

Grzyby z rodzaju *Aspergillus* – różnicowanie gatunkowe a wrażliwość na preparaty antygrzybicze

Aspergillus genus – species diversifying but the sensitivity to antifungal preparations

Grażyna Ziółkowska, Stanisław Tokarzewski, Aneta Nowakiewicz

Zakład Mikrobiologii Weterynaryjnej Instytutu Biologicznych Podstaw Chorób Zwierząt UP w Lublinie

ADRES DO KORESPONDENCJI: Prof. dr hab. Grażyna Ziółkowska
Zakład Mikrobiologii Weterynaryjnej, Instytut Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy,
ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin; e-mail: grazyna.ziolkowska@up.lublin.pl

STRESZCZENIE **Wprowadzenie:** Aspergiloza należy do najczęściej występujących grzybiczych infekcji układu oddechowego ptaków. Chorują wszystkie gatunki drobiu, ptaki ozdobne oraz dzikie – szczególnie gatunki drapieżne przetrzymywane w niewoli.

C **el pracy:** Ustalenie wrażliwości różnych gatunków rodzaju *Aspergillus* uzyskanych ze stad hodowlanych drobiu na ogólnie dostępne leki, a także próba określenia ich profili oporności.

Material i metody: Badania obejmowały izolaty grzybów z rodzaju *Aspergillus* uzyskane od kur, indyków, gęsi i kaczek z klinicznymi objawami aspergilozy o zróżnicowanym nasileniu. Wrażliwość szczepów *Aspergillus* spp. na preparaty antygrzybicze oznaczano na stałym podłożu Sabourauda metodą dyfuzyjno-krążkową w modyfikacji własnej.

W **yniki:** Wykazano, że bez względu na gatunek grzyba, rodzaj *Aspergillus* cechuje się wysoką wrażliwością na enilkonazol i terbinafinę oraz opornością na 5-fluorocytozynę, flukonazol, itraconazol i amfoterycynę B. Aktywność antygrzybicza pozostałych preparatów, tj. ketokonazolu, mikonazolu, klotrimazolu, pimarycyny i tiokonazolu, jest zróżnicowana i wydaje się zależeć od gatunku *Aspergillus*.

W **nioski:** Szczepy *Aspergillus* wyizolowane od ptaków cechuje *in vitro* wysoka oporność na leki przeciwgrzybicze, której poziom wydaje się zależeć w pewnym stopniu od gatunku grzyba.

SŁOWA KLUCZOWE: *Aspergillus*, pleśnie, leki przeciwgrzybicze, aktywność przeciwgrzybicza

ABSTRACT **Introduction:** Aspergillosis is included in most often appearing mycotic infections of the respiratory system of birds. All species of poultry, ornamental bird and wild can be ill – particularly birds of prey kept in the captivity.

Aim of study: Establishing the sensitivity of various species of the *Aspergillus* genus get from the poultry flocks to readily available drugs, as well as the attempt to determine their profiles of the resistance.

Material and methods: Examinations included fungal isolates from the *Aspergillus* genus get from hens, turkeys, geese and ducks with clinical symptoms of aspergillosis about the diversified intensity. *Aspergillus* species sensitivity to antifungal drugs were determinate with Sabouraud glucose agar with disc diffusion method in the own modification.

Results: We demonstrated, that irrespective of fungus species, the *Aspergillus* genus is marked by a high sensitivity on enilconazole and terbinafine and with resistance on 5-fluorocytosine, fluconazole, itraconazole and amphotericin B. Antifungal activity of remaining drugs, *i.e.* ketoconazole, miconazole, clotrimazole, pimarinic and tioconazole, are diversified and seem to depend on the *Aspergillus* species.

C **onclusions:** An *in vitro* high antifungal drug resistance is characterizing *Aspergillus* species isolated from birds which the level seems to depend to some extent on species of the fungus.

KEY WORDS: *Aspergillus*, moulds, antifungal drugs, antifungal activity

Wprowadzenie

Aspergiloza należy do najczęściej występujących grzybiczych infekcji układu oddechowego ptaków. Chorują wszystkie gatunki drobiu, ptaki ozdobne oraz dzikie – szczególnie gatunki drapieżne przetrzymywane w niewoli. Najwyższą wrażliwością cechują się embriony i pisklęta, u których choroba ma przebieg ostry, kończący się wysokim odsetkiem upadków (70-90%) (1). U ptaków dorosłych zakażenie występuje na ogół w formie chronicznej, charakteryzującej się zmianami ziarniniakowatymi w płucach i workach powietrznych (2-4). Śmiertelność w tych przypadkach jest sporadyczna, ale dochodzi do wraźnych spadków w wagę i oporność na nieśności (wysokie straty ekonomiczne). Od chorujących ptaków izoluje się najczęściej *Aspergillus fumigatus*, a także – szczególnie w ostatnich latach – *A. flavus*, *A. niger*, *A. glaucus* czy *A. nidulans* (2, 5-8).

Zwalczanie aspergilozy, szczególnie w stadach drobiu, oparte jest przede wszystkim na profilaktycznych programach dezynfekcji inkubatorów, klujników, wylęgarni oraz pomieszczeń hodowlanych, przeciwgrzybiczymi preparatami biobójczymi (9). Terapeutyczne stosowanie leków w tej grupie ptaków jest na ogół ograniczone.

Leczenie przypadków aspergilozy ptaków ozdobnych i drapieżnych (hodowle wolirowe) jest prowadzone empirycznie i wymaga indywidualnego doboru leków, dawek oraz sposobu i drogi ich aplikacji. Uwzględniając to, że opracowanie optymalnej i skutecznej terapii przeciwgrzybiczej wymaga z jednej strony prawidłowego rozpoznania i określenia czynnika infekcyjnego (na podstawie badań *in vitro*, celem pracy było ustalenie wrażliwości różnych gatunków w rodzaju *Aspergillus* na ogólnie dostępne leki, a także próba określenia ich profili oporności).

Materiał i metody

Materiał kliniczny

Badania obejmowały izolaty grzybów z rodzaju *Aspergillus* uzyskane ze stad hodo wanych drobiu z terenów Polski południowo-wschodniej (tab. I). Materiał pochodził od gęsi (nioski reprodukcyjne, ptaki przeznaczone na tucz), kur (nioski reprodukcyjne, brojlery), kaczek (ptaki przeznaczone na tucz) oraz indyków w (brojlery) z klinicznymi objawami aspergilozy o różnicowanym nasileniu. Próbkę pobierano przyżyciowo (wymazy) z jamy dziobowej i kloaki, a od ptaków padłych z jamy dziobowej, płuc, w orków po wietrznych, mózgu, narządów mięsnych i kloaki (ryc. 1 i 2).

Badania hodowlane

Materiał wysiewano bezpośrednio na stałe podłoże Sabourauda z dodatkiem chloramfenikolu. Podłoże Sabourauda w ilości 15 ml rozlewano na płytki Petriego o średnicy 90 mm. Płytki inkubowano równolegle w temperaturze 25°C i 37°C około 14 dni. Identyfikację uzyskanych hodowli przeprowadzano wg klasycznych metod mikologicznych obejmujących badanie mikroskopowe i hodowle, w tym mikrohodowle, przy zastosowaniu klucza identyfikacyjnego do oznaczania grzybów strzępkowych według de Hoog i wsp. (10).

Oznaczanie lekowrażliwości szczepów

Wrażliwość wyizolowanych szczepów *Aspergillus spp.* na ogólnie dostępne preparaty antygrzybicze oznaczano na stałym podłożu Sabourauda metodą dyfuzyjno-krążkową w modyfikacji własnej. Do oznaczeń zastosowano komercyjne krążki wysycone poszczególnymi preparatami antygrzybiczymi (Dom Handlowy Nauk i Sp. z o.o. PAN w Krakowie), a w przypadku enikonazolu krążki przygotowywano we własnym zakresie. Poszczególne krążki zawierały po 10 µg substancji czynnej dla amfoterycyny B, enikonazolu, flukonazolu, itraconazolu, ketokonazolu, klotrimazolu, mikonazolu, pimarycyny (natamycyny), terbinafiny i tiokonazolu oraz 0,5 µg dla 5-fluorocytosyny.

Inokulum

Wyizolowane szczepy poszczególnych gatunków w *Aspergillus* wysiewano na skosy z podłożem Sabourauda i inkubowano w temperaturze 37°C (*A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*) i 25°C (*A. glaucus*, *A. nidulans*, *A. clavatus*, *A. ustus*) przez 7 dni. Z uzyskanych hodowli przygotowywano splotynę w płynie fizjologicznym z dodatkiem Tween 20. Do oznaczeń wrażliwości grzybów stosowano zawiesiny

poszczególnych gatunków *Aspergillus*, których gęstość ustalono na 10⁴ cfu/ml (według standardu M38-A opracowanego przez NCCLS – The National Committee for Clinical Laboratory Standards / CLSI – The Clinical and Laboratory Standards Institute, USA) (11).

Test dyfuzyjno-krążkowy

Inokula poszczególnych szczepów, w objętości 0,2 ml, wysiewano na stałe podłoże Sabourauda, a następnie nakładano krążki nasączone preparatami antygrzybiczymi, przez naczynia nakładając na krążki płytkę nie więcej niż cztery krążki. Materiał inkubowano w temperaturze 37°C i 25°C w zależności od gatunku grzyba. Strefy zahamowania wzrostu odczytywano po 48 godz. (*A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*) lub po 72 godz. inkubacji (*A. glaucus*, *A. nidulans*, *A. clavatus*, *A. ustus*), a interpretację wyników przeprowadzano wg instrukcji producenta (Dom Handlowy Nauk i Sp. z o.o. PAN w Krakowie).

Kontrolę stanowiły analogicznie wykonane posiewy badanych szczepów na podłożu Sabourauda. Badania przeprowadzono równolegle w dwóch powtórzeniach.

Wyniki

Ogółem przebadano 2000 próbek, z których wyizolowano 146 szczepów z rodzaju *Aspergillus* zaklasyfikowanych następnie do 7 gatunków (tab. I). Były to *A. fumigatus* (n=100), *A. flavus* (n=16), *A. niger* (n=9), *A. glaucus* (n=10), *A. nidulans* (n=5), *A. clavatus* (n=5) i *A. ustus* (n=1). *A. fumigatus* był gatunkiem dominującym i stanowił 68,49% ogólnej puli wyizolowanych szczepów. Odsetek pozostałych gatunków był zdecydowanie niższy i za wierał się w przedziale 10,96-0,69% (tab. I).

Ocenę wrażliwości szczepów rodzaju *Aspergillus* przedstawiono w tabeli II i III.

Wykazano, że bez względu na gatunek grzyba, rodzaj *Aspergillus* cechuje się wysoką wrażliwością na enikonazol i terbinafinę oraz opornością na 5-fluorocytosynę, flukonazol, itraconazol i amfoterycynę B (tab. IV, ryc. 3-5). Aktywność antygrzybicza pozostałych preparatów jest różnicowana i wydaje się zależeć od gatunku *Aspergillus*. Wykazano, że *A. fumigatus* jest wrażliwy na klotrimazol, *A. flavus* na ketokonazol, klotrimazol i tiokonazol, *A. niger* wykazuje jedynie średnią wrażliwość na ketokonazol, mikonazol i tiokonazol, *A. glaucus* na amfoterycynę B, ketokonazol, klotrimazol, tiokonazol oraz średnią wrażliwość na mikonazol, *A. nidulans* na ketokonazol, klotrimazol oraz średnią wrażliwość na tiokonazol, *A. clavatus* na pimarycynę oraz średnią wrażliwość na ketokonazol i tioko-

Tabela I: Zestawienie badanych gatunków ptaków oraz izolowanych gatunków *Aspergillus*

Table I: Putting together examined bird species and isolated *Aspergillus* species

Gatunek grzyba <i>Fungus species</i>	Gatunek ptaków / <i>Birds species</i>						Izolaty ogółem <i>Isolates total</i>	% izolatów <i>isolates</i>
	Gęsi – nioski reprodukcyjne <i>Geese –reproductive flocks</i>	Gęsi tucz <i>Geese broiler</i>	Kury – nioski reprodukcyjne <i>Hens – reproductive flocks</i>	Brojler kurze <i>Chicken broiler</i>	Kaczki tucz <i>Ducks broiler</i>	Indyki tucz <i>Turkeys broiler</i>		
<i>A. fumigatus</i>	49	30	4	11	5	1	100	68,49
<i>A. flavus</i>	8	5	–	2	–	1	16	10,96
<i>A. niger</i>	5	2	–	2	–	–	9	6,17
<i>A. glaucus</i>	8	–	–	1	1	–	10	6,85
<i>A. nidulans</i>	5	–	–	–	–	–	5	3,42
<i>A. clavatus</i>	2	2	–	–	1	–	5	3,42
<i>A. ustus</i>	1	–	–	–	–	–	1	0,69
Razem / Total	78	39	4	16	7	2	146	100,00

nazol, natomiast *A. ustus* na klotrimazol oraz średnią wrażliwość na klotrimazol i tiokonazol.

Wrażliwość gatunkowa *Aspergillus* wyznaczona dla 50% szczepów w wykazała, że część szczepów *A. niger* i *A. clavatus* reaguje dodatkowo na klotrimazol (średnia wrażliwość). Natomiast przy uwzględnieniu 90% szczepów, *A. fumigatus* jest średnio wrażliwy na klotrimazol, a *A. glaucus* na amfoterycynę B (tab. IV).

Omówienie

Podatność ptaków na infekcję *Aspergillus spp.*, poszerzające się spektrum gatunków odpowiedzialnych za objawy chorobowe oraz zróżnicowana efektywność prowadzonej dotychczas terapii wyma-

ga precyzyjnej oceny dostępnej puli preparatów przeciwgrzybiczych w aspekcie ich skuteczności w stosunku do szczepów izolowanych od ptaków.

Większość informacji z tego zakresu dotyczy stosowanych leków, procedur ich aplikacji oraz uzyskiwanych efektów klinicznych. Badania *in vitro* prowadzone są rzadko, koncentrują się na ogół na gatunku *Aspergillus fumigatus*, a ich wyniki wykazują istotne rozbieżności. W praktyce weterynaryjnej, w stadach hodowlanych ptaków, aktualnie znajduje się erokie zastosowanie enilkonazol – jedyny zarejestrowany preparat antygrzybiczy dla tych zwierząt dostępny na rynku polskim (8, 9, 12, 13). Ze względu na to, że nie wykazuje on aktywności po podaniu doustnym lub parenteralnym (14), a jedynie w kontakcie bezpośrednim, znalazł zastosowanie w walczaniu

Tabela II: Stopień wrażliwości gatunkowej rodzaju *Aspergillus* (gatunki szybko rosnące) na preparaty antygrzybicze

Table II: Degree of sensitivity species of *Aspergillus* genus (quickly growing species) to antifungal drugs

Lek Drug	Szczepy / Strains											
	<i>A. fumigatus</i> (n=100)				<i>A. flavus</i> (n=16)				<i>A. niger</i> (n=9)			
	Strefa zahamowania wzrostu w mm [średnia w mm] / Zone resistance in mm [average in mm]											
	Zakres Range	Średnia Average	50%	90%	Zakres Range	Średnia Average	50%	90%	Zakres Range	Średnia Average	50%	90%
5-Fluorocytozyna / 5-Fluorocytosine	0				0				0			
Amfoterycyna B / Amphotericin B	0				0				0			
Enilkonazol / Enilconazole	42-66	53,38	53	47	48-50	49,43	50	49	42-72	55,14	54	54
Flukonazol / Fluconazole	0				0				0			
Itrakonazol / Itraconazole	0-14	10,48	10	9	11-13	12,29	12	12	0-14	10,71	11	11
Ketokonazol / Ketoconazole	0-21	12,79	13	10	25-28	26,14	26	25	0-21	14,15	16	14
Klotrimazol / Clotrimazole	13-22	18,94	18	15	17-22	19,29	19	18	10-16	13,43	14	12
Mikonazol / Miconazole	8-13	9,83	10	8	8-13	10,43	10	9	9-17	14,71	16	14
Pimarycyna / Pimaricin	0-18	7,33	10	0	0				0			
Terbinafina / Terbinafine	18-35	25,39	25	21	21-26	23,14	23	21	18-24	22,29	23	21
Tiokonazol / Tioconazole	0-19	12,45	13	10	39-44	41,43	42	39	0-22	17,86	20	20

Tabela III: Stopień wrażliwości gatunkowej rodzaju *Aspergillus* (gatunki wolno rosnące) na preparaty antygrzybicze

Table III: Degree of sensitivity species of *Aspergillus* genus (slowly growing species) to antifungal drugs

Lek Drug	Szczepy / Strains												
	<i>A. glaucus</i> (n=10)				<i>A. nidulans</i> (n=5)				<i>A. clavatus</i> (n=5)			<i>A. ustus</i> (n=1)	
	Strefa zahamowania wzrostu w mm [średnia w mm] / Zone resistance in mm [average in mm]												
	Zakres Range	Średnia Average	50%	90%	Zakres Range	Średnia Average	50%	90%	Zakres Range	Średnia Average	50%	90%	Zone
5-Fluorocytozyna / 5-Fluorocytosine	0				0				0			0	
Amfoterycyna B / Amphotericin B	14-18	16,17	16	15	0				0			9	
Enilkonazol / Enilconazole	57-70	64,33	65	63	60-70	64,29	61	60	34-55	46,57	45	42	47
Flukonazol / Fluconazole	0				0				0			0	
Itrakonazol / Itraconazole	9-18	13,67	13	12	0-12	7,14	8	0	9-15	11,71	11	10	0
Ketokonazol / Ketoconazole	20-35	27,33	27	26	26-40	31,57	31	27	0-20	14,28	16	14	16
Klotrimazol / Clotrimazole	20-26	22,17	21	20	19-25	22,14	22	20	14-16	13,57	14	11	20
Mikonazol / Miconazole	14-19	17,5	18	18	0-13	7,14	8	0	0			10	
Pimarycyna / Pimaricin	0				0				13-24	18,14	17	14	0
Terbinafina / Terbinafine	41-51	45,17	45	41	33-42	37	35	35	33-46	36,71	34	33	35
Tiokonazol / Tioconazole	22-30	25,33	24	23	14-22	17,86	16	16	11-21	17,14	17	16	17

Tabela IV: Profil wrażliwości gatunkowej rodzaju *Aspergillus* na preparaty antygrzybicze

Table IV: Profile of the species sensitivity of the *Aspergillus* genus to antifungal drugs

Gatunek grzyba <i>Fungies species</i>	5-Fluorocytozyna <i>5-Fluorocytosine</i>	Amfoterycyna B <i>Amphotericin B</i>	Enikonazol <i>Eniconazole</i>	Flukonazol <i>Fluconazole</i>	Itrakonazol <i>Itraconazole</i>	Ketokonazol <i>Ketoconazole</i>	Klotrimazol <i>Clotrimazole</i>	Mikonazol <i>Miconazole</i>	Pimarycyna <i>Pimaricin</i>	Terbinafina <i>Terbinafine</i>	Tiokonazol <i>Tioconazole</i>
<i>A. fumigatus</i> (n=100)			w	o			w			w	
<i>A. flavus</i> (n=16)			w	o		w	w		o	w	w
<i>A. niger</i> (n=9)			w	o		św		św	o	w	św
<i>A. glaucus</i> (n=10)		w	w	o		w	w	św	o	w	w
<i>A. nidulans</i> (n=5)			w	o		w	w		o	w	św
<i>A. clavatus</i> (n=5)			w	o		św		o	w	w	św
<i>A. ustus</i> (n=1)			w	o	o	św	w		o	w	św

w – wrażliwy / susceptible, św – średnio wrażliwy / intermediate, o – oporny / resistant

grzybów tylko w środowisku bytowania z zwierząt i stosowany jest w formie gazowej (świece dymne) lub w formie zamgławiania (turbozamgławiacze) (9).

Wysoką aktywność biologiczną enikonazolu w stosunku *A. fumigatus* wykazał w badaniach *in vitro* Van Cutsem i wsp. (8): wartości MIC wahały się w tym przypadku od 0,1 do 1,0 µg ml⁻¹. Wyniki te autorzy potwierdzili *in vivo*, stosując enikonazol w formie świec dymnych w grupie 1-dniowych piskląt eksperymentalnie zakazonych zarodnikami *A. fumigatus*. Efektem terapii było istotne obniżenie odsetka śmiertelności ptaków (8). Zbliżone rezultaty odnotował Hay i w sp. u ptaków dorosłych z naturalną aspergilozą (15). Nieco inaczej kształtuje się skuteczność terapii w przypadku indyków, u których stwierdzono lepsze efekty po podaniu itrakonazolu w porównaniu z enikonazolem i ketokonazolem (16).

W warunkach polskich badania przeprowadzane w stadach gęsi tuczonych i reprodukcyjnych wykazały zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* wysoką grzybobójczą aktywność enikonazolu w stosunku do *A. fumigatus* (9). Obecnie uzyskane wyniki nie tylko potwierdzają wysoką aktywność *in vitro* enikonazolu w stosunku do *A. fumigatus*, ale również wskazują na podobną wrażliwość pozostałych badanych gatunków grzybów (*A. flavus*, *A. niger*, *A. glaucus*, *A. nidulans*, *A. clavatus*, *A. ustus*).

Terapia infekcji grzybiczych prowadzona głównie u ptaków ozdobnych jest trudna, długotrwała i kosztowna, a prognozy odnośnie do całkowitego wyleczenia są ostrożne.

Kuracja prowadzona jest najczęściej z użyciem amfoterycyny B (6, 17, 18), itrakonazolu (13, 19-21), a ostatnio wikonazolu (21-23). Zarówno amfoterycyna B, jak i itrakonazol aplikowane mogą być same lub w połączeniu z flucytozyną i amfoterycyną B, dożylnie, dotchawiczo, bezpośrednio w zakazone pole (w orki powietrzne), ewentualnie w postaci aerozolu (18, 24).

Efekty terapii są na ogół pozytywne, nie zawsze dochodzi jednak do całkowitego wyleczenia, a długoterminowe podawanie amfoterycyny B, mimo że preparat cechuje się niską toksycznością dla ptaków, może mieć oddziaływanie neurotoksyczne (14).

Z kolei pewne gatunki i papugi wykazują wyjątkową wrażliwość na itrakonazol, który może powodować uszkodzenie wątroby, a nawet śmierć ptaków (5). Opracowanie skutecznej kuracji antygrzybiczej powinno więc uwzględniać, obok właściwego doboru leku, również wysokość dawki, schemat podawania, formę aplikacji, a także gatunek ptaków.

Badania *in vitro* przeprowadzone obecnie stanowią duże zaskoczenie. Wykazały one bowiem bardzo wysoką oporność wśród izolowanych szczepów, bez względu na ich przynależność gatunkową, na amfoterycynę B, itrakonazol i flukonazol, preparaty z wyboru w klinicznej terapii aspergilozy ptaków. Należy przy tym zaznaczyć, że w wyniku leko-wrażliwości uzyskane metodą dyfuzyjno-krażkową zostały również potwierdzone metodą mikrozdzielenia według NCCLS/CLSI (11) i przy pomocy E-testów (dane niepublikowane).

Częściowym wyjaśnieniem braku korelacji badań *in vitro* i efektów klinicznych może być fakt, że jako inokulum w wszystkich oznaczeniach stosowana była za miesina zarodników poszczególnych gatunków grzybów. W przeciwieństwie do mycelium ta forma morfologiczna rzadko występuje w warunkach *in vivo*, a odmienna struktura jej ściany komórkowej może być odpowiedzialna (w pewnym stopniu) za mniejszą lekowrażliwość grzybów (25).

Odmienna farmakokinetyka leków może także rzutować na występującą oporność. Badania przeprowadzone na modelu myszy z doświadczalną kandydozą wykazały, że dawki efektywne dla flukonazolu i itrakonazolu wynosiły odpowiednio 0,392 mg/kg i >320 mg/kg, podczas gdy wartości MIC dla tych leków osiągały wartości 0,125 µg ml⁻¹ i 0,0156 µg ml⁻¹. Tak więc, stosunkowo słabo aktywny *in vitro* flukonazol (10× słabszy od itrakonazolu) był około 1000× bardziej skuteczny terapeutycznie (26).

Orosz i Frazier (18), badając biodostępność itrakonazolu u gołębi, stwierdzili natomiast wysoki stopień różnicowania między poszczególnymi osobnikami, co w konsekwencji utrudniało ustalenie korelacji między oznaczeniami *in vitro* a efektami terapeutycznymi.

Wysoki stopień lekooporności szczepów *Aspergillus* wyizolowanych od ptaków hodowlanych może być również wynikiem obserwowanej generalnie, w progresji z wiekiem oporności w populacji patogenów grzybiczych. O ile informacje na temat obniżonej wrażliwości *Candida spp.* są stosunkowo szczegółowe, to wiedza w tym zakresie odnośnie do *Aspergillus spp.* jest ograniczona (4).

Wykazano, jak dotąd, brak aktywności flukonazolu w stosunku do tego rodzaju grzybów (27) oraz gwałtowny wzrost oporności na itrakonazol (28-32), szczególnie wśród izolatów klinicznych pochodzących od pacjentów z inwazyjną aspergilozą. Ze względu na brak wyraźnej korelacji wrażliwości *in vitro* *A. fumigatus* na amfoterycynę B, z wynikami terapii inwazyjnej aspergilozy na bazie tego leku (33), przyjmuje się, że mimo stosunkowo wysokiego odsetka szczepów

opornych *in vitro* (34, 35) kliniczna oporność na ten lek jest zjawiskiem stosunkowo rzadkim (28, 36, 37).

Aktywność pozostałych badanych preparatów była zróżnicowana, a jej wyznacznikiem wydawał się gatunek badanego grzyba, co sugeruje możliwość opracowania tzw. gatunkowych profili lekowrażliwości dla szczepów *Aspergillus*. Uzyskane wyniki potwierdzają wcześniejsze ustalenia w zakresie specyfiki gatunkowej szczepów *Aspergillus* odnośnie do ich wrażliwości na poszczególne leki (38-40), a ponadto dzięki skriningowi obejmującemu jednocześnie najczęściej izolowane od ptaków gatunki *Aspergillus* i powszechnie dostępne leki przeciwnadciężnicze, mogą stanowić wskazówkę dla lekarzy praktyków przy wstępnej selekcji preparatów leczniczych podczas opracowywania optymalnej terapii.

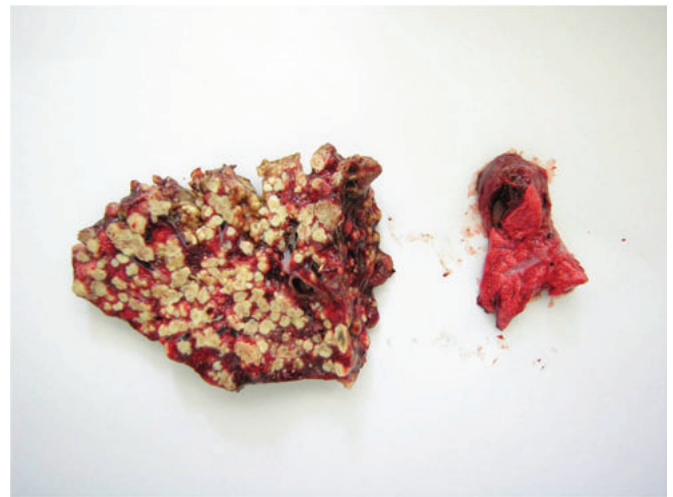
Podsumowanie

Szczepy *Aspergillus spp.* izolowane bezpośrednio od ptaków w hodowlanych z terenu Polski południowo-wschodniej cechują się *in vitro* wysoką stopniem opornością na dostępną antymykotyki, w tym na amfoterycynę B, itraconazol, flukonazol i 5-fluorocytozynę. Lekiem o wysokiej aktywności *in vitro* w stosunku do tego rodzaju grzybów okazał się enilkonazol i terbinafina.

Zaobserwowano ponadto pewną specyficzność gatunkową szczepów *Aspergillus* w zakresie lekowrażliwości, czyli tzw. gatunkowy profil wrażliwości, jednak z uwagi na stosunkowo niską liczebność gatunków *Aspergillus non-fumigatus* badania wymagają kontynuacji.



Ryc. 1. Aspergiloza u gęsi
Fig. 1. Geese aspergillosis



Ryc. 2. Zmiany grzybicze w płucach u gęsi
Fig. 2. Fungal clinical symptoms in lungs from geese



Ryc. 3. *Aspergillus fumigatus* – metoda dyfuzyjno-krażkowa
Fig. 3. *Aspergillus fumigatus* – disc diffusion method



Ryc. 4. *Aspergillus flavus* – metoda dyfuzyjno-krażkowa
Fig. 4. *Aspergillus flavus* – disc diffusion method

Ryc. 5. *Aspergillus niger* – metoda dyfuzyjno-krażkowaFig. 5. *Aspergillus niger* – disc diffusion method

Piśmiennictwo

- Kunkle R.A., Rimpler R.B.: Pathology of acute aspergillosis in turk eyes. Avian Dis., 1996, 40, 875-886.
- Akan M., Hazir oğlu M., İlham Z., Sarıyüpeoğlu B., Tunca R.: A case of aspergillosis in a broiler breeder flock. Avian Dis., 2002, 46, 497-501.
- Atasever A., Gümüşsoy K.S.: Pathological, clinical and mycological findings in experimental aspergillosis infections of starlings. J. Vet. Med. A, 2004, 51, 19-22.
- Qiao J., Li W., Li R.: Antifungal resistance mechanisms of *Aspergillus*. Jpn. J. Med. Mycol., 2008, 49, 157-163.
- Orosz S.E.: Overview of aspergillosis: pathogenesis and treatment options. Sem. Avian Exotic Pet Medicine, 2000, 9, 59-65.
- 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.
- Reece R.L., Taylor T.K., Dickson D.B.: Mycosis of commercial Japanese quail, ducks and turk eyes. Aust. Vet. J., 1986, 63, 196-197.
- Van Cutsem J.: Antifungal activity of enilconazole on experimental aspergillosis in chickens. Avian Dis., 1983, 27, 36-42.
- Ziółkowska G., Tokarzewski S.: Oznaczenie antygrzybiczej aktywności biobójczego preparatu Enizol. Medycyna Wet., 2006, 62, 792-796.
- De Hoog G.S., Guarro J., Gene J., Figueras M.J.: Atlas of clinical fungi. 2nd ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands and Universitat Rovira and Virgili, Reus, Spain, 2000.
- NCCLS: M38-A Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard. Vol. 22, number 16.
- Redmann T., Schildger B.: Therapeutic use of enilconazole in broiler chicks with aspergillosis. Dt. Tierärztl. Wschr., 1989, 96, 15-17.
- Van Cutsem J., Van Gerven F., Janssen P.A.J.: Le traitement de l'aspergillose expérimentale par l'enilconazole et par itraconazole. Bull. Soc. Franç. Mycol. Med., 1989, 18, 55-59.
- Joseph V.: Aspergillosis in raptors. Semin. Avian Exotic Pet Medicine, 2000, 9, 66-74.
- Hay R.J.: The role of chemoprophylaxis in the prevention of airborne infection by fungal pathogens. J. Hosp. Infect., 1991, 18, Suppl A, 460-465.
- Perelman B., Smith B., Bronstein D., Gur-Lavie A., Kuttin E.S.: Use of azole compounds for the treatment of experimental aspergillosis in turkeys. Avian Path., 1992, 21, 591-599.
- 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.
- Orosz S., Frazier D.L.: Antifungal agents: a review of their pharmacology and therapeutic indications. J. Avian Med. Surgery, 1995, 9, 8-18.
- da Silva Ferreira M.E., Capellaro J.L., dos Reis Marques E., Malavazi I., Perlin D., Park S., Anderson J.B., Colombo A.L., Arthington-Skaggs B.A., Goldman M.H.S., Goldman G.H.: In vitro evolution of itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus* involves multiple mechanisms of resistance. Antimicrob. Agents Chemother., 2004, 48, 405-4413.
- 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.
- Burhenne J., Haefeli W.E., Hess M., Scope A.: Pharmacokinetics, tissue concentrations, and safety of the antifungal agent voriconazole in chickens. J. Avian Med. Surg., 2008, 22, 199-207.
- Tell L.A., Craigmill A.L., Clemons K.V., Sun Y., Laizure S.C., Clifford A., Ina J.H., Nugent-Deal J.P., Woods L., Stevens D.A.: Studies on itraconazole delivery and pharmacokinetics in mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). J. Vet. Pharmacol. Therap., 2005, 28, 267-274.
- Beernaert L., Pasmans F., Baert K., Van Waeyenberghe L., Chiers K., Haesebrouck F., Martel A.: Designing a treatment protocol with voriconazole to eliminate *Aspergillus fumigatus* from experimentally inoculated pigeons. Vet. Microbiol., 2009, 139, 393-397.
- Beernaert L., Pasmans F., Van Waeyenberghe L., Dorrestein G.M., Verstappen F., Vercammen F., Haesebrouck F., Martel A.: Avian *Aspergillus fumigatus* strains resistant to both itraconazole and voriconazole. Antimicrob. Agents Chemother., 2009, 53, 2199-2201.
- Moore C.B., Walls C.M., Denning D.W.: In vitro activities of terbinafine against *Aspergillus* species in comparison with those of itraconazole and amphotericin B. Antimicrob. Agents Chemother., 2001, 45, 1882-1885.
- Warnock D.W., Arthington-Skaggs B.A., Li R.K.: Antifungal drug susceptibility testing and resistance in *Aspergillus*. Drug Resist. Updat., 1999, 2, 326-334.
- Yotsuji A., Shimizu K., Araki H., Fujimaki K., Nishida N., Hori R., Annen N., Yamamoto S., Hayakawa H., Imaizumi H., Watanabe Y., Narita H.: T-8581, a new orally and parenterally active triazole antifungal agent: in vitro and in vivo evaluations. Antimicrob. Agents Chemother., 1997, 41, 30-34.
- Sheehan D.J., Hitchcock C.A., Sibley C.M.: Current and emerging azole antifungal agents. Clin. Microbiol. Rev., 1999, 12, 40-79.
- Dannaoui E., Borel E., Monier M.F., Piens M.A., Picot S., Persat F.: Acquired itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. J. Antimicrob. Chemother., 2001, 47, 333-340.
- Snelders E., Huis in't Veld R.A.G., Rijs A.J.M.M., Kema G.H.J., Melchers W.J.G., Verweij P.E.: Possible environmental origin of resistance of *Aspergillus fumigatus* to medical triazoles. Appl. Environ. Microbiol., 2009, 75, 4053-4057.
- Van Leer-Buter C., Takes R.P., Hebeda K.M., Melchers W.J., Verweij P.E.: Aspergillosis and a misleading sensitivity results. Lancet, 2007, 370, 102.
- Verweij P.E., Mellado E., Melchers W.J.: Multiple-triazole-resistant aspergillosis. N. Engl. J. Med., 2007, 356, 1481-1483.
- Verweij P.E., de Dorsthorst D.T.A., Rijs A.J., de Vries-Hospers H.G., Meis J.F.: Nationwide survey of in vitro activities of itraconazole and voriconazole against clinical *Aspergillus fumigatus* isolates cultured between 1945 and 1998. J. Clin. Microbiol., 2002, 40, 2648-2650.
- Johnson E.M., Oakley K.L., Radford S.A., Moore C.B., Warn P., Warnock D.W., Denning D.W.: Lack of correlation of in vivo amphotericin B susceptibility testing with outcome in a murine model of *Aspergillus* infection. J. Antimicrob. Chemother., 2000, 45, 85-93.
- Manavathu E.K., Cutright J.L., Loebenberg D., Chandrasekar P.H.: A comparative study of the in vitro susceptibilities of clinical and laboratory-selected resistant isolates of *Aspergillus* spp. to amphotericin B, itraconazole, voriconazole and posaconazole (SGH 56592). J. Antimicrob. Chemother., 2000, 46, 229-234.
- Verweij P.E., Mensink M., Rijs A.J.M.M., Donnelly P., Meis J.F.G.M., Denning D.W.: In vitro activities of amphotericin B, itraconazole and voriconazole against 150 clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* isolates. J. Antimicrob. Chemother., 1998, 42, 389-392.
- Moosa M.Y., Alangaden G.J., Manavathu E., Chandrasekar P.H.: Resistance to amphotericin B does not emerge during treatment for invasive aspergillosis. J. Antimicrob. Chemother., 2002, 49, 209-213.
- Paterson P.J., Seaton S., Prentice H.G., Kibbler C.C.: Treatment failure in invasive aspergillosis: susceptibility of deep tissue isolates following treatment with amphotericin B. J. Antimicrob. Chemother., 2003, 52, 873-876.
- Arikan S., Sancak B., Alp S., Hascelik G., McNicholas P.: Comparative in vitro activities of posaconazole, voriconazole, itraconazole, and amphotericin B against *Aspergillus* and *Rhizopus*, and synergy testing for *Rhizopus*. Med. Mycol., 2008, 46, 567-573.
- Chamiols G., Kontoyiannis D.P.: Update on antifungal drug resistance mechanisms of *Aspergillus fumigatus*. Drug Resist. Updat., 2005, 8, 344-358.
- Silvanose C.D., Bailey T.A., Di Somma A.: Susceptibility of fungi isolated from the respiratory tract of falcons to amphotericin B, itraconazole and voriconazole. Vet. Rec., 2006, 159, 282-284.