

## Rhizopus oryzae jako przyczyna grzybicy zatok przynosowych

HALINA HALWEG, BARBARA PODSIADŁO

Pracownia Mikologiczna Instytutu Gruźlicy w Warszawie

Halweg H., Podsiadło B.: (Mycological Laboratory, Institute of Tuberculosis, Płocka 27, 01-138 Warszawa, Poland). *Rhizopus oryzae as the cause of mycosis of the paranasal sinuses*. Acta Mycol. XXII (1): 43–48, 1986.

The authors describe a rare case of the fructification occurrence of *Rhizopus oryzae* in the material removed from the nose meatus of the patient with the paranasal sinuse mycosis.

### WSTĘP

U ludzi z zaburzeniami odporności coraz częściej dochodzi do rozwoju grzybic głębokich, np: u chorych z cukrzycą lub mocznicą, u leczonych cytostatykami albo lekami immunosupresyjnymi lub antybiotykami. Zajęte mogą być różne narządy, w tym również zatoki przynosowe. Do zakażeń grzybami może dojść również u ludzi cierpiących na choroby uszu lub przewodu nosowego. Czynniki etiologicznymi zakażeń mogą być między innymi grzyby z rodzaju *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Candida*, *Mucor*, *Rhizopus* lub *Absidia*.

W tkankach stwierdza się mycelium lub pseudomycelium albo pojedyncze lub pączkujące komórki (blastospory). W wyjątkowych przypadkach w miejscach o dużym dostępie tlenu znajdują się owocowania grzybów. Obserwowano to zarówno w przypadkach grzybniaków płuc, grzybicy oskrzeli i grzybicy kikuta oskrzela (Chodkowska i in. 1969, Halweg i in. 1982; Krakówka, Ciszek, Halweg 1968), jak również w przypadkach grzybicy ucha zewnętrznego (Halweg, Krakówka 1968; Halweg, Podsiadło przypadki własne niepublikowane) lub przewodu nosowego (Koziołowa i in. 1985). Najczęściej stwierdzano owocowania *Aspergillus fumigatus*, czasami *A. flavus*, *A. oryzae*, *A. niger*, *Penicillium nigricans*, *Absidia lichtheimii* lub *Rhizopus oryzae*.

W piśmiennictwie światowym są prace poświęcone mukormikozie zatok przynosowych (Hammer, Bottone, Hirschman 1975; Lehrer i in. 1980; Meyers i in. 1979). We wszystkich przypadkach w preparatach histopatologicznych stwier-

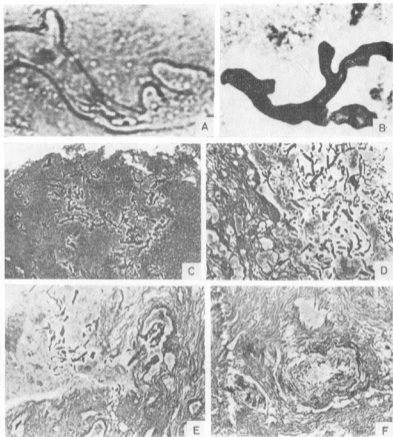
dzano obecność dość szerokiej grzybni, zwykle nie podzielonej septami. W większości przypadków rozpoznanie było potwierdzone wynikami posiewów. W piśmiennictwie polskim pierwszy przypadek mukormikozy lewego przewodu nosowego, zatoki szczękowej, zatok sitowych i zatoki klinowej u chorej po przeszczepieniu nerki opublikowano w 1985 r. (Koziołowa i in.) Zasluguje on na uwagę z tego względu, że grzybni wegetatywnej *Rhizopus oryzae* towarzyszyła obecność owocowań grzyba, które wykształciły się w powierzchniowej warstwie zmian martwiczych wyścielających przewód nosowy chorej. Zakażeniu wywołanemu przez *Rhizopus oryzae* towarzyszyło zakażenie wywołane przez *Aspergillus fumigatus*, które było ograniczone tylko do powierzchniowych warstw zmian martwiczych w przewodzie nosowym.

#### METODY BADAŃ LABORATORYJNYCH

Materiał uzyskany z przewodu nosowego i z zatoki szczękowej utrwalono w 4% wodnym roztworze formaliny. Skrawki parafinowe barwiono hematoksyliną i eozyną, metodą PAS i srebrzono wg metody Gomoriego. Z materiału uzyskanego z przewodu nosowego robiono świeże preparaty bezpośrednie w 0,9% wodnym roztworze chlorku sodu. Posiewy wykonywano na płytkach z agarem Sabourauda i inkubowano w temperaturze 28°C przez 4 do 10 dni. Identyfikacji szczepu *Rhizopus oryzae* dokonano z hodowli prowadzonych na podłożu ziemniaczano-glukozowym w temperaturze 28°C przez 4 do 10 dni (Skirgiełło, Zadara 1979), zaś szczepu *Aspergillus fumigatus* z hodowli prowadzonych na agarze Czapek-Doxa w temperaturze 28°C przez 4-6 dni (Raper, Fennel 1965).

Wrażliwość na amfoterycynę B (Fungizone i.v. firmy Squibb) oznaczano metodą rozcieńczeń leku w płynnym podłożu. Wrażliwość na nystatynę (Mycostatin in subst. firmy Squibb) oznaczano metodą rozcieńczeń leku w płynnym podłożu lub metodą krążków bibułowych firmy Difco zawierających 100 j. leku. Stosowano płynne i stałe podłoże o składzie: ekstrakt mięsny — 2,5 g, ekstrakt drożdżowy — 5,0 g, pepton — 10,0 g, NaCl — 10,0 g, woda destylowana — 1000 ml. Wrażliwość na 5-fluorocytozynę oznaczano metodą API-testu (API 10 M 5-fluorocytosine) firmy Apisystem. Do posiewów stosowano zawiesinę zarodników *R. oryzae* lub *A. fumigatus*. Hodowle inkubowano w temperaturze 28°C lub 37°C przez 48 godzin.

Przeciwciał przeciw antygenom *Aspergillus fumigatus* i *Rhizopus oryzae* poszukiwano za pomocą metody podwójnej dyfuzji w żelu agarowym (Ouchterlony) (Halweg 1979; Podsiadło 1980). Antygeny metaboliczne *A. fumigatus* przygotowywano z 4-tygodniowych hodowli grzybów na podłożu syntetycznym z asparaginą (Smitha) w temperaturze 28°C (Podsiadło 1980). Przesącze hodowli dializowano, a następnie liofilizowano. Stosowano antygeny otrzymane z hodowli 6 szczepów *A. fumigatus* w stężeniu 20 mg/ml. W podobny sposób przygotowano antygeny metaboliczne i somatyczne z izolowanego od chorej szczepu *R. oryzae*. Przesącz i ekstrakty z grzybni uzyskiwano z hodowli prowadzonych przez 6 tygodni w temperaturze 28°C na



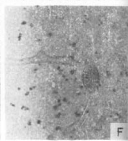
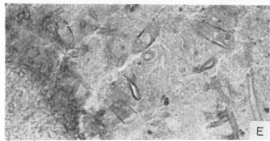
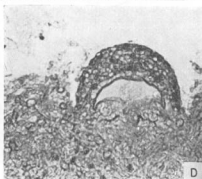
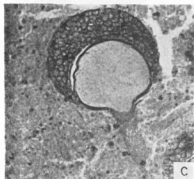
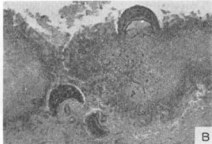
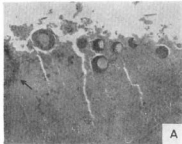
Tablica I — Plate I

Strzępki *Rhizopus oryzae* w materiale pobranym z przewodu nosowego chorej w czasie operacji

*A* — w preparacie bezpośrednim w 0,9% roztworze NaCl (320×); *B* — w preparacie srebrzonym metodą Gomoriego (320×); *C* — w masach martwiczych; *D* — w masach martwiczych oraz w głębszych warstwach błony śluzowej; *E* — w masach martwiczych oraz wewnątrz naczyń krwionośnych i przenikające przez jego ścianę; *F* — otaczające naczynia krwionośne oraz widoczne w ich świetle; (*C-F* — preparaty srebrzone metodą Gomoriego 50×)

*Rhizopus oryzae* hyphae in the material taken from the patient's nose meatus during surgical operation

*A* — through direct examination in 0,9% NaCl (320×); *B* — stained by Gomory's method (×320); *C* — in necrotic masses; *D* — in necrotic masses and in the deeper layers of mucosa; *E* — in necrotic masses and inside the blood vessel or penetrating its wall; *F* — surrounding blood vessels and in their lumen; (*C-F* — Gomory's stain, ×50)



Tablica II — Plate II

*Rhizopus oryzae* w materiale pobranym z przewodu nosowego chorej (Preparaty barwione hematoxyliną i eozyną z materiału pobranego przed operacją)

*A* — Zarodnie oraz skupienie grzybni *Aspergillus fumigatus* w masach martwiczych (20 $\times$ ); *B* — Grzybnia oraz zarodnie przerastające skupienie grzybni *A. fumigatus* w masach martwiczych (50 $\times$ ); *C* — Zarodnia *R. oryzae* w masach martwiczych (128 $\times$ ); *D* — Zarodnia przerastająca skupienie grzybni *A. fumigatus* (128 $\times$ ); *E* — Skupienie grzybni i wąskie strzępki *A. fumigatus* oraz szerokie strzępki *R. oryzae* w masach martwiczych (128 $\times$ ); *F* — strzępki oraz chlamydospora *R. oryzae* interkalarna w masach martwiczych (128 $\times$ )

*Rhizopus oryzae* in the material taken from the patient's nose meatus (Hematoxylin and eosin stained before the operation)

*A* — Sporangia and aggregations of *Aspergillus fumigatus* hyphae in necrotic masses ( $\times 20$ ); *B* — Hyphae and sporangia penetrating aggregations of *A. fumigatus* hyphae in necrotic masses ( $\times 50$ ); *C* — Sporangium of *Rhizopus oryzae* in necrotic masses ( $\times 128$ ); *D* — Sporangium penetrating the aggregation of *A. fumigatus* hyphae ( $\times 128$ ); *E* — Hyphae aggregation and narrow hyphae of *A. fumigatus* and wide hyphae of *R. oryzae* in necrotic masses ( $\times 128$ ); *F* — Hyphae and intercalary chlamydospore of *R. oryzae* in necrotic masses ( $\times 128$ )

podłożu Sabourauda (Halweg 1979) oraz na podłożu Smitha. Ekstrakt z grzybni uzyskiwano przez ekstrakcję rozdrobnionej grzybni płynem Coca o składzie: NaCl — 5,0 g, NaHCO<sub>3</sub> — 2,75 g, fenol — 4,0 g, woda destylowana — 1 000 ml. Stosowano antygeny dializowane i zagęszczone w stężeniu 10,30 lub 40 mg/ml. Posiadane antygeny *R. oryzae* nie dawały krzyżowych odczynów serologicznych z surowicami chorych z grzybniakiem kropidlakowym płuc, zawierającymi przeciwciała przeciw antygenom *A. fumigatus*.

## WYNIKI

W preparacie bezpośrednim z materiału pobranego w czasie operacji z przewodu nosowego chorej stwierdzono obecność wyłącznie szerokich strzępek grzybów z dość grubymi ścianami komórkowymi. Średnica strzępek wynosiła 9-12  $\mu\text{m}$ . Strzępki nie miały przegród poprzecznych i rozgałęziały się pod kątem zbliżonym do prostego (Tabl. I A). W posiewie uzyskano wzrost kolonii *R. oryzae*, któremu towarzyszyły kolonie *A. fumigatus*.

*Rhizopus oryzae* Went et Pr. Geerling 1895 tworzył białe, puszyste kolonie o wysokości 3-7 mm, które z czasem brązowiały i wytwarzały czarne zarodnie. W preparacie stwierdzono bezbarwną grzybnię szerokości 12-14  $\mu\text{m}$ , rzadko podzieloną przegradami poprzecznymi oraz brązowe chwytniki. Sporangiofory miały odcień brązowy i średnicę 12  $\mu\text{m}$ . Zarodnie o wymiarach 105-140  $\times$  128-175  $\mu\text{m}$ , średnio 128-147  $\mu\text{m}$ , miały łatwo rozpuszczającą się ścianę oraz talerzykowatą apofizę. Kolumella kulista 47-117  $\times$  70-140  $\mu\text{m}$ , średnio 80  $\times$  103  $\mu\text{m}$ . Zarodniki brązowe, o kształcie owalnym lub nieregularnie kanciastym, 5-12  $\times$  5-12  $\mu\text{m}$ , średnio 7  $\times$  9  $\mu\text{m}$ . Ściana zarodników delikatnie porysowana. Pomiedzy strzępkami stwierdzono obecność chlamydospor pojedynczych, cylindrycznie wydłużonych, interkalarnych w wymiarach 23  $\times$  29  $\mu\text{m}$ .

Szczep *R. oryzae* był wrażliwy na amfoterycynę B w stężeniu 0,4  $\mu\text{g/ml}$ , a odporny na 5-fluorocytozynę w stężeniu 64  $\mu\text{g/ml}$  i nystatynę w stężeniu 100  $\mu\text{g/ml}$  (ok. 500 j/ml). Szczep *Aspergillus fumigatus* Fres. 1850 był wrażliwy na 5-fluorocytozynę w stężeniu 0,25  $\mu\text{g/ml}$  i na nystatynę — 100 j. na krążek bibułowy.

W preparatach histopatologicznych wykonanych z materiałów pobranych przed operacją i w czasie operacji z przewodu nosowego chorej stwierdzono w masach martwiczych liczne skupienia grzybni (Tabl. I C, D). Strzępki średnicy 4-12  $\mu\text{m}$  rozgałęziały się pod kątem zbliżonym do prostego i rzadko miały przegrody poprzeczne (Tabl. I B, C, D). Zaobserwowano również występowanie grzybni wokół naczyniakowato rozszerzonych naczyń krwionośnych i penetrację jej do ich wnętrza (Tabl. I E, F). Ten typ grzybni stwierdzano również w preparatach wykonanych z materiału pobranego w czasie operacji z zatoki szczękowej.

Jedynie w preparatach wykonanych z materiału pobranego przed operacją z przewodu nosowego chorej stwierdzono w powierzchniowych warstwach zmian martwiczych obok grzybni wegetatywnej występowanie owocowań *R. oryzae* (Tabl. II A-D).

Zarodnie o brązowych sporangioforach i ciemniej ścianie miały 66-85  $\mu\text{m}$ , apofiza była talerzykowata. Kolumella kulista, 52-61  $\mu\text{m}$ . Zarodniki o porysowanej powierzchni, 5-6  $\times$  5-8  $\mu\text{m}$ , średnio 5  $\times$  7  $\mu\text{m}$ .

W tej części preparatu znaleziono również dwa skupienia grzybni o innym wyglądzie morfologicznym. Strzępki o średnicy około 5  $\mu\text{m}$ , o licznych przegrodach poprzecznych, rozgałęziały się dychotomicznie. Tego typu grzybni nie znaleziono w preparatach wykonanych z materiału pobranego od chorej w czasie operacji, i to zarówno z przewodu nosowego, jak i z zatoki szczękowej. Ogólny charakter grzybni przypominał grzybnie kropidlaka. Grzybnia z preparatu była przerośnięta grzybnią i zarodnikami *R. oryzae* (Tabl. II B-E). Zaobserwowano również obecność interkalarnych chlamydospor o dość grubych ścianach, ziarnistej strukturze i wymiarach 14  $\times$  21-36  $\mu\text{m}$  (Tabl. II F).

Badania serologiczne wykazały obecność przeciwciał przeciw antygenom *R. oryzae*, a brak przeciwciał przeciw antygenom *A. fumigatus*.

Analiza wyników badań histopatologicznych, mikologicznych i serologicznych pozwoliła na rozpoznanie mukormikozy lewego przewodu nosowego, zatoki szczękowej, obu zatok sitowych oraz zatoki klinowej wywołanej przez *R. oryzae*.

#### OMÓWIENIE

Na podstawie analizy preparatów histopatologicznych i wyników posiewów można przyjąć, że czynnikiem wywołującym chorobę był *R. oryzae*. Grzybnia jego penetrowała głęboko i znajdowano ją zarówno w preparatach wykonanych z materiału pobranego z przewodu nosowego, jak i w preparatach wykonanych z materiału pobranego z zatoki szczękowej. Tylko jego grzybnia skupiała się wokół naczyń krwionośnych i przenikała do ich wnętrza. Natomiast grzybnie kropidlaka znaleziono tylko w preparatach wykonanych z materiału pobranego przed operacją z przewodu nosowego. Występowanie jej było ograniczone tylko do powierzchniowych warstw zmian martwiczych. Dodatkowo fakt owocowania *R. oryzae* wskazuje na wcześniejszy jego rozwój niż grzybni kropidlaka.

Wyniki badań serologicznych potwierdzają rozpoznanie mukormikozy. Wykrycie precypityn przeciw antygenom *R. oryzae* należy do nielicznych obserwacji tego typu (Koziołowa i in. 1985; Lehrer i in. 1980).

Zakażenie *Aspergillus fumigatus* uznano za późniejsze i ograniczone tylko do powierzchniowych warstw zmian martwiczych w przewodzie nosowym. Jego zarodniki, które często występują w powietrzu, mogły bez trudności zatrzymać się i zagnieździć na nierównych masach martwiczych wyściełających przewód nosowy chorej. Za tą interpretacją przemawia również nieobecność w surowicy chorej przeciwciał przeciw antygenom *A. fumigatus*.

Wyizolowany szczep *R. oryzae* był wrażliwy na uzyskiwane w surowicy chorych terapeutyczne stężenia amfoterycyny B i oporny na terapeutyczne stężenia 5-fluorocytozyny.

Autorki dziękują Kierownikowi Pracowni prof. med. Pawłowi Krakówce za pomoc i uwagi w czasie opracowywania materiału.

## LITERATURA

- Chodkowska S., Chruściak E., Ciszek J., Czechowska Z., Halweg H., Krakówka P., Pawlicka L., Wroczyńska K., 1969, Atlas grzybic układu oddechowego. PZWL, Warszawa, 109-110.
- Halweg H., 1979, Ocena przydatności nieliofilizowanych antygenów metabolicznych *Aspergillus fumigatus* do odczynu precypitacji. *Pneum. Pol.* 47: 33-39.
- Halweg H., Krakówka P., 1968, Grzybica (mukor-mykoza) ucha zewnętrznego wywołana przez *Absidia lichtheimii*. *Otolaryngologia Pol.* 22: 713-717.
- Halweg H., Zajączkowska J., Krakówka P., Podsiadło B., Olechnowicz H., Pirożyński M., 1982, Znaczenie badań laboratoryjnych dla rozpoznania grzybicy kikuta oskrzela i tchawicy. *Pol. Prz. Chir.* 54: 711-718.
- Hammer G. S., Bottone E. J., Hirschman S. Z., 1975, Mucormycosis in a transplant recipient. *Am. J. Clin. Path.* 64: 389-398.
- Koziółowa H., Halweg H., Fruba J., Smogorzewski M., Pachnio R., 1985, Mukormikoza zatok przynosowych u chorej po przeszczepieniu nerki. *Pol. Arch. Med. Wew.* (w druku).
- Krakówka P., Ciszek J., Halweg H., 1968, Wczesne stadium kropidlakowego grzybniaka płuc. *Gruźlica* 36: 667-671.
- Lehrer R. I., Howard D. H., Sypherd P. S., Edwards J. E., Segal G. P., Winston D. J., 1980, Mucormycosis. *Ann. Intern. Med.* 93: 93-108.
- Meyers B. R., Wormser G., Hirschman S. Z., Blitzer A., 1979, Rhinocerebral mucormycosis. *Arch. Inter. Med.* 139: 557-560.
- Podsiadło B., 1980, Przydatność metody immunoelektroforezy przeciwnej do diagnostyki serologicznej grzybniaka kropidlakowego płuc. *Pneum.* 48: 285-291.
- Raper K. B., Fennel D. J., 1965, The genus *Aspergillus*. Williams, Wilkins, Co., Baltimore.
- Skirgiełło A., Zadara M., 1979, Glonowce (*Phycomycetes*) Pleśniakowe (*Mucorales*), (In:) Flora Polska, 10, Warszawa-Kraków.