

Katedra i Zakład Biologii i Parazytologii. Akademia Medyczna w Lublinie  
Kierownik: doc. dr hab. n. med. Roman Gieryng

Halina GIERYNG, Roman GIERYNG

### Zmiany histologiczne w mózgu myszy wywołane doświadczalnym zarażeniem pełzakami z grupy *limax*

Гистологические изменения в мозге мыши вызванные опытным заражением амёбами  
из группы *limax*

Histologic Changes in Brain of Mice Caused by Experimental Infection with Amoebas of the  
*limax* Group

Wśród pierwotniaków (*Protozoa*) wyróżniamy grupę drobnych pełzaków wolno żyjących, objętych wspólną nazwą pełzaków grupy *limax*. Występują one na całej kuli ziemskiej, zajmując takie środowiska, jak: wilgotne gleby, wody słodkie i słone, prowadząc życie saprobiontów. Pełzaki należące do rodzajów *Naegleria*, *Hartmannella* i *Acanthamoeba* w pewnych warunkach mogą przechodzić na pasożytniczy tryb życia, stając się czynnikiem etiologicznym wielu chorób człowieka i zwierząt.

Na patogeniczność tych pełzaków zwróciły uwagę badania Culbertsona i wsp. (7). Badacze ci z hodowli tkankowej nerki małpy wyizolowali patogenny szczep A-1 *Hartmannella castellani* i stwierdzili, że jest on patogenny dla zwierząt. Donosowa i dordzeniowa inokulacja małej myszy tymi pełzakami wywołuje ciężkie zapalenie opon mózgowych i mózgu, kończące się śmiercią w ciągu 3–4 dni. Dalsze badania na zwierzętach doświadczalnych (1, 10, 11, 14) wykazały, że szczep A-1 wykazuje właściwości typowego pasożyta z wyraźnym neurotropizmem. W połowie lat sześćdziesiątych pojawiły się pierwsze doniesienia o występowaniu u ludzi pełzaków z rodzaju *Hartmannella* i *Naegleria*, powodujących również zapalenie opon mózgowych i mózgu oraz śmierć (2, 5, 11, 14, 15). Dalsze badania wykazały, że u człowieka *Naegleria fowleri* wywołuje pierwotne pełzakowe zapalenie opon mózgowych i mózgu (PAME), natomiast pełzaki z rodzaju *Hartmannella* i *Acanthamoeba* wywołują ziarniniakowe zapalenie opon mózgowych i mózgu (GAE) (13), zapalenie płuc, przewlekłe nieżyty nosa i gardła, przewlekłe bóle głowy oraz zapalenie błon śluzowych narządów rodnych, owrzodzenia skóry i rogówki oka.

Prowadzone liczne badania nad pełzakami grupy *limax* nie wyjaśniły wielu zagadnień z biologii, epidemiologii oraz patogeniczności tych pełzaków, tak więc problem ten jest nadal otwarty i wymaga dalszych badań.

#### MATERIAŁ I METODY

Do badań wybrano 7 zbiorników wodnych z terenu Lubelszczyzny, w tym 2 baseny z pod-

grzewaną wodą (w Lublinie i Świdniku) oraz 4 jeziora Pojezierza Łęczyńsko-Włodawskiego (Białe, Łukcze, Piaseczno i Krasne), wykorzystywane jako kąpieliska.

Próbki z jezior pobierano w miejscach opłukiwanych przez fale na granicy wody i gleby z różnych części jeziora. Z basenów pobierano próbki wody w miejscach, gdzie woda styka się ze ścianą, z dna, z krat zamykających kanały wylotowe, zgodnie z zaleceniami Čer v y (6). Tak pobrane próbki przechowywano w temp. 4°C.

Do izolowania pełzaków i prowadzenia ich hodowli stosowano stałe podłoża na agarze z żywymi lub martwymi bakteriami *Aerobacter aerogenes* według Culbertsona (8). Na przygotowane podłoża nanoszono po 1 cm<sup>3</sup> materiału pobranego z jeziora lub basenu. Następnie całość inkubowano w temp. 25°C. Po okresie 3–5 dni obserwowano na płytkach agarowych ameby. Przesiane pełzaki inkubowano w komorze wilgotnej w temp. 37°C. W ten sposób pozostawały przy życiu tylko te pełzaki, które mogą żyć w temperaturze ciała zwierząt i ludzi, zatem ewentualnie mogą być dla nich patogenne (12).

Badania wirulencji pełzaków przeprowadzono na myszach szczepu Swiss o c.c. 10–15 g. Szczepami pełzaków, wyizolowanymi z poszczególnych zbiorników wodnych, zarażano po 20 myszy, w tym 10 samic i 10 samców. Myszy usypiano lekko eterem, a następnie wkraplano im donosowo po 0,03 ml zawiesiny zawierającej ok. 20 tys. trofozoitów. Dla każdego zbiornika wodnego grupa kontrolna obejmowała 10 myszy, które zaszczepiano 0,03 ml płynu fizjologicznego z prawie taką samą ilością bakterii *A. aerogenes*. Zaszczepione myszy poddane były obserwacji w ciągu 20 dni.

Myszy, które po zaszczepieniu padły, sekcjonowano i wypreparowywano jałowo mózg. Część materiału wykorzystano do wykonania następnych posiewów na płytkach agarowych w celu wyizolowania pełzaków i określenia ich składu gatunkowego, z pozostałej części wykonano preparaty histologiczne, które barwiono hematoksyliną żelazistą według Heidenhaina oraz hematoksyliną z eozyną i trójchromem Gomoriego. Najlepsze wyniki przy identyfikacji pełzaków, w tkankach uzyskano przy użyciu hematoksyliny żelazistej. Natomiast zmiany patologiczne w mózgu najlepiej widoczne były przy barwieniu hematoksyliną z eozyną.

## WYNIKI BADAŃ I ICH OMÓWIENIE

Z badanych zbiorników wodnych na terenie Lublina i jego okolicy wyizolowano szczepy gatunków pełzaków z grupy *limax*, które okazały się patogene dla myszy. Ogółem na zarażonych 140 myszy w okresie badanych 20 dni padło 51 osobników, w tym 24 samice i 27 samców. Zarażone donosowo zwierzęta padały 3–17 dnia z objawami zapalenia dróg oddechowych, opon mózgowych i mózgu. Zwierzęta, u których śmierć następowała w pierwszych dniach po zarażeniu, miały najczęściej zaatakowane płuca, natomiast ginące w późniejszym okresie wykazywały uszkodzenia mózgu i płuc. Na 51 padłych osobników z 48 wyizolowano pełzaki z mózgu (tab. 1). Pozostałe przy życiu 89 myszy po 20 dniach były sekcjonowane, a posiewy z mózgow wskazywały na to, że większość (53) była jednak zarażona pełzakami, u pozostałych 36 myszy nie udało się wyizolować pełzaków.

Wyizolowane pełzaki z mózgu padłych myszy należały do dwóch rodzajów: *Acanthamoeba* i *Hartmannella*. Z rodzaju *Acanthamoeba* stwierdzono następujące gatunki: *A. polyphaga*, *A. astronyxis*, *A. castellani*, *A. glebae*, a z rodzaju *Hartmannella*: *H. rhyssodes*, *H. palestinesis*, *H. vermiformis*.

Tab. 1. Wyniki posiewów z mózgu myszy padłych po zarażeniu pełzakami  
Results of inoculation from mice brains died after infection with amoebas

Zbiornik wodny	Liczba myszy zarażonych	Liczba myszy padłych	Liczba myszy, z których mózgu wyizolowano pełzaki
Basen AOS w Lublinie	20	5	5
Basen w Świdniku	20	7	7
Zalew Zemborzycki	20	7	6
Jezioro Łukcze	20	10	10
Jezioro Białe	20	13	13
Jezioro Piaseczno	20	4	3
Jezioro Krasne	20	5	4
Ogółem	140	51	48

Podczas sekcji padłych zwierząt poddawano szczegółowym oględzinom opony mózgowej i mózgu. Opony mózgowe zazwyczaj były przekrwione na całej powierzchni, niekiedy przekrwienie obejmowało tylko okolicę płatów czołowych i okolicę węchową. Zmiany w mózgu w pojedynczych przypadkach były niewielkie i ograniczały się do niedużych ogniskowych wybroczyn krwawych, słabo widocznych, zazwyczaj u podstawy mózgu lub niewielkich wylewów krwawych w powierzchniowej warstwie kory. Najczęściej jednak obserwowano ogólne przekrwienie mózgu, z dużymi wybroczynami krwawymi w okolicy płatów czołowych, ciemieniowych oraz mózdzku. Niekiedy widoczne były niewielkie miejsca ropne w powierzchniowej substancji kory mózgu i opuszek węchowych, które zazwyczaj były wyraźnie zaczerwienione i wykazywały zmiany martwicze.

Badaniem histologicznym objęto wszystkie części mózgu. Zmiany powstałe w mózgu zależne były od umiejscowienia się pełzaków, ich rozprzestrzenienia się w mózgu i intensywności inwazji. Największe zmiany stwierdzono w opuszkach węchowych. Najczęściej objęte były procesem zapalnym brzuszne części opuszek węchowych, gdzie występowała duża liczba pełzaków, grzbietowe części opuszek węchowych zazwyczaj w mniejszym stopniu były zajęte przez pełzaki. Niekiedy, na skutek masowej inwazji, stwierdzano całkowite zniszczenie opuszek węchowych (ryc. 1). Wówczas w opuszkach węchowych widoczne było znaczne przekrwienie oraz częściowa destrukcja naczyń krwionośnych, polegająca na przerwaniu śródbłonna i błony wewnętrznej małych naczyń. Stwierdzono również lizę komórek nerwowych, degenerację komórek nerwowych polegającą na przemieszczaniu się jądra komórkowego na obwód oraz przerost tkanki glejowej. W bardziej zniszczonych opuszkach węchowych stwierdzano całe pola pozbawione komórek nerwowych oraz wyraźnie widoczną destrukcję tkanki w miejscach, gdzie masowo występowały pełzaki (ryc. 2).

Opony mózgowe również wykazywały zmiany patologiczne, były silnie przekrwione, występowały niewielkie wylewy krwawe oraz w niektórych

miejscach odwarstwienie opon od kory mózgu. W miejscach tego odwarstwienia między oponami a korą mózgu stwierdzano pełzaki. Obserwowane rozwarstwienie najczęściej stwierdzano w okolicy płatów czołowych. W niektórych przypadkach na półkulach przodomózgowia stwierdzano brak fragmentów opon, ponieważ uległy one całkowitemu zniszczeniu w procesie ropnym.

Również półkule przodomózgowia wykazywały zmiany patologiczne o różnym nasileniu. Przy niewielkiej inwazji obserwowano przekrwienie z częściowym zniszczeniem naczyń krwionośnych oraz niewielkie zmiany krwotoczne wewnątrz substancji szarej i białej. Jednak większe zmiany występowały zawsze w korze mózgowej. W tych częściach kory mózgowej, w których stwierdzano nawet niewielką liczbę pełzaków, brak było prawidłowego utkania warstw korowych. Uderzający był zwłaszcza brak komórek piramidalnych (ryc. 3). Przy masowej inwazji wszystkie komórki nerwowe kory ulegały zniszczeniu i obserwowano rozległe ogniska martwicy, a na powierzchni występowały mniej lub więcej liczne ropnie (ryc. 4). Najczęściej inwazja pełzaków obejmowała tylko jedną półkulę. Na uwagę zasługuje fakt, że niezależnie od stopnia inwazji pełzaki nie przechodziły do substancji białej i zatrzymywały się na granicy kory (ryc. 5 i 6). Jednak w substancji białej mózgu obserwowano zmiany krwotoczne.

Mózdzek był zazwyczaj lekko objęty procesem zapalnym i tylko obserwowano pojedyncze pełzaki lub ich niewielkie skupienia w okolicach okołonaczyniowych i międzyglejowych. W kilku przypadkach stwierdzono zniszczenie niektórych części warstwy ziarnistej przez pełzaki.

Poza przodomózgowiem i mózdzkiem w pozostałych częściach mózgu oprócz przekrwienia nie obserwowano innych zmian patologicznych, a także nie stwierdzano pełzaków.

Należy podkreślić, że w mózgu pełzaki występowały zawsze w aktywnej postaci trofozoitów, nie stwierdzano nigdy cyst. W pierwszej kolejności atakowały one opuszki węchowe, a następnie płaty czołowe i podstawę mózgu, w dalszej kolejności pełzaki rozprzestrzeniały się w korze mózgowej i mózdzku.

Badania nasze wykazały zależność stopnia nasilenia procesu zapalnego w mózgu od okresu przeżywania myszy. U myszy, które padały w pierwszych dniach po zarażeniu, stwierdzano pojedyncze pełzaki w opuszkach węchowych. Natomiast myszy, które padały w 5 lub 6 dniu po zarażeniu miały już zajęte dalsze części przodomózgowia w okolicy płatów czołowych i podstawy mózgu. Stwierdzono również zmiany krwotoczne, zarówno w substancji szarej, jak i białej mózgu. W mózgu myszy, które padały między 10 a 17 dniem stwierdzano większe ilości pełzaków i największe uszkodzenia mózgu. Obserwowano intensywne ogólne przekrwienie i wylewy krwawe we wszystkich częściach mózgu, duże ogniska martwicy, całkowite zniszczenie komórek nerwowych i glejowych w opuszkach węchowych i półkulach mózgu oraz ropnie w opuszkach węchowych i na powierzchni półkul przodomózgowia. Niekiedy procesem zapalnym

objęty był również mózdzek, w którym pełzaki występowały we wszystkich jego częściach.

Stwierdzono, że nawet niewielka liczba pełzaków w korze mózgowej powodowała zniszczenie komórek nerwowych. Jeśli nawet nie wszystkie komórki były zniszczone, to zawsze następowała dezintegracja warstw korowych, polegająca na tym, że w okolicy, gdzie występowały pełzaki, nie można było stwierdzić warstw kory mózgowej. Zauważono również, że pełzaki niszczyły w pierwszej kolejności komórki piramidalne.

#### DYSKUSJA

Wprawdzie istnieje cały szereg badań nad patogennością pełzaków z grupy *limax*, to jednak tylko w niewielkim stopniu uwzględniają one zmiany histologiczne w mózgu.

Jako pierwsi Culbertson i wsp. (7) w r. 1958 stwierdzili zmiany patologiczne w mózgu spowodowane inwazją pełzaków. Zarażane donosowo myszy wykazywały uszkodzenie półkul przodomózgowia i podstawy mózgu. W dalszych badaniach (9) stwierdzili oni na tym samym materiale ziarniniaki, rozmieszczone głównie w opuszkach węchowych i półkulach przodomózgowia, powodujące podostry lub przewlekły przebieg choroby, u niektórych zwierząt stwierdzali ropnie w mózgu. Inwazji mózgowia towarzyszył intensywny naciek zapalny oraz silne zmiany krwotoczne w półkulach mózgu. W niektórych przypadkach pełzaki powodowały mniejsze zmiany w mózgowiu, które również prowadziły do śmierci zwierząt, na skutek zajęcia ważnych dla życia ośrodków mózgu. Również w naszych badaniach stwierdziliśmy, że pełzaki powodowały w znacznym stopniu uszkodzenia mózgu myszy.

Okazało się również, że istnieje ścisły związek między stopniem nasilenia procesu zapalnego mózgu a okresem przeżywania myszy. Zwierzęta, które padały w pierwszych dniach po zarażeniu, miały tylko niewielkie zmiany w mózgu, natomiast te, które przeżywały dłużej (10–17 dni), wykazywały największe uszkodzenia mózgu. Podobnie Rudzka (15), badając zmiany w mózgu myszy doświadczalnie zarażonych niektórymi szczepami pełzaków pochodzących z jezior okolic Poznania, stwierdziła, że stopień nasilenia procesu zapalnego mózgu uzależniony był od czasu przeżywania myszy.

Wyniki naszych badań w całej pełni potwierdziły spostrzeżenia Červy (4) i Rudzkiej (15), że u zarażonych zwierząt pełzaki w mózgu przemieszczają się wzdłuż naczyń krwionośnych. Podobne spostrzeżenia poczyniono również i u ludzi zarażonych pełzakami i zmarłych na pierwotne pełzakowe zapalenie opon mózgowych i mózgu (2, 3).

W mózgu zarażonych przez nas myszy stwierdzono obecność tylko trofozoitów, natomiast nie udało się stwierdzić obecności cyst, tymczasem Martinez

(13) przy inwazji pełzaków z rodzaju *Acanthamoeba* stwierdził w mózgu człowieka obok trofozoitów także i cysty.

W badanych zbiornikach wodnych Lubelszczyzny stwierdzono obecność patogennych szczepów pełzaków grupy *limax*. Ponieważ wszystkie te zbiorniki są wykorzystywane jako kąpieliska, mogą stanowić zagrożenie dla ludzi.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Butt G.: Primary Amoebic Meningoencephalitis. *New. Engl. J. Med.* **274**, 1473, 1966.
2. Callicot J. H. Jr. i wsp.: Meningoencephalitis Due to Pathogenic Free-living Amoebae. Report of Two Cases. *J. Am. Ass.* **206**, 579, 1968.
3. Carter R. F.: Primary Amoebic Meningoencephalitis: Clinical, Pathological and Epidemiological Features of Six Fatal Cases. *J. Path. Bact.* **96**, 1, 1968.
4. Červa L.: Intracerebral Inoculation of Experimental Animals in Pathological Studies of *Hartmannella castellani*. *Folia Parasitol.* **14**, 171, 1967.
5. Červa L., Nowak K.: Amebova meningoencephalita v ČSSR (Predbežna zprava o prvých 16 detecovaných prípadoch). *Česka Epidem. Microb. Immunol.* **17**, 65, 1968.
6. Červa L.: Studies of *limax* Amoebae in a Swimming Pool. *Hydrobiol.* **38**, 141, 1971.
7. Culbertson C. G. i wsp.: *Acanthamoeba*: Observation on Animal Pathogenicity. *Science* **127**, 1506, 1958.
8. Culbertson C. G. i wsp.: The Isolation of Additional Strains of Pathogenic *Hartmannella* sp. (*Acanthamoeba*). Proposed Culture Method for Application to Biological Material. *Amer. J. Clin. Path.* **43**, 383, 1965.
9. Culbertson C. G. i wsp.: *Hartmannella (Acanthamoeba)*. Experimental Chronic, Granulomatous Brain Infections Produced by New Isolated of Low Virulence. *Amer. J. Clin. Path.* **46**, 305, 1966.
10. Culbertson C. G.: The Pathogenicity of Soil Amoebas. *Ann. Rev. Microbiol.* **25**, 231, 1971.
11. Fowler M., Carter R. F.: Acute Pyogenic Meningitis Due to *Acanthamoeba* sp.: A Preliminary Report. *Brit. Med. J. Sept.* **25**, 740, 1965.
12. Griffin J.: Temperature Tolerance of Pathogenic and Nonpathogenic Free-living Amoebas. *Science* **178**, 869, 1972.
13. Martinez A. J.: Is *Acanthamoeba encephalitis* an Opportunistic Infection? *Neurology* **30**, 567, 1980.
14. Patras D., Andujar J. J.: Meningoencephalitis Due to *Hartmannella (Acanthamoeba)*. *Am. J. Clin. Path.* **46**, 226, 1966.
15. Rudzka A.: Obraz zmian histopatologicznych mózgowia i płuc myszy zarażonych patogennymi pełzakami wolno żyjącymi. *Wiad. Parazyt.* **20**, 247, 1974.

#### OPIS RYCIN

Ryc. 1. Opuszka węchowa uszkodzona przez pełzaki. Pow. ok. 160 ×.

Ryc. 2. Fragment uszkodzonej opuszki węchowej, widoczne liczne pełzaki. Pow. ok. 430 ×.

Ryc. 3. Pojedyncze pełzaki w korze mózgowej. Pow. ok. 560 ×.

Ryc. 4. Naciek ropny w powierzchniowej warstwie kory mózgowej. Pow. ok. 270 ×.

Ryc. 5. Inwazja pełzaków w korze mózgowej. A — substancja szara, B — substancja biała. Pow. ok. 260 ×.

Ryc. 6. Inwazja pełzaków w korze mózgowej. A — substancja szara, B — substancja biała. Liczne pełzaki w substancji szarej. Pow. ok. 430 ×.

## РЕЗЮМЕ

Проведенные исследования показали, что амёбы из группы *limax* вызывают серьезные повреждения центральной нервной системы в форме обширных некротических, геморрагических воспалений мозговых оболочек и мозга. В гистологических исследованиях самые большие повреждения констатировали в обонятельных долях, в мозговой коре и в основе мозга. При большой инвазии амёб констатировали полное повреждение обонятельных долей и кровоизлияние. Констатировали также в мозговой коре кровоизлияние и атрофию нервных клеток. Даже при небольшой инвазии амёб не наблюдались в мозговой коре нормальные строения корковых слоев. В белом веществе мозга констатировали лишь геморрагические изменения, но никогда не наблюдали присутствие амёб.

## SUMMARY

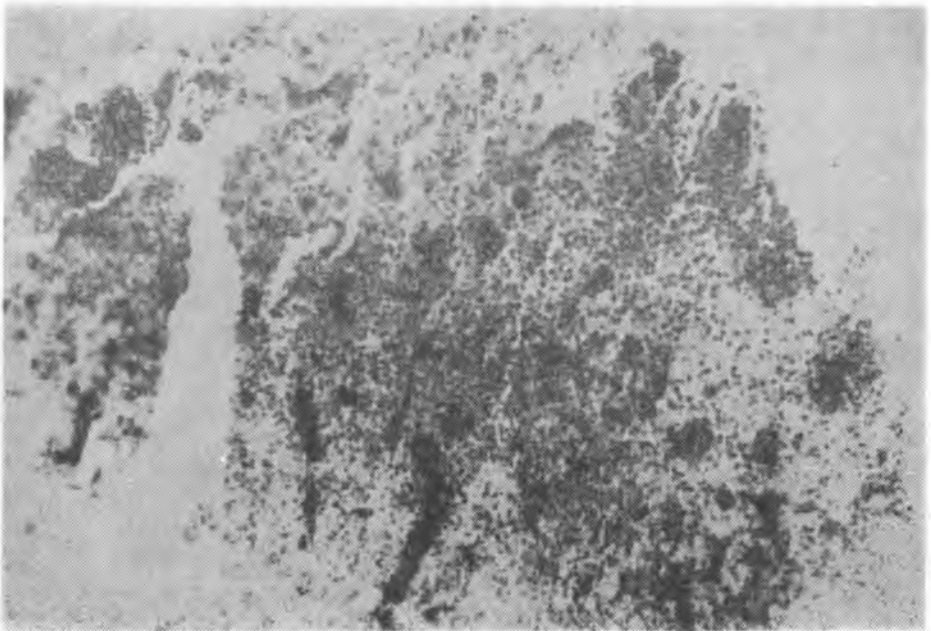
It was found experimentally that amoebas of the *limax* group cause a serious damage in central nervous system consisting in extensive, necrotic and haemorrhagic meningoencephalitis. Histologic examinations show that the most extensive injury is found in olfactory bulbs, cerebral cortex and the base of the brain. It was observed that the heavy invasion of amoebas can result in complete destruction of olfactory bulbs and ecchymosis. Extravasations of blood and atrophy of nerve cells were also found in cerebral cortex. Even relatively inconsiderable invasion of the amoebas into the brain resulted in creation of anomalous texture of cerebral cortex layers. In white matter of the brain, however, only haemorrhagic alterations were found without the presence of the amoebas.

## EXPLANATION TO FIGURES

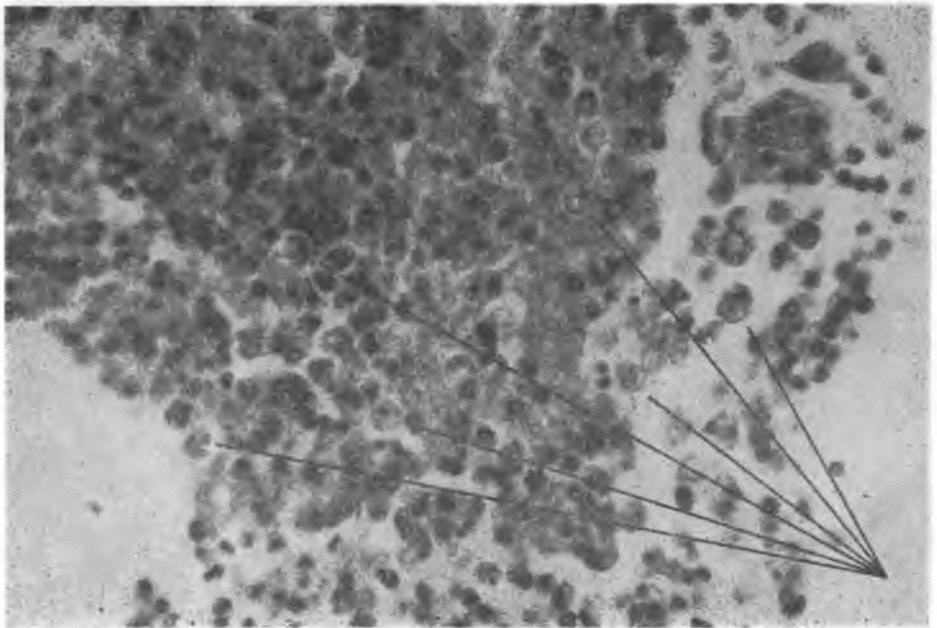
- Fig. 1. Olfactory bulb damaged by amoebae. Magn. ca 160 ×.  
Fig. 2. Fragment of damaged olfactory bulb. Visible numerous amoebae. Magn. ca 430 ×.  
Fig. 3. Individual amoebae in cerebral cortex. Magn. ca 560 ×.  
Fig. 4. Purulent infiltration in the superficial layer of cerebral cortex. Magn. about 270 ×.  
Fig. 5. Amoebae invasion in cerebral cortex. A — grey matter, B — white matter. Magn. ca 260 ×.  
Fig. 6. Amoebae invasion in cerebral cortex. A — grey matter, B — white matter. Numerous amoebae in grey matter. Magn. ca 430 ×.



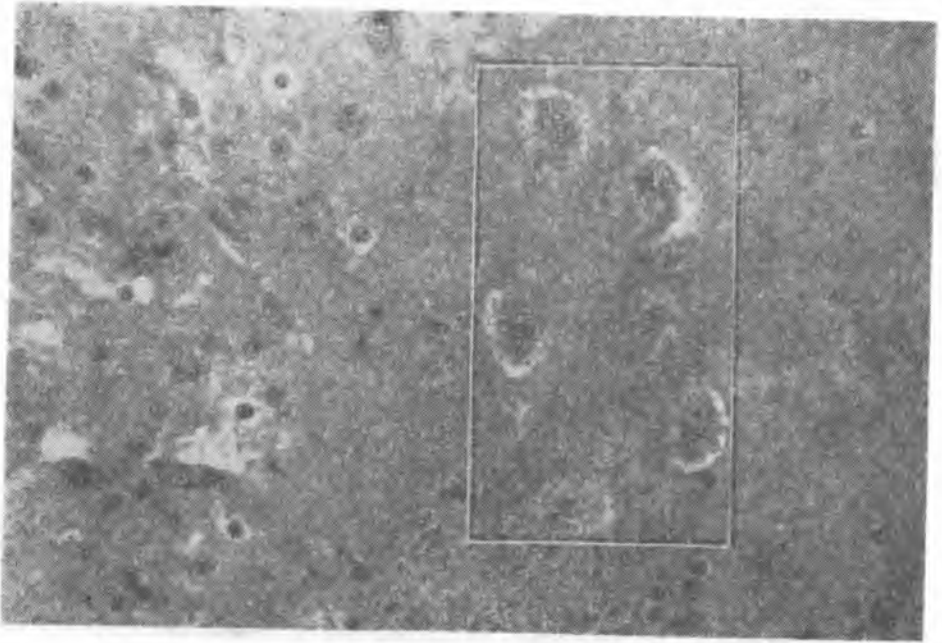




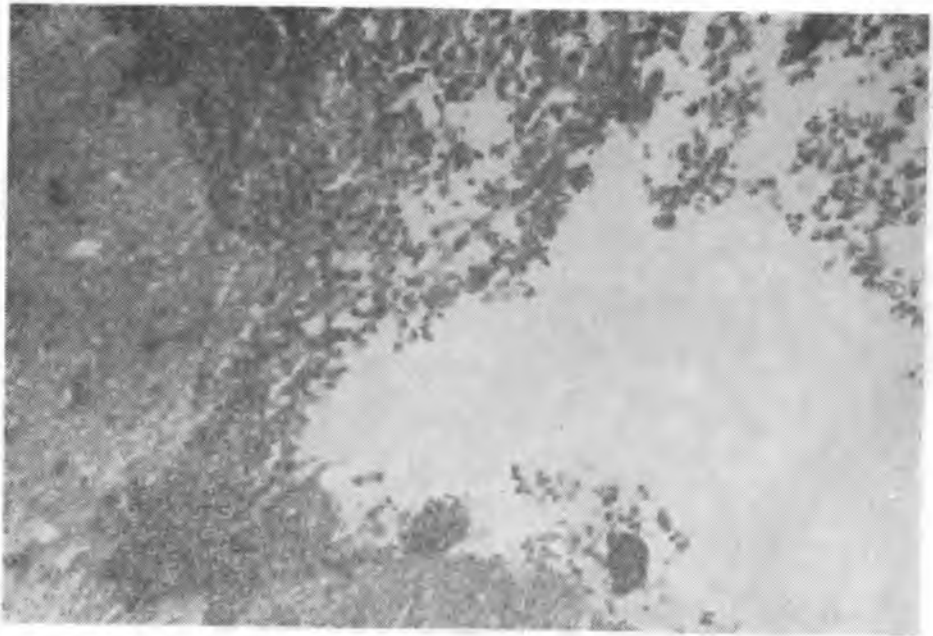
Ryc. 1



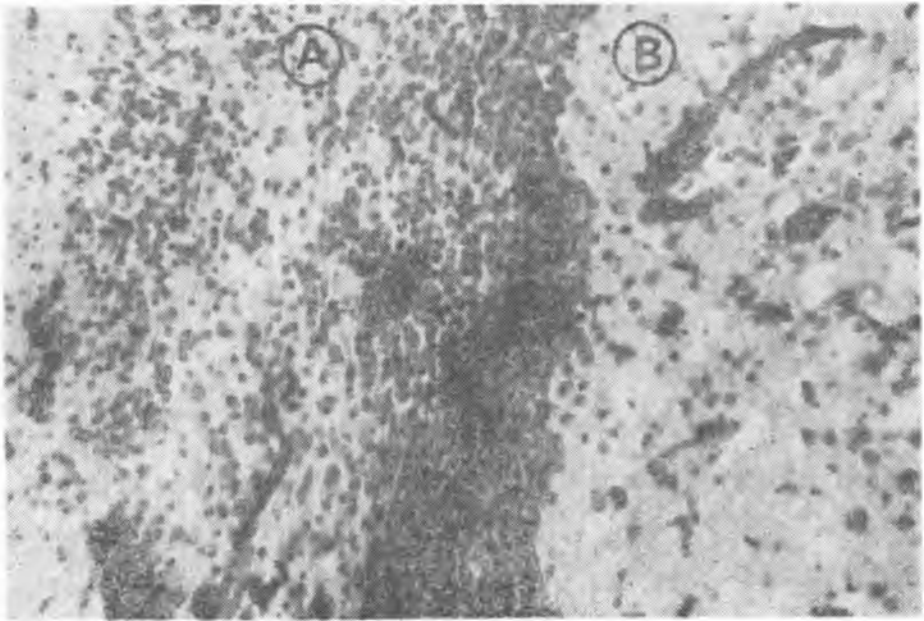
Ryc. 2



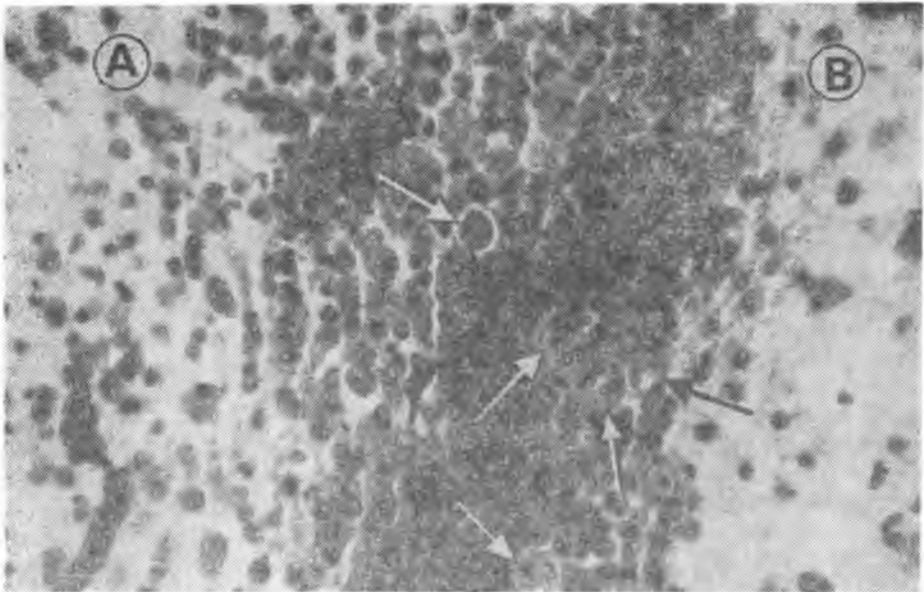
Ryc. 3



Ryc. 4



Ryc. 5



Ryc. 6

