

Rys. 2. Rozdział pochodnych eteru trójmetylsilanowego F-2 (6-)-10-hydroxy-6-oxo-trans-1-undecenyli)-B resorcylic acid lactone i F-3 (niezidentyfikowany — podobny do F-2) przy pomocy chromatografii gazowej. Związki F-2 i F-3 wyekstrahowano z ryżu zakażonego sporami *Fusarium graminearum*.

zwykłych eluotropowych rozpuszczalników, eluowany on jest z frakcją eteru dwuetylowego.

Planuje się prowadzenie dalszych badań celem otrzymania większych ilości tego związku, co umożliwi analizę grup funkcjonalnych w oparciu o różne metody analizy spektroskopowej.

Piśmiennictwo

1. Christensen C. M., Franse H. A., Nelson G. H., Mrs. Fern Bates, Mirocha C. J.: Microflora of black and red pepper. *App. Microbiol.* 15, 622, 1967.
2. Christensen C. M., Nelson G. H., Mirocha C. J.: *Appl. Microbiol.* 13, 653, 1965.
3. Christensen C. M., Nelson G. H., Mirocha C. J., Fern Bates, Dorworth C. E.: *Appl. Microbiol.* 14, 774, 1966.
4. McCapra F. A., Scott I., Delmotte P., Delmotte-Placque J., Bhacca N. S.: *Tetrahedron Letters*, 15, 869, 1964.
5. Mirocha C. J., Christensen C. M., Nelson G. H.: *Appl. Microbiol.* 15, 497, 1967.
6. Mirrington B. N., Ritchie E., Shoppee C. W., Taylor W. C., Sternhell S.: *Tetrahedron Letters*, 7, 365, 1964.
7. Shibata S., Natori S., Udagana S.: *List of fungal products*. Univ. Tokyo Press, Tokyo, 1964.
8. Urry W. H., Wehrmeister H. L., Hodge E. B., Hidy P. H.: *Tetrahedron Letters*, 27, 3109, 1966.

STANISŁAW WOŁOŻYŃ

Badania nad właściwościami i budową antygenową *Histoplasma farciminosum* (*Cryptococcus farciminosus* — Rivolta) Część I. Hodowla i właściwości morfologiczne

Katedra Epizootiologii Wydziału Weterynarii WSR w Lublinie
Kierownik: prof. dr S. KRAUSS

Jednym z najbardziej obecnie aktualnych zagadnień w mikologii lekarskiej jest sprawa ujednoczenia terminologii i systematyki grzybów chorobotwórczych. W istniejących podziałach panują duże rozbieżności spowodowane tym, że wszystkie prawie grzyby chorobotwórcze zostały odkryte przez lekarzy, którzy nadali im mniej lub bardziej trafne nazwy.

Za podstawę w określaniu przynależności gatunkowej brano właściwości morfologiczne fazy pasożytniczej spotykanej w organizmie oraz cechy morfologiczne i częściowo biochemiczne fazy saprofitycznej uzyskiwanej na podłożach sztucznych. Duża zmienność morfologiczna uzależniona od wielu, często bliżej nieznanym czynników zewnętrznych sprawiła, że jeden i ten sam grzyb był zaliczany do różnych gatunków i opisywany pod różnymi nazwami, co niezmiernie utrudnia korzystanie z piśmiennictwa. Przykładem może być drożdżak *Candida albicans* dla którego podano 172 synonimów (Spiesiwcewa — 89).

W ostatnim dziesięcioleciu szereg mikologów (Biquet i wsp. — 5, 6; Evans — 23; Salvin — 74; Seeliger — 80, 81) postulują przeprowadzanie badań nad strukturą antygenową grzybów uważając, że tą drogą można będzie często łatwiej ustalić przynależność gatunkową, a nawet pochodzenie filogenetyczne. Kaufmann i Kaplan (39) twierdzą, że poznanie budowy antygenowej umożliwi może ujednoczenie i rewizję klasyfikacji botanicznej. Dotychczas, w sposób wystarczający opracowano budowę antygenową tylko niektórych chorobotwórczych dla ludzi szczepów z rodzajów *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Candida*, *Histoplasma*, *Trichophyton* oraz *Sporotrichum*. Bardzo przydatne do tego celu okazały się, szeroko obecnie

w bakteriologii stosowane, odczyny precypitacji w żelu i immunoelektroforezy.

Celem pracy było zbadanie niektórych właściwości biochemicznych oraz powiązań antygenowych grzyba wywołującego epizootyczne zapalenie naczyń chłonnych koni i wybranych przedstawicieli rodzaju *Candida*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Saccharomyces*, *Trichophyton* i innych grzybów przy użyciu wyodrębnionych i określonych serologicznie, a częściowo również chemicznie, frakcji antygenowych tych mikroorganizmów. Poza tym postanowiono przebadać *in vitro* wrażliwość *Histoplasma farciminosum* na niektóre antybiotyki fungistatyczne, zalecane obecnie w leczeniu grzybic. Podjęcie takich badań wydawało się uzasadnione, tak ze względów poznawczych jak i praktycznych. Pozycja systematyczna tego grzyba nie jest ustalona. Grzyb ten od chwili wyosobnienia go przez Rivoltę (1873) opisywany był kolejno pod następującymi nazwami — synonimami:

Cryptococcus farciminosus (Rivolta — 1873)

Saccharomyces equi (Tokishige — 1896)

Saccharomyces farciminosum (Vuillemin — 1901)

Endomyces farciminosus (Boquet i Negre, Eberbeck — 1926)

Blastomyces farciminosus (Bennet) — 1931

Histoplasma farciminosum (Redaelli, Ciferri — 1934)

Zymonema farciminosum (Dodge — 1935)

Obecnie dla określenia tego grzyba używa się jeszcze ciągle trzech synonimów, a mianowicie: *Cryptococcus farciminosus*, *Histoplasma farciminosum* i *Zymonema farciminosum*, przy czym najczęściej używana jest nazwa pierwsza.

Opublikowane dotychczas prace dotyczą głównie cech morfologicznych i metod hodowli, przy czym wszyscy autorzy (1, 3, 10, 17, 25, 31, 86, 89) wskazują na duże trudności przy izolacji i otrzymaniu czystych kultur tego grzyba. Związane to jest z niezmiernie powolnym wzrostem i częstym przerastaniem hodowli pleśniami. Ostatnio Bullen (10) i Singh (86) wykazali, że znacznie łatwiej czyste hodowle otrzymać można w posiewach z punktatów pobranych z ropni zamkniętych. Poza tym Bullen (9) stwierdził, że niezależnie od opisywanej postaci micelialnej (M), uznawanej za charakterystyczną dla tego grzyba, można na podłożach Hartleya inkubowanych w 37°C przy zwiększonym dopływie CO₂ otrzymać postać drożdżową (Y). Autor ten podkreśla, że w pierwszych pasażach to przejście w postać drożdżową spostrzegano tylko u części badanych szczepów i to przede wszystkim świeżo wyosobnionych. Właściwości biochemiczne postaci micelialnej tego grzyba badano wielokrotnie rutynową metodą na podłożach z cukrami i wszyscy autorzy (1, 3, 21, 31, 89) zgodnie stwierdzają, że nie posiada on zdolności fermentowania cukrów. Dość dokładnie opracowano również jego oporność na działanie czynników środowiskowych wykazując, że w sprzyjających okolicznościach zachowuje on w pełni żywotność i inwazyjność nawet przez okres 25 miesięcy (cyt. wg 1). Pozostałe prace badawcze dotyczą głównie zagadnień patogenetycznych, kliniki oraz leczenia epizootycznego zapalenia naczyń chłonnych koni (3, 10, 21, 24, 25, 59, 65, 68, 86, 88, 99, 100).

W dostępnym piśmiennictwie nie spotkano natomiast żadnych badań dotyczących struktury antygenowej oraz powiązań antygenowych tego grzyba z przedstawicielami tego samego i innych rodzajów. Biorąc pod uwagę stwierdzone w toku badań daleko idące pokrewieństwo antygenowe z *Hist. capsulatum* dla określenia tego grzyba, użyto nazwy *Histoplasma farciminosum*.

BADANIA WŁASNE

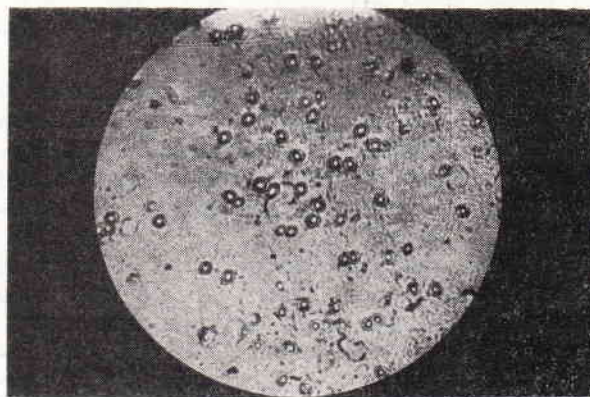
Materiał i metody

Do badań pobrano punktaty z ropni zamkniętych oraz wymazy z ropni otwartych od 27 koni wykazujących objawy kliniczne, charakterystyczne dla epizootycznego zapalenia naczyń chłonnych. Próbkę te badano mikroskopowo w preparatach niebarwionych w ciemnym polu widzenia oraz w preparatach barwionych metodami Grama (79), Sterka (91), PAS (41) i Kufferatha (wg 69). Każdą próbkę w której mikroskopowo stwierdzono obecność typowych dla *Hist. farciminosum* postaci pasożytniczych (tzw. kryptokoków) posiewano na podłoża stałe Sabourauda oraz Sabourauda z tiaminą w ilości 10 µg/ml (wg 69). Do obydwu podłoży dodawano penicylinę (50 j.m./ml i streptomycynę (50 µg/ml) dla zahamowania wzrostu towarzyszącej flory bakteryjnej. Jednocześnie zbadać przydatność tych samych podłoży z dodatkiem antybiotyku fungistatycznego cykloheksimidu, który w stężeniu 0,5 mg/ml jest zalecany (wg 69) do izolacji dermatofitów z materiału patologicznego. Użyto preparatu Actidione f-my Fluka AG. Switzerland. Dla kontroli bakteriologicznej wszystkie próbki posiewano na podłoża agarowe z krwią. Posiewy na podłożach Sabourauda inkubowano w 25°C, a na agarach z krwią w 37°C. Do namnażania grzybni wy-

próbowano podłoża płynne Sabourauda, Czapeka-Doxa w modyfikacji Bullena (9), Salvina-Hottla (wg 80) oraz płyn RTN. Płyn RTN produkowany jest standardowo przez Wytw. Sur. i Szczep. w Lublinie do namnażania tkanki nerki małpiej. Zawiera on 0,1% glikozy, 0,5% hydrolizatu laktoalbuminy, 2% surowicy cielej oraz antybiotyki bakteriostatyczne (penicyliny 72 j.m./ml, streptomycyny 60 µg/ml). Podłoże to uzupełniono tiaminą w ilości 10 mg/l. Do uzyskiwania postaci drożdżowej (Y) użyto podłoża stałego Francisca oraz podłoża płynnych Salvina-Hottla i RTN z dodatkiem biotyny 50 mg/l oraz cysteiny 1,8 g/l. Podłoża te inkubowano w 37°C. Każda seria podłoży była kontrolowana za pomocą wzorcowych szczepów *Crypt. albidus*, *Trich. verrucosum* oraz *Hist. capsulatum*, otrzymanych z C.B.S. Baarn i Inst. Med. Trop., Antwerpen. Wszystkie szczepy wytypowane do dalszych badań trzymano w 4°C na podłożach stałych Sabourauda z dodatkiem 20% jałowej ziemi ogrodowej oraz w próbkach z jałową wodą destylowaną wg zaleceń Castellaniego (15). Właściwości morfologiczne postaci micelialnej (M) i drożdżowej (Y) *Hist. farciminosum* prześledzono w skrawkach kolonii, przygotowanych wg ogólnie przyjętych metod histologicznych. Preparaty te barwiono metodami PAS w modyfikacji Klobke i Bülbringa (41), Gomori (28) i Kufferatha (wg 69). W badaniach własnych zdecydowano się na tę metodę, gdyż *Hist. farciminosum* rośnie niezmiernie powoli i próby założenia mikrohodowli nie powiodły się. Wykonywane dla celów kontrolnych mikrohodowle *Trich. mentagrophytes* udawały się bez trudu.

Wyniki

W preparatach niebarwionych z ropni zamkniętych stwierdzono we wszystkich przypadkach dość liczne owalne twory, z charakterystyczną podwójnie zarysowaną otoczką (fot. 1). W ropniach otwartych występowały



Fot. 1. Postać pasożytnicza *Histoplasma farciminosum*, — preparat niebarwiony z ropy. Widoczne charakterystyczne owalne komórki z podwójnie zarysowaną otoczką. (pow. 50 ×)

one pojedynczo lub po kilka egzemplarzy wewnątrz leukocytów, przy czym w większości próbek znajdowano je dopiero po przejrzaniu kilku preparatów. Po wykonaniu kilku prób wykazano, że przy bardzo skąpej ilości komórek grzybiczych w ropie można je zagęścić metodą flotacji, stosowaną powszechnie przy badaniu na gruźlicę, co umożliwia rozpoznanie już po obejrzeniu 1 preparatu.

Po porównaniu różnych metod barwienia okazało się, że postać pasożytnicza grzyba barwi się intensywnie i stosunkowo łatwo za po-

mocą różnych barwników po podgrzaniu preparatu, podobnie jak w metodzie Ziehl-Neelsena. Metodą Grama i Sterka barwiła się tylko wewnętrzna część komórki, otoczka pozostawała niezabarwiona i widoczny był tylko zewnętrzny jej zarys. Preparaty barwione na gorąco nie ulegały odbarwieniu pod wpływem alkoholu solnego, co wskazuje że postać pasożytnicza *Hist. farciminosum* cechuje alkoholo- i kwasooporność. W metodzie PAS wewnętrzną część komórki była różowa, a otoczka czerwona. W żadnym z oglądanych preparatów, barwionych met. Kufferatha, nie udało się stwierdzić tzw. askospor.

Wyniki badań hodowlanych przedstawia tab. 1.

Tab. 1. Wynik badania hodowlanego

Użyte podłoża stałe (po 10 skosów na 1 próbkę)	Ilość i rodzaj badanych próbek			
	27 punktatów z ropni zamkniętych		18 wyma- zów z ropni otwartych	
	ilość posie- wów	odsetek wyni- ków do- datnich	ilość posie- wów	odsetek wyni- ków do- datnich
Sabourauda	270	22,2	180	6,7
Sabourauda z tiaminą	270	36,3	170*	12,3
Sabourauda z cykloheksimidem	250**	31,8	180	21,2
Sabourauda z tiaminą i cykloheksimidem	270	60,7	160**	34,1

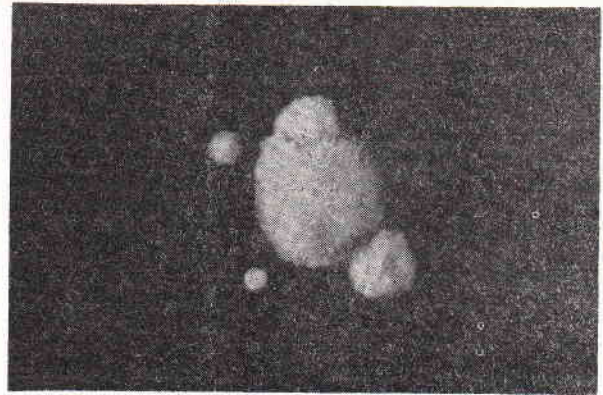
*, ** — 1 lub 2 próbki nie badane.

Jak wynika z tabeli, najwięcej dodatnich posiewów otrzymano z punktatów na podłożach Sabourauda z tiaminą i cykloheksimidem. Wyraźny stymulujący wpływ tiaminy wyrażał się wzrostem ilości uzyskanych kultur w granicach od 61 do 90%.

Cykloheksimid dał szczególnie dobre wyniki w posiewach z ropni otwartych, gdzie prawie połowa podłoży, bez tego antybiotyku przerażała w pierwszych dniach inkubacji pleśniami. Pozwolił on w tych przypadkach na uzyskanie mniej więcej trzykrotnie większej ilości kultur. W posiewach z ropni zamkniętych wpływ cykloheksimidu był o wiele słabiej zaznaczony, chociaż również widoczny.

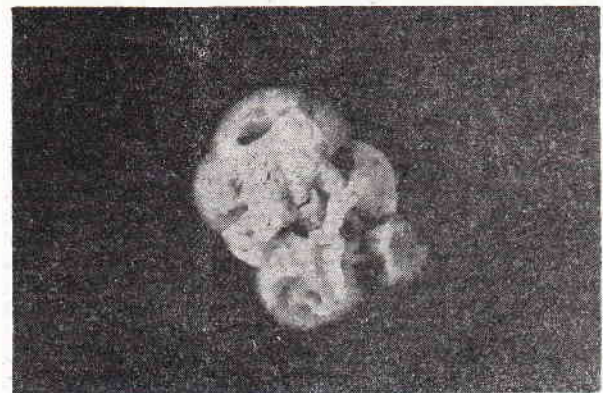
Porównując wyniki posiewów grzybiczych i bakteriologicznych zauważono, że w 5 próbkach z ropni otwartych, które przerośnięte były *Pseudomonas aeruginosa*, w żadnym przypadku nie uzyskano wzrostu grzybów, chociaż mikroskopowo stwierdzono ich obecność. Trzy wyosobnione szczepy *Pseudomonas* okazały się niewrażliwe na penicylinę oraz streptomycynę i przerosły użyte do hodowli grzybów podłoża. Poza *Pseudomonas aeruginosa* jako florę towarzyszącą w punktatach z ropni zamkniętych, od 3 koni wyosobniono *Streptococcus zooepi-*

demicus, a w 4 próbkach z ropni otwartych *Streptococcus zooepidemicus* i *Staphylococcus epidermidis*. W posiewach z tych próbek nie obserwowano zjawiska hamowania wzrostu grzyba. Na podłożach stałych, pierwsze oznaki wzrostu w postaci białego, delikatnego nalotu, pojawiły się pomiędzy 5 a 8 tygodniem po posiewie (fot. 2). Kolonie bardzo powoli po-



Fot. 2. Postać micelialna (M) — *Histoplasma farciminosum*, 6 — tyg. kolonia na podłożu Sabourauda (pow. 5 ×)

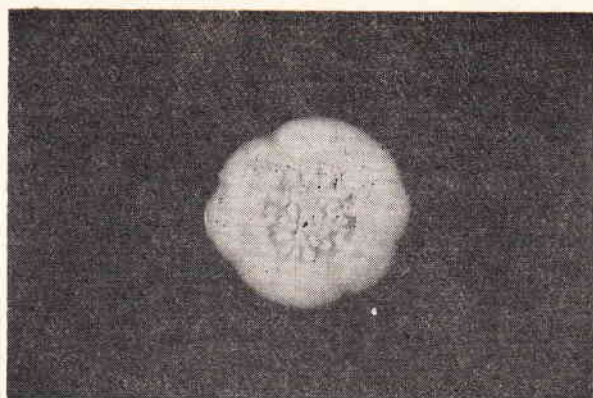
większały się, wrastając silnie w podłoże. W pełni wykształcone kolonie, których wygląd zewnętrzny zależny był od rodzaju podłoża, uzyskiwano po 12 lub 15 tygodniach wzrostu. Przy następnych pasażach na podłożach sztucznych, całkowicie wyrosnięte kolonie grzyba uzyskiwano już po 4—5 tygodniach. Na podłożach Sabourauda otrzymano postać micelialną (M). Grzybnia była koloru żółtawo-brązowego o konsystencji zbitej i pofałdowanej powierzchni (fot. 3). Średnica kolonii wahała się od 8 do 12 mm.



Fot. 3. Postać micelialna (M) — *Histoplasma farciminosum*, 3 mies. kolonia na podłożu Sabourauda (pow. 5 ×)

Rewersję postaci micelialnej w postać drożdżową otrzymano na podłożu Francisa po dwóch, a u starych, muzealnych szczepów dopiero po trzech lub czterech pasażach. Kolonie postaci drożdżowej były jasno-żółte, okrągłe, wypukłe o gładkich brzegach i średnicy od 7 do 9 mm (fot. 4).

W dodatkowym doświadczeniu wykazano, że jednorazowy pasaż przez 9 lub 12-dniowe za-



Fot. 4. Postać drożdżowa (Y) — *Histoplasma farciminosum*, 8 tyg. kolonia na podłożu Francisa (pow. 5 ×)

rodki kurze ułatwia przejście postaci micelialnej w drożdżową. Zarodki kurze zakażone doomocznioowo dawką 0,05 ml zawiesiny grzybni (o gęstości wg próbówki nr 3 skali Mac Farlanda) obumierały po 3 lub 5 dniach. W posiewach z zarodków na podłożach Francisa uzyskano wzrost czystej postaci drożdżowej. Spośród wypróbowanych podłoży płynnych do hodowli *Hist. farciminosum*, przydatne okazały się podłoża Salvina-Hottla oraz płyn RTN. Wzrost pierwszego pasażu na tych podłożach był bardzo wolny, gdyż makroskopowo widoczne kłębki grzybni spostrzegano dopiero po 2 miesiącach inkubacji. Następne pasaze uzyskiwano już po 3 lub 4 tygodniach. Wzrost grzybni na podłożu Czapeka-Doxa w modyfikacji Bullena (9) pojawiał się w pierwszym pasażu szybciej niż na pozostałych, bo już w 5—6 tygodniu, ale był bardzo niski i takim pozostawał pomimo kilkakrotnych pasażów. Biotyna i cysteina dodane do podłoża Salvina-Hottla i RTN powodowały całkowite przejście postaci micelialnej w drożdżową już po jednym pasażu i pozwalały na utrzymanie tej ostatniej w czystej postaci. Na wymienionych podłożach, postać micelialna tworzyła puszyste kolonie podobne makroskopowo do kłębków waty przytwierdzonych do dna lub ścian kolbki. Postać drożdżowa natomiast dawała skąpy osad pokrywający dno naczynia, składający się z gładkich, drobnych grudek, przypominających ziarna ryżu.

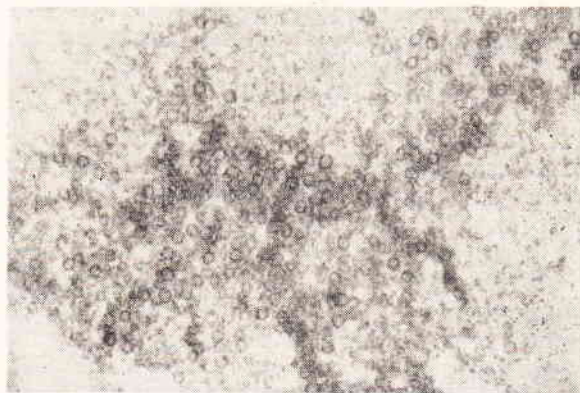
Przy badaniach porównawczych, okazało się że z 1 litra podłoża, najobfitsze zbiory grzybni w ilości 2,5 do 3,0 suchej masy o średniej zawartości ok. 4,2% azotu, oznaczonego met. Kjeldahla (rozrzut od 3,8—4,5%) otrzymano na płynie RTN. Zbiory z podłoża Salvina-Hottla były znacznie niższe i wahały się od 1,4 do 1,8 suchej masy z 1 litra, przy średniej zawartości 4,0% azotu. Wykonane po adaptacji szczepów na podłożu RTN trzykrotne oznaczenia wykazały, że cykloheksimid w stężeniach od 0,2 do 1,0 mg/ml nie hamuje wzrostu postaci micelialnej i drożdżowej *Hist. farciminosum* ani nie obniża zawartości azotu w grzybni. Właści-

wości morfologiczne obydwu postaci wzrostowych były podobne jak w posiewach kontrolnych. Dopiero w stężeniu 2,0 mg/ml spostrzegano pewne oznaki fungistatycznego działania cykloheksimidu, wyrażające się u postaci micelialnej wystąpieniem zjawiska pęcznienia nitki grzybni (curling factor) a u postaci drożdżowej obniżeniem zawartości azotu średnio do 2,8% przy 4,3% w kontroli.

W preparatach histologicznych sporządzonych z kolonii grzyba stwierdzono, że postać micelialna *Hist. farciminosum* składa się z segmentowanych, drzewkowato rozgałęzionych nitki grzybni, przy czym niektóre jej odcinki są kolbowato rozdęte (fot. 5). Na końcach nitki grzybni osadzone są różnej wielkości owalne lub okrągłe chlamydospory terminalne (fot. 7).

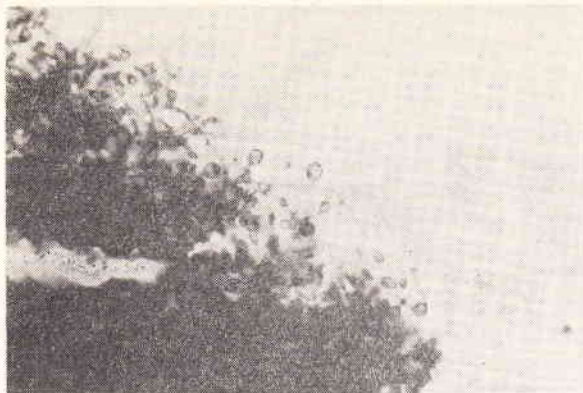


Fot. 5. Postać micelialna (M) — *Histoplasma farciminosum* — preparat histologiczny kolonii barwiony met. PAS. Widoczne segmentowane nitki grzybni. (pow. 60 ×)



Fot. 6. Postać drożdżowa (Y) — *Histoplasma farciminosum* — preparat histologiczny kolonii barwiony met. PAS. Widoczne okrągłe lub owalne komórki przypominające postać pasożytniczą. (pow. 60 ×)

Szczególnie dużo chlamydospor znajdowano na powierzchni zewnętrznej i brzegach kolonii, zwłaszcza w starej hodowli. Przy barwieniu metodą PAS (fot. 7) oraz Gomori (fot. 8) można zauważyć wyraźną, podwójnie zarysowaną otoczkę, co przyjmowane jest jako cecha charakterystyczna chlamydospor. Postać drożdżowa *Hist. farciminosum* składa się z okrągłych, drożdżo-podobnych komórek tzw. blastospor, kształtem i wielkością przypominających postać pasożytniczą (fot. 6). W żąd-



Fot. 7. *Histoplasma farciminosum* — preparat histologiczny kolonii barwiony met. PAS. Widoczne różnej wielkości chlamydospory osadzone na końcach grzybni. (pow. 60 ×)



Fot. 8. *Histoplasma farciminosum* — preparat histologiczny kolonii barwiony met. Gomori. Widoczne chlamydospory z podwójną zarysowaną otoczką. (pow. 60 ×)

nym z oglądanych preparatów postaci micelialnej i drożdżowej, barwionych met. Kufferratha nie stwierdzono obecności tzw. askospor.

Omówienie wyników

Przeprowadzone badania wykazały przydatność metody flotacji do zagęszczania komórek grzybiczych, przy mikroskopowym badaniu ropy. Postępowanie takie jest celowe, zwłaszcza przy badaniu materiału z ropni otwartych, gdzie postaci pasożytnicze *Hist. farciminosum* mogą występować w małych ilościach. Intensywniejsze barwienie postaci pasożytniczej po podgrzaniu preparatu pozwala sądzić, że wyższa temperatura ułatwia wnikanie barwnika. Dodatni odczyn w metodzie PAS wskazuje na obecność mukopolisacharydów, szczególnie w otoczce postaci pasożytniczej. Dla wykrycia elementów grzybiczych w ropie, zgodnie z danymi piśmiennictwa (1, 3, 10, 21, 59) wystarcza badanie preparatów niebarwionych. Ewentualną obecność komórek ziarninujących, które mogą przypominać postaci pasożytnicze *Hist. farciminosum*, można wykluczyć przez barwienie różnicujące, najlepiej metodą PAS. Nie pozwala to jednak na całkowicie pewne rozpoznanie choroby, zwłaszcza przy mało typowych objawach klinicznych, gdyż postaci pasożytnicze niektórych innych

grzybów *Blastomyces dermatitidis*, *Hist. capsulatum*, *Crypt. neoformans* są morfologicznie bardzo podobne. Rozstrzyga wyizolowanie i oznaczenie szczepu oparte dotychczas przede wszystkim na właściwościach morfologicznych kolonii i samej grzybni (1, 31, 89).

Wykonane badania hodowlane stanowią potwierdzenie wyników Bullena (10) i Singha (86), że izolacja grzyba jest łatwiejsza z materiału pobranego z ropni zamkniętych. Poza tym wykazano, że do wyosobnienia *Hist. farciminosum* przydatne są podłoża z dodatkiem penicyliny, streptomycyny oraz cykloheksimidu (aktydionu), gdyż pozwalają na otrzymanie czystych kultur z ropy zanieczyszczonej towarzyszącą florą bakteryjną lub sporami pleśni.

Negatywne wyniki posiewów, przy obecności w ropie *Pseudomonas aeruginosa* mogą być wynikiem często spotykanej oporności tych drobnoustrojów na streptomycynę, co umożliwia szybkie przerastanie i wyczerpywanie składników odżywczych podłoża. Nie można tutaj również wykluczyć antagonistycznego względnie antybiotycznego oddziaływania tego zarazka na *Hist. farciminosum* tym bardziej, że w dwóch próbkach ropy, gdzie szczepy *Pseudomonas* były wrażliwe na streptomycynę nie uzyskano również kultur grzyba. Wyjaśnienie tego zjawiska wymaga odpowiednich w tym kierunku badań.

Podłoża stałe z cykloheksimidem o stężeniu 0,5 mg/ml hamującym całkowicie wzrost większości pleśni, są zalecane (Kodama i wsp. 43) i coraz częściej obecnie stosowane do izolacji dermatofitów. Campbell (13) podaje, że również tzw. grzyby dimorficzne, a między innymi *Hist. capsulatum* są niewrażliwe *in vitro* na działanie tego antybiotyku w wymienionym stężeniu. Jak wykazano, podobne właściwości posiada *Hist. farciminosum* i dlatego podłoża z cykloheksimidem można zalecić do wyosobniania tego grzyba. Odmiennie natomiast zachowują się drożdżaki z rodzaju *Cryptococcus*. Seeliger (83) i inni badacze (4, 98) wielokrotnie wykazali wysoką wrażliwość tych drożdżaków na cykloheksimid, który już w stężeniu 0,1 mg/ml całkowicie hamuje ich wzrost, co potwierdzono w kontrolnych posiewach, użytych do badań szczepów *Crypt. neoformans*, *Crypt. albidus* i *Crypt. terreus*. Nie udało się również dotychczas adaptować tych drożdżaków przez hodowlę w stopniowo wzrastających stężeniach cykloheksimidu (Seeliger 83).

Z uwagi na to, że grzyb *Hist. farciminosum* silnie wrasta w podłoża stałe i niemożliwe było pobranie grzybni bez domieszki podłoża, zaistniała konieczność wytypowania jakiegoś podłoża płynnego, na którym można by uzyskać dowolną ilość grzybni, potrzebnej do uodparniania zwierząt i przygotowywania antygenów do badań serologicznych. Po wypró-

bowaniu kilku podłoży okazało się, że najobfitsze zbiory *Hist. farciminosum* uzyskiwano na płynie RTN i dlatego głównie to podłoże użyto do namnażania tym bardziej, że rosły na nim wszystkie pozostałe grzyby użyte do badań porównawczych. Płyn ten produkowany jest i kontrolowany w sposób standardowy przez WSS Lublin, co zapewnia w dużym stopniu jednakowe warunki hodowli.

W doświadczeniu nad hodowlą postaci drożdżowej, wykorzystano wyniki badań Salvina (74) który wykazał, że rewersja postaci micelialnej *Hist. capsulatum* w postać drożdżową zachodzi przy inkubowaniu w 37°C na podłożach z dodatkiem biotyny i cystyny lub cysteiny, a więc związków zawierających zredukowaną grupę S lub SH połączoną z małą molekułą organiczną. Wszystkie pozostałe aminokwasy, nawet o zbliżonej budowie chemicznej (metionina, metylcysteina), stymulowały tylko wzrost postaci micelialnej. Niekiedy jednak, jak to obserwowała Campbell (13) u muzealnych szczepów *Hist. capsulatum* i *Blast. dermatitidis*, nawet kilkakrotne pasaży na tych podłożach, nie powodują rewersji w postać drożdżową i wtedy konieczny jest pasaż grzyba przez wrażliwe zwierzęta laboratoryjne. Scherr i Rippon (78) uzyskiwali przejście postaci micelialnej *Hist. capsulatum* w drożdżową u jaszczurek i żab trzymanyh po zakażeniu w 37°C, podczas gdy w grupie kontrolnej, pozostawionej w temperaturze 25°C postać micelialna pozostała niezmienną. W badaniach własnych nad *Hist. farciminosum* wykazano, że pasaż przez zarodki kurze ułatwia uzyskanie postaci drożdżowej tego grzyba. Bullen (9) podaje, że dla hodowli drożdżowej *Hist. farciminosum*, prócz odpowiedniego podłoża i temperatury (37°C) konieczne jest stałe inkubowanie w warunkach mikroaerofilnych (zwiększona do 10—15% zawartość CO₂). Przy namnażaniu postaci drożdżowej tego grzyba na użytych podłożach płynnych okazało się, że już po dwóch pasażach adaptuje się on i rośnie dobrze w warunkach tlenowych. *Hist. farciminosum* podlega zatem zmienności morfologicznej i zależnie od składu podłoża oraz warunków hodowli rośnie w postaci micelialnej lub drożdżowej. Ta dwupostaciowość opisywana była u grzybów z rodzaju *Histoplasma*, *Blastomyces*, *Candida* i innych, nie obserwowano jej natomiast u przedstawicieli rodzaju *Cryptococcus*, które tak w organizmie jak i na podłożach sztucznych wytwarzają tylko komórki drożdżo-podobne, a więc cechuje je monomorfizm (Benham 4, Lodder i Kreger Van Rij — 50, Seeliger — 83).

Badania histologiczne są od dawna używane dla wykrywania elementów grzybiczych w tkankach chorych ludzi i zwierząt.

Wyniki badań własnych wskazują na możliwość posługiwania się tą metodą dla poznania struktury morfologicznej grzybni uzyski-

wanej na podłożach sztucznych, co może być przydatne zwłaszcza wtedy, kiedy założenie mikrohodowli jest trudne lub nawet niemożliwe. W skrawkach kolonii stwierdzono wszystkie opisywane przez innych badaczy (1, 9, 10, 31, 89) elementy morfologiczne *Hist. farciminosum*. Najlepsze wyniki dawało barwienie metodą PAS w modyfikacji Klobke i Bülbringa (4) przy której barwiły się wybiórczo elementy grzybicze, a agar pozostawał niebarwiony. Dodatnia reakcja chlamydospor przy barwieniu metodą PAS wskazuje, że zawierają one zasadowe mukopolisacharydy a nie wyłącznie substancje lipidowe, jak to sugeruje Spieciwcewa (89). Brak obecności askospor tak w postaci pasożytniczej jak i w obydwu postaciach wzrostowych (micelialnej i drożdżowej), wyklucza raczej przynależność tego grzyba do *Saccharomycetaceae*, co zgodne jest z poglądami Ainswortha i Austwicka (1) oraz Bullena (10). Spostrzeżenia dokonane przez Eberbecka (21) o występowaniu askospor u *Hist. farciminosum* są odosobnione i dotychczas nie udało się ich potwierdzić żadnemu z późniejszych badaczy, zajmujących się tym zagadnieniem.

Wnioski

1. Przy skąpej ilości postaci pasożytniczych *Hist. farciminosum* w ropie można je zagęścić metodą flotacji.

2. Do izolacji tego grzyba z ropy zanieczyszczonej florą bakteryjną i sporami pleśni zalecić można podłoża Sabourauda z penicyliną, streptomycyną i aktydionem.

3. Rewersję postaci micelialnej w drożdżową ułatwia pasaż grzyba przez 7—9 dniowe zarodki kurze.

4. Przy badaniu morfologicznym najlepsze wyniki daje barwienie skrawków kolonii metodą PAS w modyfikacji Klobke i Bülbringa.

Волошин С. — Свойства и антигенная структура *Histoplasma farciminosum*. I. Культивирование и морфологические свойства.

Исследовали образцы гноя от 27 лошадей больных Лymphangitis epizootica. Установили, что при скудном количестве этих грибов в гное хорошие результаты дает метод загущения паразитических форм при помощи флотации. Изоляцию чистых культур из материала загрязненного бактериями и спорами плесени дает среда Sabouraud с добавкой 50 j/ml пеницилина 50 µg/ml, стрептомицина и 0,5 mg/ml актидиена. Хорошими для выращивания грибов оказались жидкие среды по Salvin-Hottl и жидкость RTN с прибавкой 10 mg/l витамина B1. Дрожжевые формы *Hist. farciminosum* получали на среде Francis и жидкости RTN с биотином (50 mg/l) и цистеином (1,8 g/l). Реверсию мицелиальной формы в дрожжевую получали скоро, путем пассажа через 7—9 дневных куриных эмбрионов. При окраске отрезков колонии самые хорошие результаты получали методом PAS в модификации по Klobke и Bulbring. При этом методе окраски подверглись грибковые элементы (гифы, хламудоспоры) но не агар-агар.

Присутствия аскоспор в паразитической форме и в обеих культуральных формах *Hist. farciminosum* не установили.

Wołoszyn S. — The investigations on the nature and antigenic structure of *Histoplasma farciminosum*.

Part. I. Cultivation and morphological features.

For the investigations there were used samples of pus of 27 horses affected with lymphangitis epizootica. In case of the scanty occurrence of *Hist. farciminosum* in the pus the flotation method of condensing the parasite form of these fungi appeared most useful.

The Sabouraud's medium with penicillin (50 unit/ml) streptomycin (50 µg/ml) and Actidione (0,5 mg/ml) made possible the isolation of the pure cultures from the material infected with bacteria and mould spores.

The liquid Salvin — Hottl medium and the so-called RTN liquid with the addition of the vitamine B₁ (10 mg/l) appeared to be very useful in multiplying the mycelium. The yeast form of *Hist. farciminosum* was received on of Francis' medium and the RTN liquid with biotin (50 mg/l) and cysteine (1,8 g/l).

The quick reversion of the mycelial form into the yeast form was obtained by the passage by 7—9 days old chick embryos.

The PAS method modified by Klobke and Bulbring used in staining the sections of colonies gave the best results; the selective staining of the mycotic elements (mycelial strands, chlamydo-spores) was observed while agar stayed unstained.

The absence of ascospores in either the parasitic form or in both of the increasing forms (the mycelial and the yeast) of *Hist. farciminosum* was proved.

Wołoszyn S. — Untersuchungen über Eigenschaften und antigenen Bau von *Histoplasma farciminosum*. I Teil. GKultur und morphologische Eigenschaften.

Zu Untersuchungen gelangten Eiterproben der mit lymphangitis epizootica behafteten 27 Pferde. Es ist die Brauchbarkeit der Flotationsmethode zur Verdichtung der parasitären Formen *Hist. farciminosum* beim spärlichen Auftreten dieser Pilze im Eiter, festgestellt worden. Die Sabouraud Unterlage mit Penicillin (50 E/ml), Streptomycin (50 µg/ml) und Aktidion (0,5 mg/ml), gestattet Isolierung der Reinkulturen aus dem mit Bakterienflora und Pilzsporen verunreinigten Material. Zur Vermehrung des Mycelium haben sich flüssige Unterlagen Salvin-Hottl sowie die sog. Flüssigkeit RTN mit Zusatz von Vitamin B₁ (10 mg/l) sehr brauchbar erwiesen. Die Hefeform *Hist. farciminosum* erreichte man auf Francis Unterlagen und Flüssigkeit RTN mit Biotin (50 mg/l) und Cystein (1,8 g/l). Rasche Reversion der Micella in Hefeform brachte man im Wege der Passage durch 7—9 Tage alte Hühnerembryone, zustande. Beim Färben der Kulturstreifen lieferte die besten Ergebnisse die Methode PAS in der Modifikation Klobke und Bulbring, bei welcher sich die Pilzelemente (Myceliumfäden, Chlamydo-sporen) auswählerisch färbten, wobei Agar ungefärbt geblieben ist. Eine Anwesenheit von Askosporen sowohl in der parasitären wie auch in beiden Wachstumsformen (Mycella und Hefeform) wurden bei *Hist. farciminosum* nicht wahrgenommen.

STANISŁAW WOŁOSZYN

Badania nad właściwościami i budową antygenową *Histoplasma farciminosum* (*Cryptococcus farciminosus* — Rivolta) Część II. Właściwości biochemiczne

Katedra Epizootiologii Wydziału Weterynarii WSR w Lublinie
Kierownik: prof. dr S. KRAUSS

Celem pracy było zbadanie niektórych właściwości biochemicznych *Hist. farciminosum*. Z danych ośrodnego piśmiennictwa (1, 3, 21, 31, 89) wynika, że postać micelialna tego grzyba nie posiada zdolności fermentowania cukrów. Innych testów dla określenia właściwości biochemicznych dotychczas nie stosowano i dlatego podjęcie takich badań wydało się celowe ze względów poznawczych.

WYKORZYSTYWANIE PROSTYCH ZWIĄZKÓW JAKO JEDYNEGO ŹRÓDŁA AZOTU

Materiał i metody

Do badań użyto 16 szczepów *Hist. farciminosum*, w tym 6 wyosobnionych w kraju i 10 uzyskanych drogą wymiany z innych ośrodków naukowych. Były to szczepy: 91-IP, 92-IP, 402 (Inst. Med. Trop., Antwerpen); 94-IP, 96-IP, (Inst. Pasteur, Paris); V-4033, V-4574 i V-4788 (Centr. Vet. Lab., Weybrigde).

Podłoża kontrolowano szczepami: *Hist. capsulatum* Rv. 11928, Rv. 14665 (Inst. Med. Trop., Antwerpen); *Crypt. neoformans* 3078 (Sch. Hyg. Trop. Med., London); *Crypt. albidus* B 558 i *Crypt. terreus* A 933 (Fungus Cult. Coll., Atlanta).

Oznaczenia wykonano na podłożu wybiórczym Hefe-S-Basal-medium-Difco i wypróbowano następujące związki azotowe: azotan potasu — KNO₃, azotan sodu — NaNO₃, azotan amonu — NH₄NO₃, chlorek amonu — NH₄Cl, siarczan amonu — (NH₄)₂SO₄ — dodawane do podłoża w ilości 0,78%. Kontrolę

stanowiło w/w podłoże bez związków zawierających azot (K-I) oraz podłoża z dodatkiem 1% peptonu (K-II). Każdą serię podłoży sprawdzono za pomocą szczepów *Crypt. albidus* i *Crypt. terreus* cechujących się zdolnością asymilacji azotanów oraz szczepu *Crypt. neoformans*, który tej właściwości jest pozbawiony ale z kolei wykorzystuje azot zawarty w jonach amonowych. Jako inokulum użyto grzybní z 3-tygodniowej hodowli na podłożu płynnym Salvin-Hottla którą przemyto przez pięciokrotne wirowanie (3000 obr/min.) jałowym płynem fizjologicznym. Każdy szczep posiewano równocześnie na trzy skosy. Szczepy postaci micelialnej rodz. *Histoplasma* i szczepy rodz. *Cryptococcus* inkubowano w 25°, a pozostałe w 37° C. Oznaczenia powtórzono trzykrotnie. Posiewy oglądano co trzeci dzień przez okres 6 tygodni. Jako wynik dodatni przyjęto wystąpienie wzrostu podobnego jak na podłożu z peptonem (K-II) przy równoczesnym braku wzrostu na podłożu kontrolnym K-I.

Wyniki

Uzyskane wyniki przedstawia tab. 2. Jak widać, szczepy kontrolne rodzaju *Cryptococcus* i *Hist. capsulatum* asymilowały badane związki zgodnie z danymi piśmiennictwa (Seeliger — 80, 83; Wickerham i Burton — 98) co wskazuje, że użyte do oznaczeń podłoża były odpowiednie. W pojedynczych próbkach występował wprawdzie nieco słabszy wzrost niż w kontroli (K-II) ale po ponownym pasażu na