

mycyna działa hamująco na rozwój *Pseudomonas aeruginosa*. Przeprowadzone badania wykazały również, że podobne działanie wywiera na omawiany drobnoustrój sulfatiazol. Wyniki działania bakteriobójczego chemoterapeutyków były w dużej mierze uzależnione od stężenia roztworów oraz od czasu ich działania. Z danych zawartych w tab. 2 wynika, że najlepsze działanie bakteriobójcze wywierały roztwory 2% biolugolu, 2% vagothylu, 0,1% nadmanganianu potasu oraz 1% chloraminy. Po 5 minutach ekspozycji obserwowano bowiem zahamowanie wzrostu badanych szczepów w 100%. Słabsze działanie bakteriobójcze wywierały 0,1% roztwory sterinolu, 0,02% Polleny—Jod M oraz 1% roztwór biovalu. Po 20 minutach działania wymienionych terapeutyków, brak wzrostu *Pseudomonas aeruginosa* stwierdzano w 70% prób. Roztwór 0,1% rivanolu hamował wzrost jedynie 33,4% badanych szczepów. Nie stwierdzono natomiast działania bakteriobójczego na wyizolowane szczepy 2% roztworu kwasu bor-

nego oraz 0,05% roztworu nitrofurazonu. Podobnie negatywne wyniki w odniesieniu do nitrofurazonu uzyskał Anusz (1).

#### Wnioski

1. Badane szczepy *Pseudomonas aeruginosa* były wrażliwe na streptomycynę oraz na sulfatiazol. Na pozostałe antybiotyki drobnoustrój ten był słabo wrażliwy lub odporny.

2. Z badanych chemoterapeutyków najsilniejsze działanie bakteriobójcze na wyizolowane szczepy *Pseudomonas aeruginosa* wywierały roztwory: 2% biolugolu, 2% vagothylu, 0,1% nadmanganianu potasu oraz 1% chloraminy.

#### Pismienictwo

1. Anusz Z.: *Medycyna Wet.* 19, 514, 1963.
2. Kozłowski S.: *Medycyna Wet.* 27, 234, 1971.
3. Patyra W., Dąbrowski T., Kucharski B.: *Medycyna Wet.* 25, 167, 1969.

Adres autora: lek. wet. Jacek Króliński, ul. Komuny Pańskiej 63a/6, 50-452 Wrocław.

BOLESŁAW PAWLIK

## Badania nad pojawianiem się i rolą przeciwciał anty-*Aspergillus fumigatus* u myszy białych

Z Zakładu Mykologii Instytutu Mikrobiologii AM w Krakowie

Szerokie rozpowszechnienie grzybów z rodzaju *Aspergillus* w przyrodzie (9, 10, 12) oraz częste stwierdzenie przeciwciał anty-*Aspergillus fumigatus* u znacznego odsetka zdrowych ludzi i zwierząt (5, 6, 7) wskazuje, że do pojawiania się tych przeciwciał dochodzi stosunkowo łatwo w wyniku zetknięcia się organizmu z konidiami *A. fumigatus*.

Celem pracy były badania nad pojawianiem się przeciwciał anty-*Aspergillus* wykrywanych odczynem flokulacyjnym u myszy białych uodpornianych różnymi metodami, a następnie próba oceny znaczenia stwierdzanych przeciwciał w odporności na zakażenie grzybami z rodzaju *Aspergillus*.

#### Materiał i metody

Badania przeprowadzono na materiale obejmującym 160 zdrowych myszy białych o wadze 20–30 g. Przed rozpoczęciem eksperymentu kontrolowano u zwierząt poziom przeciwciał. Z surowicami wszystkich dobranych do późniejszych badań myszy otrzymano wyniki ujemne odczynu flokulacyjnego z antygenem *A. fumigatus* (OF-A. *fumigatus*). Odczyn ten zastosowany w badaniach do wykrywania przeciwciał anty-*Aspergillus* wykonywano według metodyki podanej przez Doleżalą i Doleżalową (5, 6).

Do badań użyto 10 szczepów *A. fumigatus* izolowanych z przypadków chorobowych (AJ-16/72, BW-19/72,

SH-27/72, BW-28/72, HA-38/72, KK-43/72, SJ-58/72, ŻJ-59/72, JS-60/72, PE-79/72).

Badania wykonano w dwóch etapach:

I etap — badania nad pojawianiem się przeciwciał anty-*Aspergillus fumigatus* u myszy białych.

Zastosowano trzy drogi wprowadzania spor *A. fumigatus* do organizmu myszy; dootrzewnową — typowo laboratoryjną oraz donosową i pokarmową — zbliżone do spotykanych w przyrodzie.

Używano zawiesiny zawierającej 50 konidiów w polu widzenia mikroskopu przy powiększeniu 600×. Dootrzewnowo i donosowo zawiesinę konidiów w płynie fizjologicznym wprowadzano 3-krotnie w odstępach 3 dniowych w ilości 0,05 ml. Przy zakażeniu drogą pokarmową zawiesinę spor w wodzie podawano myszom do picia przez okres 10 dni.

Po 28 dniach od rozpoczęcia eksperymentu pobierano krew z serca od zwierząt znajdujących się w narkozie. Poziom przeciwciał kontrolowano przy pomocy OF-A. *fumigatus*.

II etap — badania nad rolą ochronną przeciwciał anty-*Aspergillus fumigatus*.

Grupę doświadczalną stanowiły myszy białe, u których w wyniku podania spor *A. fumigatus* stwierdzano przeciwciała anty-*Aspergillus*. W grupach kontrolnych użyto zwierząt nieuodpornionych z ujemnym OF-A. *fumigatus*.

Do zakażenia używano zawiesiny 200 konidiów w polu widzenia mikroskopu przy powiększeniu 600×. Zawiesinę podawano zwierzętom donosowo w jednorazowej dawce 0,1 ml.

Ze względu na różną podatność na zakażenie *A. fumigatus* związaną z osobniczą odpornością stwierdza-

ną u myszy białych (1), część zwierząt zakażano z równoczesnym wprowadzaniem do ich organizmu hydrokortisonu. Podanie hydrokortisonu miało na celu ułatwienie rozwoju grzybicy zgodnie z danymi z piśmiennictwa (2, 11). Hydrokortison podawano zwierzętom w postaci iniekcji podskórnych w ilości 2,5 mg 2 dni przed zakażeniem, a następnie 3-krotnie w odstępach dwu dniowych. Przeprowadzono również kontrolę działania hydrokortisonu na organizm myszy białych.

Zwierzęta padły w czasie doświadczenia oraz uspio- ne po 28 dniach od rozpoczęcia szczepień poddano sekcji. Podczas sekcji makroskopowo obserwowano zmiany w narządach. Od wszystkich myszy pobrano krew z serca, z którą wykonano OF-*A. fumigatus*. Dla potwierdzenia zakażenia *A. fumigatus* posiewano na podłożu Sabourauda roztarte płuca. Hodowle inkubowano w temp. 27° przez 14 dni, a identyfikację grzybów przeprowadzono na podstawie cech morfologicznych makro- i mikrohodowli.

### Wyniki

Wyniki badań nad pojawianiem się przeciwciał anty-*Aspergillus* u myszy białych zestawiono w tab. 1.

Tab. 1. Przeciwciała anty-*Aspergillus* wykrywane odczynem flokulacyjnym u myszy białych po wprowadzeniu konidiów *A. fumigatus*

Grupa	Droga wprowadzania konidiów	Liczba badanych zwierząt	Odczyn flokulacyjny z <i>A. fumigatus</i>									
			ujemny		dodatni		liczba dodatnich w mianie:					
			liczba	%	liczba	%	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640
I	dootrzewnowa	20	0	0	20	100	—	—	2	10	6	2
II	donosowa	20	0	0	20	100	—	4	5	11	—	—
III	pokarmowa	20	5	25	15	75	7	2	4	2	—	—

Przy wprowadzaniu konidiów *A. fumigatus* do organizmu zwierząt drogą dootrzewnową i donosową (pozajelitową) u wszystkich myszy stwierdzono odczynem flokulacyjnym obecność przeciwciał anty-*Aspergillus*. Natomiast przy podaniu spor drogą pokarmową (dojelitową) przeciwciała te stwierdzono u 75% badanych zwierząt.

OF-*A. fumigatus* stwierdzono przeciwciała w najwyższych mianach u myszy uodparnianych dootrzewnowo. Obserwowano miana w zakresie 1/80 do 1/640, najczęściej, bo u 50% zwierząt stwierdzano miana 1/160. Odczyn dodatnie w mianie 1/320 wykazano u 30% zwierząt. Średnie miano 1:248.

W grupie myszy, którym konidia podawano drogą donosową, obserwowano dodatnie wyniki odczynu flokulacyjnego w zakresie mian 1/40 do 1/160. Najwyższy odsetek 55% stanowiły dodatnie odczyny w mianie 1/160. Wartość średniego miana 1:116.

Przy podaniu zarodników drogą pokarmową przeciwciała anty-*Aspergillus* OF stwierdzano w mianach 1/20—1/160. Odczyn dodatnie w mianie 1/20 stanowiły 46,7%. W grupie tej uzyskano najniższą wartość średniego miana 1:57,3.

W tab. 2 zestawiono wyniki badań podjętych nad określeniem znaczenia przeciwciał przeciwkropidlako-

wych, stwierdzanych OF u myszy białych procesach odpornościowych.

Po podaniu drogą donosową konidiów *A. fumigatus* u żadnej z uodpornionych myszy nie obserwowano rozwoju zakażenia grzybiczego. Natomiast w grupie zwierząt nieuodpornionych 4 myszy padły z powodu rozwoju grzybicy kropidlakowej, co stanowi 20% badanych zwierząt z tej grupy. U 20% uodpornionych zwierząt wyhodowano *A. fumigatus* oraz u wszystkich stwierdzono OF przeciwciała anty-*Aspergillus*. W grupie zwierząt nieuodpornionych *A. fumigatus* wyhodowano od 50%, a przeciwciała stwierdzono u 90% badanych myszy.

Zastosowanie hydrokortisonu spowodowało że, wszystkie zwierzęta nieuodpornione zakażone *A. fumigatus* padły, a rozwój zakażenia potwierdzono w 100% dodatkimi posiewami. Równocześnie badano pojawianie się przeciwciał w czasie rozwoju zakażenia, przeciwciała anty-*Aspergillus* stwierdzono u 8 zwierząt tj. w 40%, szczególnie u tych, które padły najpóźniej po zakażeniu.

W grupie zwierząt uodpornionych mimo podania hydrokortisonu padło tylko 15% tj. 3 myszy białe, u

25% stwierdzono w hodowlach *A. fumigatus*. Przeciwciała wykazano OF-*A. fumigatus* u wszystkich w tej grupie zwierząt.

W długości czasokresu padania zwierząt, pomiędzy ostatnią iniekcją a śmiercią zwierzęcia obserwowano różnice; padały one po okresie 6 do 15 dni od zakażenia. U wszystkich myszy padłych potwierdzono rozwój zakażenia *A. fumigatus* na podstawie wykonanej sekcji, dokonanych posiewów płuc oraz sporządzonych preparatów bezpośrednich z narządów.

W badaniach uwzględniono również grupę kontrolną zwierząt, którym podano tylko hydrokortison. Z grupy tej nie padło żadne zwierzę co wskazuje, że zastosowana w doświadczeniu dawka hydrokortisonu nie jest toksyczna dla myszy.

### Omówienie wyników

Dla uzyskania odpowiedzi na pojawiające się pytanie czy rzeczywiście tak łatwo dochodzi do immunizacji zwierząt? — przeprowadzono badania eksperymentalne na myszach białych, stosując różne drogi wprowadzania konidiów *A. fumigatus* do organizmu zwierząt.

Tab. 2. Wyniki badań uzyskane przy zakażeniu myszy białych drogą donosową konidiami *A. fumigatus*

Grupa zwierząt	Podgrupa	Rodzaj zakażenia	Liczba badanych zwierząt	Wyniki			
				Śmiertelność		Dodatnie posiewy	
				liczba	%	liczba	%
uodpornione OF = 1/20 - 1/160	1	konidia <i>A. fumigatus</i>	20	0	0	4	20
	2	konidia <i>A. fumigatus</i> + hydrokortison	20	3	15	5	25
nieuodpornione OF = ujemny	1a	konidia <i>A. fumigatus</i>	20	4	20	10	50
	2a	konidia <i>A. fumigatus</i> + hydrokortison	20	20	100	20	100
kontrola		hydrokortison	10	0	0	0	0

Nie jest to zagadnienie zupełnie nowe gdyż uodparnianie zwierząt celem uzyskania surowic odpornościowych przeprowadzali już różni autorzy (3, 5, 8, 13, 14). W procesie uodparniania nie stosowali oni na ogół żywych elementów grzyba, lecz w różny sposób przygotowane wyciągi antygenowe, podawane zwierzętom najczęściej drogą iniekcji dożylnych, domięśniowych i podskórnych. Taki sposób uodparniania pozwala na uzyskanie surowic zawierających wysoki poziom przeciwciał.

W badaniach własnych zastosowano natomiast z wyjątkiem drogi dootrzewnowej, sposoby wprowadzania konidiów *A. fumigatus* zbliżone do zakażeń spotykanych w przyrodzie, drogą donosową, jako najbardziej przypominającą zakażenia aerogenne oraz drogę przewodu pokarmowego.

Wykazanie OF-A. *fumigatus* pojawiania przeciwciał u 100% myszy białych przy podaniu antygenu drogą dootrzewnową i donosową oraz u 75% zwierząt przy podaniu drogą pokarmową wskazuje, że do odpowiedzi serologicznej dochodzi łatwo pod wpływem działania sporami *A. fumigatus* na organizm myszy.

Częste infekcje organizmu zwierząt grzybami z rodzaju *Aspergillus* przy uwzględnieniu oddziaływania czynników usposabiających do rozwoju zakażenia grzybiczego, stosowanie chemoterapeutyków (antybiotyki, kortikosterydy, leki immunosupresyjne) oraz występowania zmian chorobowych układu oddechowego, nie zawsze prowadzi do rozwoju grzybicy kropidlakowej. Badania nad eksperymentalną aspergillozą u zwierząt (1, 11), którym podawano spory *A. fumigatus* wskazują na różną podatność na zakażenie; do rozwoju grzybicy dochodziło bowiem tylko u pewnego odsetka zwierząt. Fakty te wskazują na występowanie u zwierząt osobniczej odporności chroniącej przed zakażeniem grzybami z rodzaju *Aspergillus*.

Zjawiska odpornościowe w grzybicach są mało poznane. Niemniej jednak u myszy zakażonych *Candida albicans*, *Sporotrichum*, *Coccidioides immitis* i *Histoplasma capsulatum* stwierdzono zwiększoną odporność na ponowne zakażenie (4).

Wyniki moich badań wykazały, że myszy białe uodpornione, u których odczynem flokulacyjnym stwierdzano przeciwciała anty-*Aspergillus*, wykazywały zdecydowanie mniejszą podatność na rozwój zakażenia kropidlakowego aniżeli zwierzęta z grup porównawczych, u których przeciwciał nie stwierdzano. Świadczy to, że przeciwciała anty-*Aspergillus* odgrywają pewną rolę w ochronie przed rozwojem schorzenia, pojawiającego się w następstwie infekcji, zaś wykrycie tych przeciwciał odczynem flokulacyjnym wskazuje na zwiększoną odporność organizmu zwierząt.

W świetle uzyskanych wyników wydaje się, że dalsze opracowanie podjętych zagadnień stworzy możliwość sztucznego uodparniania zwierząt celem zapobiegania przed rozwojem

grzybicy kropidlakowej. Zagadnienie tego typu profilaktyki może znaleźć istotne znaczenie na fermach hodowlanych ptaków, które jak wiadomo są szczególnie podatne na rozwój zakażenia kropidlakiem, a aspergilloza jest jedną z częstych schorzeń ptaków i przebiega w postaci epidemii, powodując znaczne straty ekonomiczne.

### Wnioski

Na podstawie uzyskanych wyników badań można stwierdzić, że:

1. Po podaniu myszom białym spor *A. fumigatus* drogą dootrzewnową, donosową oraz drogą pokarmową łatwo dochodzi do wytwarzania w organizmie zwierząt przeciwciał anty-*Aspergillus* stwierdzanych odczynem flokulacyjnym.

2. Zwierzęta, u których stwierdzano odczynem flokulacyjnym przeciwciała anty-*Aspergillus* wykazywały znacznie mniejszą podatność na rozwój zakażenia grzybami z rodzaju *Aspergillus*.

### Piśmiennictwo

1. Bhatta V. N., Mohapatra L. N.: Mykosen 12, 631, 1969.
2. Bhatta V. N., Mohapatra L. N.: Mykosen 13, 105, 1970.
3. Biguet J., Tran Van Ky P., Capron A., Fruit J.: C. R. Acad. Sc. 254, 3768, 1962.
4. Chodkowska S.: Atlas grzybic układu oddechowego. PZWL, 1968.
5. Doleżal M., Doleżalowa M., Pawlik B.: Gruźlica 41, 359, 1973.
6. Doleżalowa M., Doleżal M., Pawlik B.: Boll. Ist. Sieroter. Milanese 52, 321, 1973.
7. Ikemoto H., Shibata S.: Sabouraudia 11, 167, 1973.
8. Pepys J., Riddell R. W., Citron K. M., Clayton Y. M., Short E. W.: Am. Rev. Resp. Dis. 80, 167, 1959.
10. Saëz H.: Sabouraudia 5, 194, 1967.
11. Sandhu D. K., Sandhu R. S., Damadaran V. N., Randhawa H. S.: Sabouraudia 8, 32, 1970.
12. Segretain G.: Lab. Invest. 11, 1046, 1962.
13. Seo M.: Okayama Med. Ass. 72, 2049, 1960.
14. Tran Van Ky P., Urtel J., Rose F.: Ann. Inst. Pasteur 111, 161, 1966.

Adres autora: dr Bolesław Pawlik, Al. Pokoju 45/30, 31-564 Kraków.

Павлик Б. — Исследования над появлением и ролью противотел против *Aspergillus fumigatus* у белых мышей.

Провели экспериментальные исследования над появлением противотел обнаруживаемых при помощи флокуляции с антигеном *A. fumigatus* у иммунизированных разными методами белых мышей. Установили, что при интраперитонеальном и доносом введении спор *A. fumigatus* противотела появлялись у всех исследованных животных (100%), а при пероральном — у 75% мышей. Эти результаты указывают, что у мышей серологический ответ на введение спор *A. fumigatus* получается легко. В дальнейшем установили, что обнаруживаемые методом флокуляции противотела против *A. fumigatus* являются результатом иммунологических процессов и вызывают понижение заболеваемости мышей аспергиллезным дерматомикозом.

Pawlik B. — Examinations on the occurrence of antibodies against *Aspergillus fumigatus* and their role in white mice.

There were performed some examinations on the occurrence of antibodies, discovered by flocculation test with the antigen of *A. fumigatus*, in white mice immunized by various routes. The antibodies against *A. fumigatus* were found out in all animals immunized intraperitoneally or intranasally with the spores of *A. fumigatus*. Instead the antigen applied orally caused the occurrence of antibodies in 75 per cent of mice. The further experiments performed indicated that the antibodies influenced the decreased morbidity due to aspergillosis in white mice.