) reconditum*, *A. (Dipetalonema) dracunculosis* oraz *Cercopithifilaria (Dipetalonema) grassii*, a w Europie jedynie *D. immitis* i *D. repens*. Najczęściej opisywano przypadki dirofilariozy we Włoszech (70% przypadków zarejestrowanych w Europie). Dorosłe nicienie pasożytują głównie w tętnicach płucnych, ale znajdowano je także w sercu żywiciela. Człowiek może zarazić się inwazyjnymi mikrofilariami (larwa 3-go stadium) podczas ssania krwi przez komara. Obecnie przyjmuje się, że spośród licznych gatunków *Dirofilaria* 6, z nich może wywoływać parazytozę u człowieka (*D. immitis*, *D. repens*, *D. striata*, *D. tenuis*, *D. ursi* oraz *D. spectans*), w Europie wyłącznie *D. immitis* i *D. repens*. U ludzi nicien ten pasożytuje głównie w tkance podskórnej, tętnicach płucnych i gałce oczne. Żywicielem niespecyficznym dla tego pasożyta jest człowiek, w organizmie którego *Dirofilaria* nie osiąga dojrzałości płciowej.

Tematem kolejnego doniesienia przedstawionego przez zespół z Łodzi (dr B. Fortak, dr J. Trojanowska-Lipczyk, dr E. Dyńska, dr M. Kolasa, prof. E. Małecka-Panas — UM, ICZMP) było „Zasiedlenie przez *C. albicans* ontocenoz przewodu pokarmowego u dzieci z celiakią”. Badaniami objęto 34 dzieci w wieku od 2 do 16 lat z chorobą trzewną. Przeprowadzono badanie mikologiczne materiału uzyskanego od pacjentów (popłuczyny jamy ustnej, wymazy z odbytu, posiewy kału oraz wycinki z jelita cienkiego), określono odczynowość (pH) kału oraz oceniono aktywność dwusacharydaz w błonie śluzowej jelita cienkiego. Z materiału pochodzącego od dzieci z celiakią najczęściej izolowano szczepy *C. albicans*, *C.*

guilliermond oraz *C. tropicalis*, które występowały z niższą częstością niż w grupie kontrolnej dzieci zdrowych. Gatunkiem najczęściej zasiedlającym błonę śluzową jelita cienkiego był *C. albicans*, a u większości dzieci obserwowano wieloogniskowość występowania grzybów z rodzaju *Candida*. Zwrócono uwagę, że zaobserwowana obniżona aktywność dwusacharydaz oraz kwaśny odczyn kału u dzieci z celiakią mogą wpływać na stopień kolonizacji błony śluzowej przewodu pokarmowego przez grzyb z rodzaju *Candida*.

Kolejne doniesienie (dr A. Gniadek, prof. A. B. Macura, UJ, Kraków) było poświęcone środowiskowemu ryzyku grzybic u pacjentów leczonych na oddziale nabytych niedoborów odporności. Podkreślono, że w Polsce w okresie od 1985 roku do 31 sierpnia 2006 roku *Acquired Immune Deficiency Syndrome* (AIDS) rozpoznano u 1798 osób, z czego 825 zmarło. Szacuje się jednak, że w Polsce liczba żyjących osób zakażonych wirusem HIV lub chorych na AIDS wynosi 15.000-20.000. U osób z obniżoną odpornością istnieją upośledzone mechanizmy odporności komórkowej i humoralnej, które sprzyjają zarażeniom grzybiczym. Grzyby oportunistyczne u osób chorych z immunosupresją mogą wywoływać ciężkie zarażenia (aspergilozę, kandydozę, kryptokokozę, mukormykozę, fuzariozę). Autorzy podkreślili, że wirulecja grzybów zależy od zwiększonej adhezji komórek grzybów do nabłonka żywiciela oraz zdolności do wytwarzania znaczących ilości enzymów hydrolitycznych. W badaniach własnych, do oceny mikologicznej pobrano 60 próbek powietrza z wszystkich 6 pomieszczeń Oddziału Nabytych Niedoborów Odporności Kliniki Gastroenterologii i Hepatologii oraz Chorób Zakaźnych Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie. Próbkę powietrza pobierano metodą aspiracyjną w ciągu pięciu kolejnych dni, dwukrotnie: rano oraz wieczorem. Ze ścian uzyskano 30 odcisków, stosując technikę Co-unt-Tact (bio Merieux). Stwierdzono, że około 40% ogólnej liczby izolowanych grzybów stanowiły gatunki potencjalnie chorobotwórcze dla człowieka. Średnia liczba izolowanych

grzybów z próbek powietrza, z poszczególnych pomieszczeń, mieściła się w granicach od 12 j.t.k./m³ do 710 j.t.k./m³ powietrza. Uzyskane wartości w porównaniu do norm dla ogólnych sal chorych (do 200 j.t.k./m³ według Krzysztofika) były niejednokrotnie przekraczane. Najmniejszą ilość grzybów izolowano z próbek pobranych z łazienki (do 50 j.t.k./m³).

Na zakończenie II części obrad przedstawiono wpływ nikotynamidu na aktywność enzymatyczną wybranych gatunków grzybów (dr A. Ciebiada-Adamiec, dr I. Ciebiada, prof. E. Małafiej, prof. A. Denys — ICZMP, UM Łódź). Zwrócono uwagę na fakt, że szczepy izolowane ze zmian klinicznych wykazują wysoką aktywność enzymatyczną, a nasilenie stanu zapalnego w przebiegu grzybicy może być związane z aktywnością enzymatyczną dermatofitów. Wydaje się, że obniżenie aktywności enzymatycznej dermatofitów i szczepów *Candida* może prowadzić do zmniejszenia ich patogenności. Obecnie wiadomo, że lipazy i fosfolipazy we wczesnej fazie zarażenia umożliwiają wykorzystanie powierzchniowych lipidów jako źródło węgla. Keratynazy zapoczątkowują proces rozkładu keratyny, kwaśne proteiny chronioną przed odpowiedzią układu immunologicznego. Fosfataza zasadowa i kwaśna wykazują zdolność hamowania reakcji zapalnej, zaś N-acetyl- β -glukozamidaza, α -mannozydaza zdolność hamowania migracji neutrofilów do ognisk zarażenia. Substancje, które obniżają aktywność enzymatyczną grzybów, mogą być rozważane jako potencjalne prepataty przydatne w terapii kandydozy i grzybic wywołanych przez dermatofity. W pracach własnych zbadano wpływ nikotynamidu — aktywnej biologicznie formy niacyny — na aktywność wytwarzanych enzymów szczepów wzorcowych (*C. albicans* ATCC 10231, *T. mentagrophytes* ATCC 9533, *T. rubrum* ATCC 38118) oraz wyizolowanych z materiału klinicznego (*C. albicans*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*). Uzyskane wyniki potwierdzają, że nikotynamid wykazuje zdolność hamowania aktywności enzymatycznej grzybów izolowanych z materiału klinicznego. Stwierdzone wcześniej korzystne działanie po-

wierzchniowe nikotynamidu na skórę sprawia, iż w zestawieniu z uzyskanymi wynikami badań, preparat ten potencjalnie może stanowić korzystne uzupełnienie terapii w grzybicach skóry.

Obradom III części zjazdu przewodniczyli: prof. Andrzej Denys (UM, Łódź), prof. Bożena Dworecka-Kaszak (SGGW, Warszawa) oraz prof. Eugeniusz Małafiej (ICZMP, Łódź). Doniesienie nt. „Inwazje *Cryptosporidium* spp. u dzieci z niedoborami immunologicznymi: molekularna i filogenetyczna analiza izolatów *Cryptosporidium* spp. (dr M. Bednarska, dr A. Bajer, prof. E. Siński, Warszawa, UW) otworzyło obrady tej sesji. Autorzy podkreślili, że częstość występowania pierwotnych niedoborów odporności wynosi 1/10.000; zazwyczaj związane są one z wrodzonymi defektami genetycznymi. Izolowany niedobór IgA, występujący z częstością 1/500, jest najczęstszy. Nabyte, przemijające niedobory immunologiczne występują w chorobach infekcyjnych, leczeniu immunosupresyjnym, w podeszłym wieku, zaś nabyte trwałe — są następstwem obniżonej odporności w AIDS, chorobach przewlekłych, zwłaszcza nowotworowych związanych z układem immunologicznym i krwiotwórczym (białaczki i chłoniaki). Podkreślono, że inwazyjnymi dla człowieka w przypadku sprawnego układu odpornościowego są gatunki *Cryptosporidium parvum* oraz *C. hominis*, natomiast w niedoborach immunologicznych — *C. muris*, *C. felis*, *C. canis*, *C. meleagridis* oraz *C. suis*. Prowadzone w latach 2002–2006 badania własne dotyczyły 86 prób pochodzących od 33 dzieci, w wieku od 3 miesięcy do 14 lat. Dla określenia częstości zarażenia *Cryptosporidium* zastosowano barwienie techniką Ziehl-Nelseena, test immunofluorescencyjny i badanie molekularne (nested PCR). Genotypowanie izolatów prowadzono w oparciu o analizę sekwencji produktów nested PCR dla genu białka COWP i beta-tubuliny oraz analizę RFLP sekwencji produktów nested PCR dla genu białka COWP. Badając próby od dzieci uzyskano: 11/33 PCR pozytywne (33%), 5/33 Z-N pozytywne (15%). Ustalono następujące genotypy izolatów: 8

Cryptosporidium parvum (genotyp 2), 1 *Cryptosporidium hominis* (genotyp 1), 1 *Cryptosporidium meleagridis* (genotyp 3). Zwrócono uwagę, że genotypem najczęściej stwierdzanym u dzieci był *C. parvum*, co może sugerować zoonotyczne drogi zarażenia. Inwazja *C. hominis* w przewodach żółciowych połączona z przewlekłym zapaleniem wątroby może świadczyć o udziale tego pierwotniaka w rozwoju stanu zapalnego. Po raz pierwszy w Polsce stwierdzono przewlekłą inwazję *C. meleagridis*. Zwrócono uwagę na znaczący brak w Polsce ośrodków zajmujących się diagnostyką *Cryptosporidium*, co jest przyczyną niskiej wykrywalności tej parazytozy w naszym kraju.

W dalszej kolejności przedstawiono wpływ ludzkiej prolaktyny na wewnątrzkomórkową replikację *Toxoplasma gondii* (dr K. Dzitko, dr P. Płociński, prof. H. Długońska — UŁ). Rozważano możliwość bezpośredniego oddziaływania tego hormonu na pierwotniaka lub pośredniego — na linie komórek żywicielskich. Doświadczenia przeprowadzono z użyciem szczepu BK *T. gondii*, wariant fenotypowy aBK (attenuated BK). Do namazania tachyzoitów wykorzystano linie komórkowe: Hs27 — fibroblasty napletka uzyskane od ludzkiego noworodka, o fenotypie niezmiennym nowotworowo, HeLa — wywodzące się z komórek raka szyjki macicy, z linii nabłonkopodobnej, L929 — fibroblasty pochodzące z tkanki łącznej wiotkiej i tłuszczowej myszy C3H/An. Do wybranych linii komórkowych dodawano w odmiennych kombinacjach czasowych różne dawki hormonu (0-100 ng/ml) i populacji pierwotniaka: (1) hormon i tachyzoity pierwotniaka były dodawane do mikrohodowli komórek żywicielskich równocześnie, na 72 h inkubacji; (2) tachyzoity dodawano do mikrohodowli komórek żywicielskich po 30-minutowej preinkubacji z hormonem na dalsze 72 h inkubacji. Uzyskane wyniki wskazują na fakt, że ludzka prolaktyna nie wpływa w sposób istotny na zdolności proliferacyjne komórek ludzkich linii Hs27, HeLa i linii mysiej L929. Prolaktyna dodana do mikrohodowli równocześnie z tachyzoitami nie wpływa na namnażanie się pasożyta na komórkach

linii żywicielskich. Natomiast w warunkach *in vitro* 30-minutowa preinkubacja tachyzoitów *T. gondii* z ludzką, rekombinowaną prolaktyną powoduje spadek intensywności namnażania się tych pierwotniaków na wszystkich liniach komórkowych. Ponadto zaobserwowano, że preinkubacja pierwotniaków z prolaktyną w podłożu niezawierającym albuminy bydlęcej powoduje znamienne statystycznie obniżenie intensywności replikacji *T. gondii*. W posumowaniu wyników podkreślono, że prolaktyna wykazuje *in vitro* działanie przeciwpierwotniakowe względem *Toxoplasma gondii*. Możliwe mechanizmy działania hormonu na pierwotniaka mogą obejmować: swoiste lub nieswoiste wiązanie prolaktyny, blokowanie adhezji, wnikanie do komórki i zakłócanie metabolizmu.

W kolejnym wykładzie prof. Bożena Dwo-recka-Kaszak (SGGW, Warszawa) przedstawiła problemy diagnostyczne aspergilozy u zwierząt. Autorka zwróciła uwagę na fakt, że wśród powszechnie występujących grzybów z rodzaju *Aspergillus* endemicznie mogą pojawiać się gatunki o większej wirulencji (*A. terreus*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. flavus*, *A. deflectus*, *A. oryza* i *A. niger*). Przy ekspozycji na wyjątkowo dużą liczbę zarodników zarażeniu mogą ulegać również zdrowe zwierzęta ze sprawnie działającym układem immunologicznym. Opisywano liczne przypadki aspergilozy u psów, kotów, gadów i ptaków, a gatunkami najczęściej izolowanymi z przypadków klinicznych były *A. fumigatus* i *A. terreus*. U ptaków aspergiloza rozwija się jako pierwotna bronchopneumonia z dusznością, utratą apetytu oraz apatią. W przypadku postaci mózgowej obserwuje się zaburzenia równowagi, ruchy mimowolne. Aspergiloza u przeżuwaczy i trzody chlewnej przebiega najczęściej jako asymptomatyczne zapalenie płuc. W postaci przewlekłej obserwuje się: zmiany w płucach przypominające gruźlicę, zarażenie gruczołu mlekowego, zmiany w łożysku prowadzące do poronień. W przypadku rozsianej aspergilozy u koni, notuje się, wynikające ze zmian w obrębie mózgu lub nerwu wzrokowego, zaburzenia motoryki i orientacji przestrzennej, a nawet ślepotę. W aspergilozie u psów naj-

częściej wykrywa się zmiany zlokalizowane w obrębie jam nosa i zatok przynosowych. Aspergiloza jam nosa obserwowana jest najczęściej u ras „długonosych”, np. owczarków niemieckich (ok. 90% wszystkich przypadków), głównie samców, u których istnieją pewne zaburzenia w produkcji immunoglobulin, specyficzne dla tej rasy. Aspergiloza u psów objawia się osowiałością zwierzęcia, anoreksją, utratą wagi, owrzodzeniami i krwawieniami z nozdrzy, chrapliwym oddechem. Na zakończenie zasygnalizowano, że coraz częściej notuje się przypadki występowania grzybicy u zwierząt ze sprawnym układem immunologicznym.

Następnie zespół z Łodzi (prof. J. Kwaśniewska, dr A. Gnacikowska, dr A. Jaskółowska — UM Łódź) przedstawił ocenę aktywności enzymów hydrolitycznych szczepów *Candida albicans* wyizolowanych z różnych ontocenzoz u partnerów seksualnych z kandydozą nawracającą oraz próbę wykorzystania tej cechy w bliższej charakterystyce szczepu grzyba. Oceniono aktywność enzymów hydrolitycznych u 80 szczepów. U pacjentów płci męskiej rozpoznano klinicznie grzybicę żołądka i wewnętrznej błaszki napletka, u kobiet zaś — grzybicę sromu i pochwy. Z danych wywiadu wynikało, że u większości kobiet nawroty zmian klinicznych utrzymywały się przez kilka, a nawet kilkanaście lat, pojawiając się, co 1-2 miesiące. Wszyscy pacjenci byli wcześniej leczeni preparatami przeciwgrzybiczymi, o działaniu ogólnym i/lub miejscowym. Aktywność enzymatyczną szczepów grzybów oceniono za pomocą testu API ZYM firmy bioMérieux zawierającego substraty dla ujawnienia 19 hydrolaz. W szczepach *C. albicans* wyizolowanych z ontocenozy narządów płciowych i jamy ustnej pacjentów płci męskiej stwierdzono wysoką aktywność większej liczby enzymów, niż w szczepach wyodrębnionych z tych samych ontocenzoz od ich partnerek seksualnych. Porównanie aktywności hydrolaz grzybów u mężczyzn i kobiet wskazywało na brak istotnych różnic w odniesieniu do wszystkich zbadanych enzymów z wyjątkiem wyższej aktywności N-acetylo- β -glukozaminidazy w szczepach pochodzących

od mężczyzn.

Kolejne dwa referaty poświęcone były różnym aspektom glistnicy. Zespół z Łodzi (dr E. Dyńska, dr J. Trojanowska-Lipczyk, dr B. Fortak, dr M. Kolasa, prof. E. Małecka-Panas, UM, ICZMP, Łódź) omówił wybrane parametry diagnostyczne stosowane u dzieci i młodzieży z zarażeniem *Ascaris* sp. Podkreślono, że zarażenie glistą ludzką w skali świata dotyczy prawie 1,5 miliarda ludzi, zaś w Polsce wzrasta częstość jej występowania. Jest jedną z pasożytów najczęściej notowaną u dzieci w wieku przedszkolnym i wczesnym szkolnym. Badaniem objęto grupę 50 dzieci w wieku od 3 do 18 lat hospitalizowanych w Klinice Gastroenterologii ICZMP. Przeprowadzono badania serologiczne (wykrywanie przeciwciał klasy G dla *Ascaris* sp. w surowicy krwi testem ELISA - BIOMEDICA) oraz koproskopowe na obecność jaj pasożyta. Oznaczano poziom ASPAT, ALAT i enzymów trzustkowych, wybrane parametry odporności humoralnej i komórkowej, poziom IgE całkowitego w surowicy oraz eozynofilię krwi obwodowej. Ponadto wykonano badania obrazowe — usg jamy brzusznej, a w uzasadnionych przypadkach — rtg płuc. Diagnostyka była prowadzona przed rozpoczęciem leczenia, a po 3 i 6 miesiącach od jego zakończenia powtarzano testy serologiczne i badania koproskopowe. W przebiegu glistnicy zaobserwowano m.in. podwyższony poziom IgE całkowitego w surowicy, obniżenie wskaźnika CD4/CD8, powiększenie wątroby (u 4% dzieci), zagięty pęcherzyk żółciowy (12%), wzmożony rysunek miąższu wątroby (8%), zmiany śródmiąższowe płuc (8%). Należy podkreślić, że zarażenie *Ascaris* potwierdzono jedynie testem serologicznym, albowiem u żadnego z dzieci badaniem koproskopowym nie wykryto jaj pasożyta. Taka sytuacja może wystąpić w przypadku larwalnej fazy pasożytozy, obecności w organizmie żywiciela niedojrzałych płciowo osobników, nielicznej populacji pasożyta, lub też zarażenia *A. suum*. Obecnie stosowane w Polsce rutynowe metody diagnostyczne nie pozwalają na różnicowanie zarażeń *A. lumbricoides* z *A. suum*.

W dalszej kolejności przedstawiono analizę kliniczną zarażenia *Ascaris* sp. u dzieci hospitalizowanych w Klinice Gastroenterologii ICZMP z dolegliwościami ze strony przewodu pokarmowego (dr A. Ryngajłło, dr L. Bąk-Romaniszyn, dr E. Czkwianianc, prof. E. Małeczka-Panas — UM, ICZMP Łódź). W okresie od października 2003 do września 2004 roku rozpoznano testem immunoenzymatycznym ELISA zarażenie *Ascaris* sp. u 289 dzieci (34% zbadanych). Podkreślono, że 72% zarażonych pochodziło ze środowiska miejskiego, a dominującym objawem we wszystkich grupach wiekowych był ból brzucha (81%). Występowały również dolegliwości ze strony układu oddechowego (nawracające infekcje dróg oddechowych z częstością — 19,4%, przewlekły kaszel

— 9%, duszność — 2,4%), nerwowego (ból głowy — 15,9%, omdlenia — 10,4%) i skórne reakcje alergiczne (3,5%).

Na zakończenie obrad, Przewodnicząca Łódzkiego Oddziału PTP prof. Jolanta Kwaśniewska podziękowała wszystkim uczestnikom i serdecznie zaprosiła na kolejny 47. Dzień Kliniczny Parazytologii Lekarskiej, którego tematem będą zagadnienia związane z właściwościami biologicznymi *Toxoplasma gondii* oraz diagnostyką i leczeniem zarażeń wrodzonych i nabytych.

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