

## DETERMINAREA PATOGENITAȚII CIUPERCILOR ȘI LEVURILOR IZOLATE DIN SPUTA BOLNAVILOR; RELAȚII CU PREZENȚA LOR ÎN AERUL ATMOSFERIC

(Notă preliminară)

A. Bulla, E. Stoica, V. Grigoriu, M. Molan

Ciupercile și levurile puse în evidență în sputa bolnavilor pot proveni, fie din aerul atmosferic, din flora saprofită a orofaringelui sau a tractului respirator, fie din leziuni specifice micotice bronșice sau pulmonare. Astfel se disting (*Fernandes M. T.*) micoze pulmonare endogene (actinomicoză, candidoză), exogene (histoplasmoză, toruloză, blastomicoză, etc.) și prin invadatori secundari (aspergiloză, mucor-micoză) (1). Această delimitare nu este însă tranșantă în practică.

Pentru a avea cit mai multe elemente de referință, într-o lucrare anterioară (2) am cercetat gradul de înfestare al bazinului aerian al orașului București, sub aspectul alt al dinamicii densității sporilor de ciuperci, în diferitele perioade ale anului, cit și al incidenței diferitelor specii de ciuperci.

S-a putut astfel stabili că densitatea cea mai ridicată a sporilor de ciuperci apare în lunile iunie—iulie, incidența lor începând să crească încă din luna mai. Genurile *Penicillium* și *Aspergillus* apar tot anul, în timp ce *Cladosporium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Fusarium* și *Stemphyllium*, primăvara și toamna. În timpul verii și toamna apar genurile de *Alternaria* și *Helminthosporium*, iar *Macrosporium* toamna.

Rezultă deci că simpla prezență a fungilor în sputa bolnavilor nu are semnificația unui diagnostic etiologic, dacă nu se pune în evidență caracterul lor patogen.

Pentru a determina potențialul patogen al fungilor găsiți în sputa bolnavilor suspecțai clinic și radiologic de micoză pulmonară folosim mai multe procedee.

1. Examenul direct pentru punerea în evidență în mod repetat, a aceluiași fungi, în sputa sau aspiratul bronșic al bolnavilor.

Punerea în evidență în mod repetat a unui număr mai mare de spori, concomitent cu miceli sau pseudomicelii — constituie un semn deosebit de valoros pentru suspectarea prezenței unui agent cu caractere patologice.

2. Însămânțarea pe medii de cultură (*Sabouraud, Czapek, Raulin*, etc.) permite stabilirea pe baza aspectelor macro- și microscopic, a identității ciupercilor sau levurilor prezente în spută.

Stabilirea precisă a speciilor de fungi poate contribui, fără a avea o valoare absolută, la suspectarea prezenței unei specii patologice. Astfel, de exemplu, se știe că dintre diferitele specii de *Candida*, numai *Candida albicans* dispune de caractere patologice (3), dintre speciile *Aspergillus*, cele mai frecvente patologice sînt *A. fumigatus* și *A. niger*, etc. Speciile de *Alternaria*, *Rhizopus*, *Cephalosporium*, *Helmintosporium*, *Penicillium*, *Mucor*, sînt foarte rar patologice.

Tabelul nr. 1.

| Agentul patogen                                     | Mat. de inoc.                                   | Animalul de lab. | Calea de inoc. | Rezultatul  |
|---|---|------------------|----------------|---|
| <i>Coccidioides immitis</i>                         | Spută   | Cobai            | I. testic      | După 7—10 zile orhita simetrică, în care se pune în evidență agentul patogen                                |
|   | Emulsie de colonie (fază micelială)             | Șoarece          | I. peritoneal  | Abcese multiple viscerale   |
| <i>Candida albicans</i>                             | Emulsie de colonie din cultură 1 cc din sol. 1% | Iepure           | I. v.          | În 4—5 zile, abcese multiple renale   |
|   |   | Iepure           | I. cutan       | În 48 de ore abcese   |
|   |   | Șoarece          | I. peritoneal  | Microabcese multiple  |
| <i>Nocardia Actinomyces bovis</i>                   | Spută   | Cobai            | Subcutan       |   |
|   | Emulsie de colonie din cultură                  | Cobai            | I. peritoneal  | Fungemie letală   |
| <i>Sporotrichum</i>                                 | Puroi   | Șobolan alb      | I. peritoneal  | Peritonită, orhită. Fungi se găsesc intracelular  |
| <i>Aspergillus</i>                                  | Emulsie de colonii din cultură                  | Iepure cobai     | I. v.          | În 5—10 zile microabcese renale. Animalele mor  |
| <i>Mucor</i>  | Emulsie de colonii din cultură                  | Iepure cobai     | I. v.          | În 15—20 zile microabcese renale sau hepatice   |
| <i>Cryptococcus neoformans</i> (torula histolitica) | Spută   | Șoarece          | I. peritoneal  | După 3—4 săpt. mase gelatinoase în mezenț, ganglioni măriti. Agentul patogen se pune în evid. și în creier. |

Pe de altă parte, s-a observat că fungii cu caracter patogen cresc mai încet pe mediile de cultură artificiale decît cei saprofiți. Pe o placă Petri pe care

se însămițează concomitent, o tulpină cu caracter patogen cunoscut și una izolată din sputa unui bolnav, aceasta din urmă în cazul că este doar o specie saprofită contaminatoare, inhibează în câteva zile creșterea primei, prin ritmul ei de dezvoltare mai accentuat.

3. În ceea ce privește inocularea la animale de laborator (4), sintetizând experiența mai multor autori, dăm un tabel care cuprinde schemele de lucru și rezultatele ce se pot obține în funcție de agentul patogen, materialul de inoculare, animalul și calea de inoculare.

Avind în vedere că practica inoculărilor la animale pentru determinarea patogenității fungilor este foarte variată și contradictorie, ne-am propus să începem să verificăm comportamentul unor animale de experiență și eficiența diferitelor căi de inoculare. Așa de exemplu, inj. intravenoasă de *Candida albicans* la cobai, șobolani, șoareci, iepuri, produce un sfârșit letal — uneori chiar când tulpinile nu sînt patogene la om. În schimb injecțiile i. c., s. c. sau i. p. provoacă generalizări doar atunci cînd patogenitatea este pronunțată. De aceea pentru început relatăm câteva cazuri la care s-a încercat calea intraperitoneală la șoareci. (Tabelul nr. II).

Tabelul nr. II.

| Cazul | Data recoltării produsului | Ex. direct spută sau spălătură bronșică | Cultură (Sabouraud)                         | Data inoculării i. perit. la șoarece | Observații  |
|-------|----------------------------|---|---|--------------------------------------|---|
| C. D. | 27. VI.                    |   | <i>Aspergillus Penicillium Rhizopus</i>     | 6. VIII. 1962                        | Sacrificați la 6. IX. 1962 normali  |
| I. I. | 5. IX.                     |   | <i>Aspergillus Penicillium</i>              | 8. X. 1962.                          | Hiperemie generalizată  |
| I. T. | 5. IX.                     | Celule de candida <i>M. miceli</i>      | <i>Candida</i>                              | 8. X. 1962.                          | Hiperemie generalizată  |
| B. I. | 5. IX.                     | Celule de candida                       | <i>Candida</i>                              | 8. X. 1962.                          | Hiperemie generalizată  |
| V. A. | 10. IX.                    | Celule de candida                       | <i>Candida</i>                              | 8. X. 1962.                          | În cupele anatomopatologice, microabcese perihepatice, pseudomicelii de candida (patogenă) în rinichi             |
| O. V. | 20. IX.                    | Celule de candida                       | <i>Candida alb</i> prezența de clamidospori | 5. XI. 1962.                         | Normal  |
| V. T. | 4. X.                      |   | <i>Aspergillus Candida</i>                  | 5. XI. 1962.                         | În cupele anatomopatologice, microabcese hepatice cu sporangie de <i>Aspergillus</i> (patogenă)                   |
| A. I. | 1. X.                      |   | <i>Candida</i>                              | 5. XI. 1962.                         | Hiperemie generalizată. Șoarecele a murit la 6. X. 1962. (după 24 ore), prezentînd necroze pe suprafața ficatului |
| C. A. | 4. X.                      |   | <i>Candida</i>                              | 5. XI. 1962.                         | Normal  |
| S. F. | 27. X.                     |   | <i>Candida</i>                              | 5. XI. 1962.                         | Hiperemie generalizată. Șoarecele a murit la 7. XI. (la 48 ore), prezentînd necroze pe suprafața ficatului        |

Confruntind în cazurile urmărite datele obținute, cu cele clinico-radiologice, reiese că rezultatele nu sînt totdeauna concludente.

Din cele 10 cazuri, în două (V. A. și V. T.) fenomenele clinico-radiologice n-au pledat pentru prezența unei micoze pulmonare, deși probele de inoculare au fost pozitive și invers, într-un caz (A. I.), cu toată negativitatea probelor de inoculare, aplicarea unor tratamente cu fungistatice a dat rezultate bune, ducînd la sistarea sputelor hemoptoice, a expectorației abundente etc.

|                        | 1961 |    |     |    |   | 1962 |     |      |    |   |    |     |
|------------------------|------|----|-----|----|---|------|-----|------|----|---|----|-----|
|                        | I    | II | III | IV | V | VI   | VII | VIII | IX | X | XI | XII |
| <i>PENICILLIUM</i>     |      |    |     |    |   |      |     |      |    |   |    |     |
| <i>ASPERGILLUS</i>     |      |    |     |    |   |      |     |      |    |   |    |     |
| <i>CLADOSPORIUM</i>    |      |    |     |    |   |      |     |      |    |   |    |     |
| <i>RHIZOPUS</i>        |      |    |     |    |   |      |     |      |    |   |    |     |
| <i>MUCOR</i>           |      |    |     |    |   |      |     |      |    |   |    |     |
| <i>FUSORIUM</i>        |      |    |     |    |   |      |     |      |    |   |    |     |
| <i>STEMPHYLIUM</i>     |      |    |     |    |   |      |     |      |    |   |    |     |
| <i>ALTERNARIA</i>      |      |    |     |    |   |      |     |      |    |   |    |     |
| <i>HELMINTOSPORIUM</i> |      |    |     |    |   |      |     |      |    |   |    |     |
| <i>MACROSPORIUM</i>    |      |    |     |    |   |      |     |      |    |   |    |     |

Graful nr. 1.

În ceea ce privește concordanța dintre prezența diferiților fungi în aerul atmosferic și în spută, ea a putut fi confirmată pentru genurile de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Cladosporium*. Genurile *Mucor*, *Sporotrichon*, *Cephalosporium* au apărut în sputa bolnavilor și în perioada în care nu se găseau în general în aerul atmosferic.

Din cele 40 de spute examinate, în 11 s-au găsit fungi exogeni și în 29 endogeni (*Candida*).

Aceste rezultate concordă cu cele comunicate de *Fragner* (Praga, 5) care a găsit în peste 95% din sputele pozitive, diferite specii de *Candida*.

În cadrul urmăririi acestor interrelații, va trebui să ținem cont de antagonismul ce eventual poate exista între flora microbiană saprofită a arborelui respirator și diferiții fungi. Acest fenomen a fost observat de *Demikhovskiy* pentru *Candida albicans* (6).

4. Testele cutanate, efectuate cu vaccin sau extracte din culturile proprii fie cărui caz în parte, asigură uneori reacții fidele în special la *Aspergillus fumigatus* și *Coccidioides immitis*.

În general însă, din cauza reacțiilor încrucișate sau nespecifice, frecvente metoda nu poate asigura decît un diagnostic de prezumpție.

Cercetările privind punerea în evidență în serul bolnavilor a anticorpilor de fixare a complementului, opsoninelor, precipitinelor, aglutininelor, etc. nu prezintă încă suficiente garanții pentru a putea trage concluzii valabile (7).

Din expunerea acestei note preliminare, rezultă că în stadiul actual nu dispunem încă de metode sigure de determinare a patogenității fungilor izolați din sputa bolnavilor. În această situație este obligatorie corelarea strictă a datelor de laborator cu cele clinico-radiologice. Diagnosticul de micoză este un diagnostic de excludere a tuturor celorlalte afecțiuni posibile.

Dintre toate probele de laborator, siguranța cea mai mare pentru diagnosticul



Fig. nr. 1: Rhizopus.



Fig. nr. 2: Mucor.



Fig. nr. 3: Aspergillus.



Fig. nr. 4: Penicillium.





Fig. nr. 5: Alternaria.



Fig. nr. 6: Cephalosporium.



Fig. nr. 7: Helmintosporium.



Fig. nr. 8: Cladosporium.



Fig. nr. 9: Candida albicans cu clamidospori

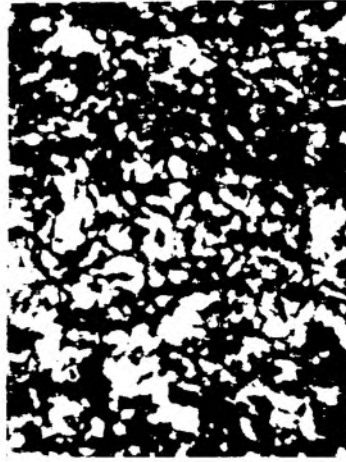


Fig. nr. 10: Candida albicans cu pseudomiceliu în ficat de șoarece inoculat (700 x).



Fig. nr. 11. Conidiofori de aspergillus cu lanțuri de conidii în rîniștii de șoarece inoculat (150 x).



Fig. nr. 12: Conidiofori de aspergillus cu lanțuri de conidii în rîniștii de șoarece inoculat (700 x).

patogenității se pare că o prezintă în primul rând examenul direct al sputei cu punerea în evidență a sporilor și miceliilor de ciuperci și în al doilea rând inocularea la animale, cu evidențierea fungilor în țesuturile afectate. Asupra animalului și a căii de inoculare care să prezinte eficiența cea mai crescută — nu avem încă date concludente. Pentru cunoașterea mai aprofundată a unor eventuale relații între infestarea aerului atmosferic și micozele pulmonare ne propunem să studiem în continuare, antagonismul dintre flora saprofită oro-nazo-faringiană și diferiți fungi.

*Sosit la redacție: 2 februarie 1963.*

### *Bibliografie*

1. M. T. FERNANDES: Pulmonary Mycoses — in The Journ. of the Roy. Instit. of Public Health and Hygiene, Dec. (1961), 289;
2. A. BULLA, M. MOLAN: Viața Medicală (1962), IX., 13;
3. M. L. SAMOILOVICI, A. M. CEARNII: Sovetkaia Medicina (1962, 7, 125);
4. CONANT și colab.: Manual of Chemical Mycology (1944);
5. FRAGNER P.: Kvasinky v sputa narich nemoenich. In Rozhledy v tuberculoze a v nemocech plicnich (1962), 6;
6. I. E. DEMIKHOVSKY: J. Mikrobiologii, Epid. Imunol. Moscova (1961), 8, 1028—131;
7. SALVIN S. B.: Amer. Journ. Med. (1959), 27, 97.