

Oznaczanie antygrzybiczej aktywności biobójczego preparatu Enizol

GRAŻYNA ZIÓŁKOWSKA, STANISŁAW TOKARZEWSKI

Zakład Mikrobiologii Weterynaryjnej Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR,
ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

Ziółkowska G., Tokarzewski S.

Determination of antifungal activity of Enizol: a specific disinfecting preparation

Summary

The objective of the present study was to evaluate the antifungal activity of Enizol, a new disinfecting preparation with enikonazole as the active substance. For both the studies *in vitro* and *in vivo* the initial concentration of Enizol was constituted by an aqueous solution of the preparation at a ratio of 1:100. The investigations covered 34 strains of the following mould fungi: *A. fumigatus* (n=5), *A. versicolor* (n=3), *Penicillium* spp. (n=5), *Cladosporium* spp. (n=4), *Scopulariopsis* spp. (n=3), *Fusarium* spp. (n=4), *Alternaria* spp. (n=5), *Mucor* spp. (n=5), as well as 10 strains of yeast-like fungi: *Candida albicans* (n=5) and *Candida non-albicans* (n=5). The minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal fungicidal concentration (MFC) of Enizol were determined *in vitro* according to NCCLS M27-A and by a cylinder dilution method. The MIC values for these organisms appeared to be differentiated and ranged from 0.07 μgml^{-1} (*A. versicolor*) up to 37.5 μgml^{-1} (*Mucor* spp.). A group of extremely sensitive fungi comprised *Aspergillus* spp. (0.07 - 1.2 μgml^{-1}), *Penicillium* spp. (0.07 - 1.2 μgml^{-1}) and *Alternaria* spp. (2.4 μgml^{-1}); *Cladosporium* spp. genus (4.75 μgml^{-1}) indicated the medium susceptibility toward the inhibitory activity of Enizol, whereas *Fusarium* spp. (9.5 μgml^{-1}), *Mucor* spp. (19.0 - 37.5 μgml^{-1}) and *Scopulariopsis* spp. (19.0 μgml^{-1}) had the lowest values. The antifungal efficacy of the studied preparation is confirmed by its lethal characteristics. The minimal fungicidal concentrations (MFC) were differentiated subject to the species of fungus studied. At the same time the sensitivity of the anascogenic yeast *Candida* genus was analyzed and consequently the fungi were classified among the organisms relatively resistant to (9.5 μgml^{-1} MIC, 37.5 μgml^{-1} MFC) Enizol activity. The studies *in vivo* confirmed the sensitivity of fimbriate fungi to the preparation and, usually, this was consistent with the tests *in vitro*. At the same time the antifungal efficacy of Enizol *in vivo* was demonstrated towards the fungi *Candida* genus, which indicates its usability as a lethal preparation in an environment where animals stay.

Keywords: geese, Enizol, yeast-like fungi, mould, MIC, MFC

Odnutowywany w ostatnich latach wzrost występowania infekcji grzybiczych, a szczególnie tzw. grzybic oportunistycznych, poza ludźmi i różnymi gatunkami ssaków w znacznej mierze dotyczy również ptaków (3, 5, 9). Pomimo stosowania coraz doskonalszych technologii produkcji drobiu oraz dbałości o zachowanie warunków higienicznych, stopień zakażenia ptaków i środowiska ich bytowania jest wysoki.

Infekcje oportunistyczne powodowane były najczęściej przez grzyby komensaliczne, takie jak np. *Candida albicans* (30) lub saprofity z rodzaju *Aspergillus* (1, 9). Nowym problemem stały się obecnie zakażenia grzybami sporadycznie dotąd związanymi z procesami chorobowymi. Do grupy tej zaliczyć należy, między innymi, grzyby strzępkowe z rodzaju *Fusarium*, *Acremonium*, *Scedosporium*, *Paecilomyces* i *Mucor* (14, 27), a także non-albicans gatunki *Candida* (*C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*), *Cryptococcus* spp. oraz *Trichosporon* spp. (9, 15, 31).

Konwersja oportunistycznych lub saprofitycznych grzybów w formę patogenną odbywa się najczęściej pod wpływem osłabienia ptaków, obniżenia ich odporności lub zaburzeń w składzie i funkcjonowaniu fizjologicznej mikroflory poszczególnych ontocenoz. Biorąc pod uwagę wzrastającą liczbę infekcji ptaków wywoływanych przez grzyby, pojawianie się nowych niezwykle groźnych patogenów, a także szczepów i gatunków grzybów opornych na powszechnie stosowane preparaty lecznicze, niezmiernie istotną wydaje się możliwość dysponowania szerokim arsenałem efektywnych preparatów przeciwgrzybiczych.

Ze względu na fakt, że głównym źródłem zakażenia stad jest środowisko ich bytowania, a także pasza (19), rozstrzygającą rolę w zwalczaniu grzybic u ptaków odgrywają antygrzybicze środki dezynfekcyjne aplikowane najczęściej w formie aerozolu lub zamgławień (22). W dużych fermach leczenia ptaków zakażonych grzybicą na ogół się nie stosuje (21).

Wśród dostępnych aktualnie na rynku preparatów antygrzybiczych jedynie mała ich część znalazła zastosowanie w zwalczaniu grzybic u ptaków. Należą do nich tiabendazol (17), amfoterycyna B (8, 13), flucytozyna (13), nystatyna (17), enilkonazol (18), itraconazol (6, 25) i flukonazol (13, 17, 18, 23, 25).

Ze względu na wysoką skuteczność antygrzybiczą, stabilność jego aktywności, bez względu na fizyczną formę preparatu (płyn, aerozol, świeca dymna), brak interferencyjnego oddziaływania z równocześnie stosowanymi środkami dezynfekcyjnymi oraz stosunkowo niską częstotliwość występowania niekorzystnych efektów ubocznych na szczególną uwagę zasługuje zaliczany do grupy imidazoli enilkonazol (7, 26). Preparat ten wchodzi w skład dostępnych na rynku antygrzybiczych środków dezynfekcyjnych o nazwach Imawerol – przeznaczony dla bydła, koni i psów oraz Clinafarm przeznaczony głównie dla drobiu (2).

Celem badań było określenie antygrzybiczej aktywności Enizolu, nowego preparatu, którego substancję czynną stanowi enilkonazol, przeznaczonego do zwalczania grzybów w środowisku bytowania drobiu, a także innych zwierząt.

Materiał i metody

Preparat przeciugrzybiczy. W badaniach zastosowano Enizol, produkt firmy Vet-Agro, którego substancję czynną stanowi enilkonazol, substancja syntetyczna z grupy imidazoli. Wyjściowe stężenie preparatu zarówno do badań *in vivo*, jak i *in vitro* stanowił wodny roztwór Enizolu w stosunku 1 : 100.

Badania *in vitro*

Szczepy. Badaniami objęto 34 szczepy grzybów pleśniowych stanowiących izolaty kliniczne i pochodzących z kolekcji własnej Zakładu Mikrobiologii Weterynaryjnej do których należały: *Aspergillus fumigatus* (n = 5), *Aspergillus versicolor* (n = 3), *Penicillium spp.* (n = 5), *Cladosporium spp.* (n = 4), *Scopulariopsis spp.* (n = 3), *Fusarium spp.* (n = 4), *Alternaria spp.* (n = 5), *Mucor spp.* (n = 5) oraz 10 szczepów grzybów drożdżopodobnych: *Candida albicans* (n = 5) oraz *Candida non-albicans* (n = 5).

Cylinderkowa metoda rozcieńczeń (28)

Inokulum. Szczepy grzybów pleśniowych namnażano przez okres 7 dni na stałym podłożu Sabourauda w temperaturze 25°C. Z uzyskanych kolonii wycinano korkoborem o średnicy 5 mm cylinderki agarowe, których powierzchnia pokryta była homogenną mikrokulturą grzyba. Materiał ten, pobierany z miejsc jednakowo oddalonych od centrum kolonii zawierał podobne jakościowo i ilościowo elementy grzyba i stanowił wystandaryzowane inokulum, niezbędne do badań.

W przypadku grzybów drożdżopodobnych inokulum stanowiła zawiesina komórek o gęstości 10⁵ jtk ml⁻¹ uzyskana z 48-godzinnej hodowli poszczególnych szczepów rodzaju *Candida* na stałym podłożu Sabourauda.

Oznaczanie minimalnego stężenia hamującego (MIC). Badania wykonano na płynnym podłożu Sabourauda (à 50 ml) zawierającym określone stężenia Enizolu wynoszące odpowiednio 150,0; 75,0; 37,5; 19,0; 9,5; 4,75;

2,4; 1,2; 0,6; 0,3; 0,15 i 0,075 µg substancji czynnej (enilkonazolu) w 1 ml podłoża. Do tak przygotowanych kolbek wprowadzono inokulum grzyba w postaci trzech cylinderków.

W przypadku grzybów drożdżopodobnych do 5 ml podłoża Sabourauda z odpowiednim stężeniem preparatu, wprowadzono 0,2 ml uprzednio przygotowanego inokulum. Kontrolę stanowiły analogiczne posiewy na podłożu Sabourauda bez dodatku preparatu. Wyniki odczytywano po 3 dniach (rodzaj *Candida*) oraz po 7 dniach inkubacji w temperaturze 25°C lub 37°C (rodzaj *Candida spp.*, *Aspergillus fumigatus*). Za wartość MIC przyjmowano stężenie leku całkowicie hamujące wzrost grzyba.

Oznaczanie minimalnego stężenia grzybobójczego (MFC). Hodowle grzybów uznane po 3 dniach (*Candida spp.*) lub 7 dniach obserwacji za negatywne (brak wzrostu) w próbie MIC, inkorporowano w stałe podłożo Sabourauda bez dodatku leku. Inkubację posiewów prowadzono przez 3 dni (rodzaj *Candida*) lub 7 dni (grzyby pleśniowe) w temperaturze 25°C i 37°C. Jako MFC przyjmowano stężenie preparatu powodujące całkowite hamowanie wzrostu grzybów (ocena makroskopowa).

Badania *in vivo*

Programem dezynfekcji objęto 3 fermy hodowlane gęsi reprodukcyjnych, z których każda liczyła około 500 ptaków. Oprysk obiektów wodnym roztworem Enizolu o stężeniu 1 : 100 (10 ml preparatu na 1 litr wody) prowadzono przez 3 kolejne dni. Antygrzybiczą aktywność preparatu oceniano na podstawie jakościowych i ilościowych zmian mikroflory grzybiczej w badanych stadach gęsi. W tym celu od 10 losowo wybranych z każdego stada ptaków pobierano wymazy z jamy dziobowej w trzech ustalonych terminach: bezpośrednio przed przeprowadzeniem dezynfekcji (I termin), a następnie 3 dni (II termin) po trzecim oprysku oraz 10 dni (III termin) po trzecim oprysku.

Pobrany materiał inokulowany na stałe podłożo Sabourauda (z dodatkiem chloramfenikolu) inkubowano równolegle w temperaturze 25°C i 37°C do 14 dni. Identyfikację uzyskanych hodowli przeprowadzono klasycznymi metodami mikologicznymi z wykorzystaniem komercyjnego testu API 20C i API 20C Aux (bioMerieux) dla grzybów drożdżopodobnych oraz klucza identyfikacyjnego do oznaczania grzybów strzępkowych według St-Germain i Summerbell (23).

Wyniki i omówienie

Antygrzybiczą aktywność Enizolu, syntetycznego preparatu z grupy imidazoli, określono *in vitro* w stosunku do szczepów z rodzaju *Candida* (n = 10) oraz powszechnie występujących w środowisku przedstawicieli grzybów pleśniowych należących do: *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*, *Cladosporium spp.*, *Scopulariopsis spp.*, *Fusarium spp.*, *Alternaria spp.*, *Mucor spp.* (n = 34). Zastosowana w badaniach cylinderkowa metoda rozcieńczeń (28) charakteryzowała się przede wszystkim dobrą standaryzacją inokulum grzybów strzępkowych, co w innych stosowanych dotychczas technikach było trudne do uzyskania (10, 16, 20).

Klasyczna metoda cylinderkowa opracowana do badania wrażliwości dermatofitów, wymagała jednak

Tab. 1. MIC i MFC Enizolu dla wybranych gatunków grzybów oportunistycznych

Szczepy	n	MIC μgml^{-1}	MFC μgml^{-1}
<i>Alternaria spp.</i>	5	2,40	2,40
<i>Aspergillus fumigatus</i>	5	1,20	4,75
<i>Aspergillus versicolor</i>	3	0,07	0,07
<i>Candida albicans</i>	5	9,50	37,50
<i>Candida non-albicans</i>	5	9,50	37,50
<i>Cladosporium spp.</i>	4	4,75	37,50
<i>Fusarium spp.</i>	4	9,50	19,00
<i>Mucor spp.</i>	5	19,0-37,5	> 150,0
<i>Penicillium spp.</i>	5	0,60	19,00
<i>Scopulariopsis spp.</i>	3	19,00	> 150,0

wprowadzenia pewnych modyfikacji w przypadku grzybów pleśniowych. Obserwowano bowiem w stałym podłożu Sabourauda widoczny, choć ograniczony do płaszczyzny wertykalnej, wzrost inokulum, bez względu na stężenie preparatu antygrzybiczego. Wprowadzenie podłoża płynnego, dzięki równoczesnemu kontaktowi bezpośredniemu wszystkich komórek inokulum z badanym preparatem, zapobiegło wykorzystaniu przez grzyby śladowych ilości substancji odżywczych, znajdujących się w cylinderku agarowym inokulum, czyli eliminowało ewentualny „nieswoisty” wzrost hodowli. Dermatofity ze względu na wyższe wymagania wzrostowe oraz znacznie dłuższy czas generacji bez względu na zastosowaną formę podłoża nie wykazywały tego typu wzrostu (28).

Badania *in vitro* pozwoliły ustalić, że Enizol charakteryzuje się wysoką aktywnością antygrzybiczą w stosunku do testowanych grzybów (tab. 1). Wartości MIC dla tych organizmów były zróżnicowane i zawierały się w przedziale od $0,07 \mu\text{gml}^{-1}$ (*Aspergillus versicolor*) do $37,5 \mu\text{gml}^{-1}$ (*Mucor spp.*). Do grupy grzybów szczególnie wrażliwych zaliczyć należy *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.* oraz *Alternaria spp.*; rodzaj *Cladosporium spp.* cechowała średnia, a *Fusarium spp.*, *Mucor spp.* i *Scopulariopsis spp.* najniższa podatność na hamujące działanie Enizolu (tab. 1). Antygrzybiczą skuteczność badanego preparatu potwierdzają również jego właściwości bójcze. Minimalne stężenie (MFC) w tym zakresie, było zróżnicowane i zależało od rodzaju badanego szczepu. Jedynie w przypadku grzybów z rodzaju *Mucor* i *Scopulariopsis* stosowane stężenia Enizolu (do $150,0 \mu\text{gml}^{-1}$) okazały się nieskuteczne (tab. 1). Równolegle testowana wrażliwość drożdżaków z rodzaju *Candida* (tab. 1) klasyfikowała je do grupy drobnoustrojów stosunkowo opornych ($9,5 \mu\text{gml}^{-1}$ MIC, $37,5 \mu\text{gml}^{-1}$ MFC) na działanie Enizolu. W dostępnym piśmiennictwie stosunkowo mało jest danych odnośnie oceny *in vitro* aktywności substancji czynnej Enizolu – enilikonazolu. Ustalono (26), że podobnie jak w obecnych badaniach, preparat ten charakteryzuje się wysoką skutecz-

nością antygrzybiczą w stosunku do *A. fumigatus* (MIC wynosi $0,1-1 \mu\text{gml}^{-1}$) oraz stosunkowo słabym oddziaływaniem na grzyby z rodzaju *Candida*. Również dermatofity, bez względu na gatunek, cechują się wysoką wrażliwością (28).

Brak informacji dotyczących wrażliwości innych gatunków grzybów strzępkowych na enilikonazol, w tym stanowiących potencjalne zagrożenie zdrowia, a nawet życia ludzi i zwierząt, grzybów oportunistycznych jak np. *Fusarium spp.*, *Alternaria spp.* czy *Mucor spp.*, uniemożliwia pełną analizę uzyskanych obecnie wyników. Ze względu natomiast na fakt, że antygrzybicza aktywność azoli jest wysoce zróżnicowana i zależy zarówno od rodzaju preparatu, jak i gatunku grzyba, a dokładnie jego cytochromu P450 (12), nie można przeprowadzić analogii między dobrze poznaną aktywnością w tym zakresie (4, 12, 24) najnowszej generacji pochodnych z tej grupy leków, ze skutecznością enilikonazolu. Analizując uzyskane dane (tab. 1) należy podkreślić wysoką aktywność *in vitro* badanego preparatu w stosunku do grzybów oportunistycznych z rodzajów: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* i *Cladosporium*. Pozostałe z testowanych rodzajów, tj. *Fusarium*, *Mucor* czy *Scopulariopsis* podobnie jak w przypadku stosowania innych preparatów (4, 12, 24) charakteryzowały się wysokim stopniem niewrażliwości.

Uwzględniając fakt, że wartości uzyskane w statycznych oznaczeniach aktywności preparatów antygrzybiczych *in vitro* (MIC) nie odzwierciedlają w sposób bezpośredni ich oddziaływania w warunkach klinicznych (10, 11), podjęto próbę oceny skuteczności preparatu Enizol w środowisku naturalnym gęsi hodowlanych. Badania przeprowadzono w trzech wytypowanych fermach hodowlanych o zbliżonej liczebności stad, ale zróżnicowanych warunkach środowiska. Wykazano, że bez względu na rodzaj budynku, w jakim przebywały ptaki (drewniany lub murowany), flora grzybicza izolowana z ich jamy dziobowej była zbliżona (tab. 2-4) i obejmowała przedstawicieli z rodzaju *Acremonium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Mucor* i *Candida*.

Stopień zakażenia poszczególnych stad był na ogół niski, przy czym najczęściej izolowano grzyby drożdżopodobne z rodzaju *Candida* zaliczane do grupy *C. non-albicans*, takie jak: *C. krusei*, *C. parapsilosis* i *C. lusitaniae* (tab. 2-4). *C. albicans* występowała jedynie na błonach śluzowych jamy dziobowej gęsi ze stada III (tab. 4). Efektywność procesu dezynfekcji oceniona na podstawie zmian stopnia kolonizacji florą grzybiczą błon śluzowych przebywających tam ptaków była stosunkowo wysoka. Trzy dni po odkażaniu stwierdzono (tab. 2-4) eliminację z błon śluzowych jamy dziobowej gęsi *Cladosporium spp.* (stado II), *Aspergillus fumigatus* (stado II), *Epicoccum spp.* (stado II) oraz wyraźne obniżenie stopnia kolonizacji przez *Penicillium spp.* (stado I i II), *Acremonium spp.* (stado I i II) i *Beauveria spp.* (stado II), a także drożdżaki z rodzaju *Candida* (stado I i II).

Tab. 2. Aktywność Enizolu w badaniach *in vivo* – stado I

Rodzaj grzyba	I termin		II termin		III termin	
	Liczba ptaków*	Liczba kolonii	Liczba ptaków*	Liczba kolonii	Liczba ptaków*	Liczba kolonii
<i>Acremonium spp.</i>	1	6	1	1	0	0
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Aspergillus ustus</i>	0	0	0	0	2	3
<i>Candida non-albicans</i>	7	254	7	48	3	26
<i>Cladosporium spp.</i>	2	2	0	0	0	0
<i>Fusarium spp.</i>	0	0	0	0	2	3
<i>Mucor spp.</i>	3	3	3	3	2	3
<i>Penicillium spp.</i>	4	37	3	17	3	4

Objaśnienia: I termin – materiał pobrany przed dezynfekcją, II termin – materiał pobrany 3 dni po dezynfekcji, III termin – materiał pobrany 10 dni po dezynfekcji; * Liczba ptaków, od których izolowano określony gatunek grzyba (na 10 sztuk badanych)

Tab. 3. Aktywność Enizolu w badaniach *in vivo* – stado II

Rodzaj grzyba	I termin		II termin		III termin	
	Liczba ptaków*	Liczba kolonii	Liczba ptaków*	Liczba kolonii	Liczba ptaków*	Liczba kolonii
<i>Acremonium spp.</i>	2	5	1	1	0	0
<i>Alternaria spp.</i>	4	6	0	0	0	0
<i>Aspergillus fumigatus</i>	2	2	0	0	0	0
<i>Aspergillus ustus</i>	0	0	2	3	4	9
<i>Beauveria spp.</i>	5	41	1	5	0	0
<i>Candida non-albicans</i>	4	120	2	29	3	5
<i>Epicoccum spp.</i>	2	2	0	0	0	0
<i>Penicillium spp.</i>	3	14	2	9	4	8

Objaśnienia: jak w tab. 2.

Tab. 4. Aktywność Enizolu w badaniach *in vivo* – stado III

Rodzaj grzyba	I termin		II termin		III termin	
	Liczba ptaków*	Liczba kolonii	Liczba ptaków*	Liczba kolonii	Liczba ptaków*	Liczba kolonii
<i>Acremonium spp.</i>	3	24	2	17	0	0
<i>Aspergillus fumigatus</i>	2	8	2	6	0	0
<i>Aspergillus ustus</i>	0	0	0	0	3	4
<i>Candida albicans</i>	2	76	1	45	0	0
<i>Candida non-albicans</i>	6	150	3	145	0	0
<i>Cladosporium spp.</i>	3	6	3	9	0	0
<i>Cryptococcus spp.</i>	2	23	1	83	0	0
<i>Penicillium spp.</i>	0	0	0	0	2	97

Objaśnienia: jak w tab. 2.

Drugi termin badania, tj. 10 dni po dezynfekcji (tab. 2-4), potwierdził w większości przypadków wrażliwość badanych grzybów na Enizol. Na błonach śluzowych ptaków nie wykazywano nadal obecności *Cladosporium spp.* (stado I), *Alternaria spp.* (stado II), *Aspergillus fumigatus* (stado II), *Epicoccum spp.* (stado II),

a dodatkowo odnotowywano eliminację grzybów z rodzaju *Acremonium spp.* (stado I i II), *Beauveria spp.* (stado II) oraz dalsze obniżenie liczby przypadków izolacji *Penicillium spp.* (stado I) i *Candida spp.* (stado I i II).

W trakcie badań od ptaków izolowano również nowe gatunki grzybów, jak np.: *Fusarium spp.* (stado I), *Aspergillus ustus* (stado I i II). Należy przypuszczać, że grzyby te albo dostały się do środowiska ptaków po przeprowadzeniu dezynfekcji (np. *Aspergillus ustus*), albo na skutek niskiej wrażliwości na Enizol zachowały zdolność do wzrostu i namnażania się (*Fusarium spp.*).

Badania *in vivo* potwierdzające wrażliwość grzybów strzępkowych na enilkonazol – substancję czynną Enizolu (1, 7, 28, 29) są na ogół zgodne z przeprowadzonymi testami *in vitro* (tab. 1). Najbardziej odporne w badaniach *in vitro* (tab. 1) grzyby należące do rodzaju *Mucor* były również bardzo trudne do wyeliminowania ze środowiska ptaków (tab. 2) i mimo trzykrotnej dezynfekcji utrzymywały się na zbliżonym poziomie na ich błonach śluzowych przez cały czas badania. Na podkreślenie zasługuje natomiast fakt dość wysokiej skuteczności *in vivo* Enizolu w eliminacji zakażeń wywołanych przez grzyby drożdżopodobne z rodzaju *Candida* (tab. 2, 3) charakteryzujące się raczej niską wrażliwością *in vitro*.

Właściwa interpretacja wyników przedstawionych w tab. 4 wymaga uwzględnienia faktu, że dezynfekcja w stadzie 3 przeprowadzona została w terminie późniejszym tj. w II terminie badania (wywiad z właścicielem). Przyjmując więc dopiero termin III jako badanie właściwe, należy stwierdzić że również w tym przypadku skuteczność Enizolu była wysoka (tab. 4).

Reasumując, uzyskane wyniki pozwalają zaklasyfikować Enizol do preparatów antygrzybiczych charakteryzujących się *in vitro* szerokim

spektrum aktywności w stosunku do strzępkowych grzybów oportunistycznych. Wstępne badania aplikacyjne potwierdziły skuteczność preparatu, poszerzając nawet jego oddziaływanie o rodzaj *Candida*, a także, co wykazano we wcześniejszych doniesieniach (7, 28) *Trichophyton spp.* i *Microsporium spp.* Należy więc

przypuszczać, że Enizol może znaleźć zastosowanie jako preparat biobójczy, służący do skutecznego eliminowania grzybów ze środowiska bytowania ptaków, a także innych zwierząt.

Piśmiennictwo

1. *Akan M., Haziroğlu M., J̄lham Z., Sareyyüpoğlu B., Tunca R.*: A case of aspergillosis in a broiler breeder flock. *Avian Dis.* 2002, 46, 497-501.
2. *Anon.*: Clinafarm® Fungicide Technical Manual. Millsboro D. E.: Mallin-crodt Vet. Inc. 1995.
3. *Atasever A., Gümüşsoy K. S.*: Pathological, clinical and mycological findings in experimental aspergillosis infections of starlings. *J. Vet. Med. A* 2004, 51, 19-22.
4. *Diekema D. J., Messer S. A., Hollis R. J., Jones R. N., Pfaller M. A.*: Activities of caspofungin, itraconazole, posaconazole, ravuconazole, voriconazole and amphotericin B against 448 recent clinical isolates of filamentous fungi. *J. Clin. Microbiol.* 2003, 41, 3623-3626.
5. *Flemming R., Walsh T. J., Anaissie E.*: Emerging and less common fungal pathogens. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* 2002, 16, 915-933.
6. *Gümüşsoy K. S., Uyanik F., Atasever A., Çam Y.*: Experimental *Aspergillus fumigatus* infection in quails and results of treatment with itraconazole. *J. Vet. Med. B* 2004, 51, 34-38.
7. *Hnilica K. A., Medleau L.*: Evaluation of topically applied enilconazole for the treatment of dermatophytosis in a Persian cattery. *Vet. Dermatol.* 2002, 13, 23-28.
8. *Lin M. Y., Huang K. J., Kleven S. H.*: In vitro comparison of the activity of various antifungal drugs against new yeast isolates causing thrush in poultry. *Avian Dis.* 1989, 33, 416-421.
9. *Maertens J., Verbos M., Boogaerts M.*: Assessing risk factors for systemic fungal infections. *Eur. J. Cancer Care* 2001, 10, 56-62.
10. *Meletiadis J., te Dorsthorst D. T. A., Verweij P. E.*: Use of turbidimetric growth curves for early determination of antifungal drug resistance of filamentous fungi. *J. Clin. Microbiol.* 2003, 41, 4718-4725.
11. *Mueller M., de la Peña A., Derendorf H.*: Issues in pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-infective agents: kill curves versus MIC. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004, 48, 369-377.
12. *Odds F. C., Brown A. J. P., Gow N. A. R.*: Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol.* 2003, 11, 272-279.
13. *Orosz S., Frazier D. L.*: Antifungal agents: a review of their pharmacology and therapeutic indications. *J. Avian Med. Surgery* 1995, 9, 8-18.
14. *Pfaller M. A., Diekema D. J.*: Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *J. Clin. Microbiol.* 2004, 42, 4419-4431.
15. *Pfaller M. A., Diekema D. J.*: Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*. *Clin. Microbiol. Infect. (Suppl. 1)* 2004, 10, 11-23.
16. *Pfaller M. A., Sheehan D. J., Rex J. H.*: Determination of fungicidal activities against yeasts and molds: lessons learned from bactericidal testing and the need for standardization. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004, 17, 268-280.
17. *Reding P. T., Duke G. E.*: Comparative pharmacokinetics of antifungal drug in domestic turkeys, red-tailed hawks, broad-winged hawks and great-horned owls. *Avian Dis.* 1985, 29, 649-661.
18. *Redmann T., Schildger B.*: Therapeutic use of enilconazole in broiler chicks with aspergillosis. *Dt. Tierärztl. Wschr.* 1989, 96, 15-17.
19. *Reece R. L., Taylor T. K., Dickson D. B.*: Mycosis of commercial Japanese quail, ducks and turkeys. *Aust. Vet. J.* 1986, 63, 196-197.
20. *Rex J. H., Pfaller M. A., Walsh T. J., Chaturvedi V., Espinel-Ingroff A., Ghannoum M. A., Gosey L. L., Odds F. C., Rinaldi M. G., Sheehan D. J., Warnock D. W.*: Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. *Clin. Microbiol. Rev.* 2001, 14, 643-658.
21. *Rochette F., Engelen M., Vanden Bossche H.*: Antifungal agents of use in animal health – practical applications. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 2003, 26, 31-53.
22. *Rochette F.*: The battle against aspergillosis. *Poultry-Misset.* 1985, 4, 54-57.
23. *St-Germain G., Summerbell R.*: Identifying Filamentous Fungi. A Clinical Laboratory Handbook. Star Publishing Company, Belmont, California 1996.
24. *Uchida K., Kokota N., Yamaguchi H.*: In vitro antifungal activity of posaconazole against various pathogenic fungi. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2001, 18, 167-172.
25. *Van Cutsem J., Van Gerven F., Janssen P. A. J.*: Le traitement de l'aspergillose experimentale par l'enilconazole et par itraconazole. *Bull. Soc. Française de Mycologie Medicale* 1989, 18, 55-59.
26. *Vanden Bossche H., Engelen M., Rochette F.*: Antifungal agents of use in animal health-chemical, biochemical and pharmacological aspects. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 2003, 26, 5-29.
27. *Walsh T. J., Groll A., Jimenez J., Flemming R., Roilides E., Anaissie E.*: Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. *Clin. Microbiol. Infect.* 2004, 10, 48-66.
28. *Wawrzkiwicz K., Ziółkowska G., Sadzikowski Z.*: Oznaczenie wrażliwości dermatofitów na preparaty przeciwgrzybowe cylindrową metodą rozcieńczeń w agarze. *Medycyna Wet.* 2000, 56, 648-652.
29. *White-Wheeters N., Medleau L.*: Evaluation of topical therapies for the treatment of dermatophyte-infected hairs from dogs and cats. *J. Am. Anim. Hosp. Ass.* 1995, 31, 250-253.
30. *Wyatt R. D., Hamilton P. B.*: *Candida* species and crop mycosis in broiler chickens. *Poultry Sci.* 1975, 54, 1663-1666.
31. *Ziółkowska G., Tokarzewski S.*: Występowanie grzybów drożdżopodobnych w stadach gęsi reprodukcyjnych. *Medycyna Wet.* 2005, 61, 1181-1185.

Adres autora: dr hab. Grażyna Ziółkowska, prof. nadzw. AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin; e-mail: gziolkowska@ar.lublin.pl