

Elżbieta Krzemińska-Jaśkowiak, Zefiryn Cybulski, Krystyna Pietkiewicz

CHARAKTERYSTYKA SZCZEPÓW *CANDIDA SP.* IZOLOWANYCH Z RÓŻNYCH MATERIAŁÓW KLINICZNYCH W LATACH 1989–1993

Zakład Mikrobiologii Lekarskiej Instytutu Mikrobiologii i Chorób Zakaźnych
Akademii Medycznej w Poznaniu
Kierownik: prof. dr hab. med. *K. Pietkiewicz*

*Przedstawiono charakterystykę szczepów *Candida sp.* izolowanych z różnych materiałów klinicznych, wykorzystując wyniki badań własnych, w których uwzględniono najczęściej występujące gatunki rodzaju *Candida*, serotypy oraz biotypy określone na podstawie cech enzymatycznych.*

Na całym świecie zakażenia grzybami stanowią istotną a także coraz częstszą przyczynę chorób. *Edwards* i wsp. (8) podają, że wśród czynników powodujących zakażenia w latach 1980–1990, 7,9% stanowiły grzyby, z tego 79% należało do rodzaju *Candida*.

Rieth (23) zmiany chorobowe wywołane grzybami *Candida* określa terminem kandydozy. Częstość występowania kandydoz wzrasta z kilku powodów w tym: coraz szerszego stosowania antybiotyków o szerokim spektrum działania, cytostatyków i kortykosterydów. Również choroby wyniszczające organizm gospodarza takie jak gruźlica lub cukrzyca stwarzają odpowiednie warunki do wystąpienia zakażenia grzybiczego.

Grzyby z rodzaju *Candida* mogą być czynnikiem etiologicznym różnorodnych zmian chorobowych np. w obrębie skóry (18), paznokci i wałów paznokciowych (13) a także dróg moczowo-płciowych (16). W ciągu ostatnich kilku lat znacznie wzrosła liczba doniesień omawiających zakażenia o etiologii grzybiczej u osób leczonych w oddziałach chirurgicznych (24).

Zakażenia grzybami drożdżopodobnymi w tym z rodzaju *Candida* odgrywają coraz większą rolę również w przypadkach zakażenia wirusem HIV (4). Kandydoza jamy ustnej jest uznawana za zwiastun AIDS, ponieważ jest zjawiskiem bardzo rzadkim u dorosłych, dotychczas zdrowych osób, które nie otrzymywały antybiotyków ani kortykosterydów i u których nie stwierdzono białaczki, cukrzycy lub innego czynnika prowadzącego do stanu immunosupresji (11).

Celem naszej pracy była charakterystyka grzybów należących do rodzaju *Candida* izolowanych z różnych materiałów klinicznych.

Tabela I Gatunek i liczba oraz źródło pochodzenia wyizolowanych szczepów rodzaju *Candida*

Gatunek i liczba szczepów		Źródło pochodzenia											
		wydzielina z pochwy		śluzówka jamy ustnej i gardła		mocz	materiał chirurgiczny	wały i płytki paznokciowe	plwocina	nasienie	żółć	wymaz z pachwiny	materiał ropny (krosty na twarzy)
n	%	n	%	n	%								
<i>Candida albicans</i>													
317	75,5	187	73,3	105	88,9	5	7	3	6	1	1	1	1
<i>Candida krusei</i>													
52	12,4	40	15,7	6	5,1	5				1			
<i>Candida tropicalis</i>													
33	7,8	20	7,8	3	2,5	2	5	2	1				
<i>Candida parapsilosis</i>													
5	1,2	3	1,2					2					
<i>Candida pseudotropicalis</i>													
4	0,9	1	0,4	2	1,7	1							
<i>Candida stellatoidea</i>													
3	0,7	3	1,2										
<i>Candida pelliculosa</i>													
2	0,5	1	0,4	1	0,9								
<i>Candida guillier-mondii</i>													
2	0,5			1	0,9			1					
<i>Candida humicola</i>													
2	0,5							2					
420	100	255	100	118	100	13	12	10	7	2	1	1	1

MATERIAŁ I METODY

Badano 420 szczepów grzybów należących do rodzaju *Candida*, wyizolowanych z różnych materiałów klinicznych takich jak: wydzielina z pochwy, wymazy ze śluzówki jamy ustnej i gardła, mocz, materiał pobrany śródoperacyjnie z raka krtani, jamy otrzewnej, jamy brzusznej i z jelita, płytki i wały paznokciowe, plwocina, nasienie, żółć, wymaz z pachwiny, materiał ropny.

Wyhodowane grzyby identyfikowano na podstawie cech morfologicznych, prób biochemicznych (12) oraz w oparciu o system API 20C AUX (bioMerieux). Diagnostykę serologiczną szczepów *Candida albicans* przeprowadzono przy użyciu surowic aglutynacyjnych przygotowanych wg *Aksoycan* i *Le Minor* (1).

Właściwości enzymatyczne grzybów określono na podłożach stałych wg *Wernera* (28) i *Staiba* (25). Ocenę wrażliwości na leki przeciwgrzybicze szczepów z rodzaju *Candida* wykonano metodą dyfuzyjno-krażkową na podłożu YNB (produkcji DOM Handlowy Nauki Sp. z o.o. PAN Kraków). W badaniu uwzględniono następujące leki: amfoterycynę B, 5-fluorocytozynę, nystatynę, pimarycynę, klotrimazol, mikonazol, ketokonazol i tiokonazol.

WYNIKI

Zbadano 420 szczepów grzybów należących do rodzaju *Candida*, wyhodowanych z różnych materiałów klinicznych, które zakwalifikowano do różnych gatunków (tab. I). Najliczniej reprezentowany był gatunek *C. albicans* (wyizolowano 317 tj. 75,5% szczepów tego gatunku), głównie serotyp A (tab. II). Na drugim miejscu pod względem częstości występowania był gatunek *Candida crusei* – 52 szczepy tj. 12,4% wszystkich zebranych szczepów, natomiast na trzecim gatunek *Candida tropicalis* (33 szczepy – 7,8%). Gatunki takie jak *C. parapsilosis*, *C. pseudotropicalis*, *C. stellatoidea*, *C. pelliculosa*, *C. guilliermondi*, *C. humicola* izolowano sporadycznie.

Tabela II. Serotypy A i B *Candida albicans* w badanym materiale

Rodzaj materiału	Liczba szczepów <i>Candida albicans</i>		Liczba szczepów serotypu A		Liczba szczepów serotypu B	
	n	%	n	%	n	%
Wydzielina z pochwy	187	100	179	95,7	8	4,3
Wymaz ze śluzówki jamy ustnej i gardła	105	100	103	98,1	2	1,9
Materiał chirurgiczny	7		7		–	
Plwocina	6		5		1	
Mocz	5		5		–	
Wały i płytki paznokciowe	3		3		–	
Nasienie	1		1		–	
Żółć	1		1		–	
Wymaz z pachwiny	1		1		–	
Materiał ropny (krosty na twarzy)	1		1		–	
Razem	317	100	306	96,5	11	3,5

Tabela III. Właściwości enzymatyczne (biotypy) wyizolowanych szczepów rodzaju *Candida*

Biotyp	Lipoliza		Proteoliza		<i>Candida albicans</i>		<i>Candida krusei</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida pseudotropicalis</i>	<i>Candida stellatoidea</i>	<i>Candida pelliculosa</i>	<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Candida humicola</i>
	30°C	37°C	A*	K**	n 317	% 100	n = 52	n = 33	n = 5	n = 4	n = 3	n = 2	n = 2	n = 2
I	+	+	+	+	150	47,3		4						
II	+	+	+	-	70	22,1	1	6			1			
III	+	+	-	+	57	17,9	2	1			1			
IV	+	+	-	-	33	10,4		2						1
V	+	-	+	+	1	0,3								
VI	+	-	+	-			1				1			
VII	-	+	+	-			1							
VIII	-	+	-	+	1	0,3								
IX	-	+	-	-			1	1						
X	-	-	+	+	1	0,3								
XI	-	-	+	-	4	1,3	41	15	2	1		1		
XII	-	-	-	+			5		3	1		1		
XIII	-	-	-	-				4		2			2	1

*A – albumina ludzka

**K – kazeina

Właściwości enzymatyczne wyizolowanych szczepów *Candida sp.* przedstawiono w tabeli III. Szczepy *C. albicans* zaliczono głównie do pierwszych czterech biotypów (I, II, III, IV) (tj. 310 szczepów). Natomiast szczepy *C. krusei* i *C. tropicalis* zaliczono do biotypu XI. Pozostałe gatunki należały do różnych biotypów.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono występowanie w badanym materiale różnych gatunków grzybów należących do rodzaju *Candida*. (tab. I). Dominował gatunek *C. albicans* należący głównie do serotypu A. Wyniki te nie odbiegają od uzyskanych przez innych autorów (8, 26), wg których występowanie tego gatunku w obrębie błony śluzowej jamy ustnej i pochwy nie jest rzadkie i wynosi od 10 do 80% wszystkich izolowanych grzybów drożdżopodobnych z rodzaju *Candida*.

Drugim gatunkiem pod względem częstości występowania w badanym materiale był gatunek *C. krusei*, trzecim *C. tropicalis*. Podobną kolejność częstości izolowania wymienionych gatunków uzyskali z dróg moczowo-płciowych ludzi Szarmach i wsp. (27), a z pochwy – Pawlik i wsp. (21) oraz z przestrzeni międzypalcowych Niczyporuk i wsp. (17). Natomiast Malyszko i Zajac (14) izolowali z dróg moczowo-płciowych u kobiet i mężczyzn najczęściej szczepy z gatunku *C. albicans*, następnie *C. tropicalis* i dopiero na piątym miejscu *C. krusei*. Pozostałe gatunki *Candida* izolowano znacznie rzadziej.

Typowanie serologiczne szczepów *C. albicans* wykazało, że wśród 317 szczepów tego gatunku wyizolowanych z całego badanego materiału 306 (96,5%) należało do serotypu A, natomiast 11 (3,5%) do serotypu B (tab. II). Dane te są zbliżone do wyników innych autorów (7, 15, 22). Częstość występowania serotypów A i B wśród białej ludności Europy była badana przez Drouheta i wsp. (7), którzy stwierdzili przewagę występowania serotypu A – 96%. Perot i wsp. (22) serotyp A stwierdzili w 90% a serotyp B w 10% przypadków zakażenia *Candida albicans*, a Martinez-Battista i wsp. (15) w różnych szpitalach Hawany stwierdzili przewagę serotypów A – 95,2%. Natomiast Hasenclever i Mitchell (9) spośród 653 szczepów *C. albicans* wyizolowanych w USA, 67,7% zaliczyli do serotypu A i 32,3% do serotypu B, a Auger i wsp. (2) od białych pacjentów w Kanadzie izolowali 74,3% szczepów należących do serotypu A i 25,7% – do serotypu B.

Wyjaśnieniem tych różnic może być pochodzenie szczepów z innego regionu geograficznego, gdyż rezultaty te wskazują na różnice między występowaniem serotypów A i B w Ameryce Północnej, na Kubie i w Europie.

Określenie właściwości enzymatycznych badanych 420 szczepów z rodzaju *Candida* pozwoliło na określenie gatunku, jak również różnicowanie wewnątrzgatunkowe przez wyróżnienie tzw. biotypów (tab. III). Zdolność wydzielania lipaz badano w temperaturze 30° i 37°, a wytwarzanie proteaz badano jednocześnie wobec dwóch substratów tj. albuminy ludzkiej i kazeiny, podczas gdy inni autorzy wykorzystywali samą albuminę (25) lub samą kazeinę (17). Pozwoliło to nam stworzyć prosty system typowania grzybów drożdżopodobnych tylko wykorzystując właściwości enzymatyczne. Razem wyróżniono 13 biotypów. Najbardziej aktywny pod tym względem był gatunek *C. albicans*, który zaliczono do 8 różnych biotypów, przy czym dominował biotyp I (spośród 317 – 150 szczepów tj. 47,3% zaliczono do tego biotypu). Może to

wskazywać na rolę właśnie tego biotypu w powstawaniu infekcji grzybiczych wywołanych przez *C. albicans*. Natomiast szczepy z gatunku *C. krusei* i *C. tropicalis* należały głównie do biotypu XI. Szczepy te nie wykazywały właściwości lipolitycznych, a tylko proteolityczne wobec albuminy ludzkiej. Biorąc pod uwagę, że gatunki te coraz częściej izolowane są z różnych materiałów klinicznych, należałoby podkreślić rolę właściwości proteolitycznych w chorobotwórczości tych szczepów. Huben i Hauck (10) w swoich badaniach wskazują, że lepszym wyznacznikiem w różnicowaniu szczepów *Candida* jest produkcja proteinaz niż lipaz.

Do różnicowania patogennych gatunków rodzaju *Candida* różni badacze stosowali różne systemy (5, 19, 20). Biorąc jednak pod uwagę, że liczba grzybic ma tendencję wzrostową, a sama izolacja czynnika etiologicznego nie określa czy mamy do czynienia z tym samym szczepem i o takich samych cechach, zastosowanie odpowiedniego systemu do typowania i wyróżnienie biotypów może ukazać istotne różnice między szczepami danego gatunku i wskazać cechy mające znaczenie w dochodzeniu epidemiologicznym.

Badanie lekowrażliwości szczepów z rodzaju *Candida* wykazało, że były one wrażliwe głównie na amfoterycynę B, 5-fluorocytosynę, nystatynę a wśród pochodnych azolowych wrażliwość występowała głównie na klotrimazol i tiokonazol.

Należy podkreślić że:

W różnych materiałach klinicznych mogą występować różne gatunki rodzaju *Candida*. Badanie właściwości enzymatycznych *Candida* może być pomocne w dochodzeniu epidemiologicznym. Zwłaszcza typowanie serologiczne szczepów *Candida* może stanowić uzupełnienie metod diagnostycznych stosowanych w dochodzeniu epidemiologicznym. Szczegółowa diagnostyka mykologiczna grzybów drożdżopodobnych z rodzaju *Candida* jest niezbędna w charakterystyce epidemiologicznej grzybic.

E. Krzezińska-Jaśkowiak, Z. Cybulski, K. Pietkiewicz

CHARACTERIZATION OF *CANDIDA* SP. STRAINS ISOLATED FROM DIFFERENT CLINICAL SPECIMENS IN THE YEARS 1989-1993

SUMMARY

420 *Candida* sp. strains, which were isolated from the following specimens: vaginal secretions, throat swabs, urine, surgical specimen, nail specimen, sputum, semen, bile, skin, swab, pus were examined. On the basis of morphological and biochemical examinations it was established that in the above mentioned specimens are presented different species of *Candida* genus. Most often were isolated *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*.

Among 317 *C. albicans* strains, 306 belonged to serotype A, 11 strains belonged to serotype B. The determination of enzymatic properties made possible the differentiation of strains *C. albicans* species from other species, and made it possible to define the biotypes.

Sensitivity tests for examined strains made the characterization more particular.

PIŚMIENNICTWO

1. Aksoycan L., Le Minor S.: Ann. Inst. Pasteur, 1960, 99, 723. – 2. Auger P., Dumas C., Joly J.: J. Infect. Dis., 1979, 5, 590. – 3. Banach-Piątkowska W.: Wiad. Lek. 1976, 2, 2077. – 4. Bruatto M., Vidotto V., Marinuzzi G., Raiteri R., Sinicco A.: J. Clin. Microbiol., 1991, 29, 726.

- 5. Budak A., Trojanowska D., Pękacki A.: Med. Dośw. Mikrobiol., 1988, 41, 161. - 6. Doleżał M.: Post. Mikrobiol., 1975, 15, 143. - 7. Drouhet E., Mercier-Soucy L., Montplaisir S.: Ann Microbiol., (Inst. Pasteur) 1975, 126B, 25. - 8. Edwards J.E.: New Engl. J. Med., 1991, 324, 1060. - 9. Hasenclever H.F., Mitchell W.O.: Sabouraudia 1963, 2, 201. - 10. Huben H., Hauck H.: Mykoses, 1988, 31, 418.
11. Juszczak J., Gładysz A.: AIDS - epidemiologia, patogeneza, klinika, leczenie, zapobieganie, poradnictwo. Volumed, Wrocław 1992. - 12. Kurnatowska A.: Przewodnik do ćwiczeń z mikologii lekarskiej. PZWL, Warszawa 1982. - 13. Kwaśniewska J., Szymańska H.: Przeg. Derm., 1981, 68, 55. - 14. Malyszko E., Zajac W.: Przeg. Derm., 1977, 64, 191. - 15. Martinez-Batista M.L., Martinez-Machin B., Fernandez-Audreu C., Hernandez A.L.: Mem. Inst. Oswaldo Crus., 1990, 85, 61. - 16. Milart-Szajner J., Zajaczkowska M., Wawrzkiwicz K.: Pol. Tyg. Lek., 1988, 43, 1584. - 17. Niczyporuk W., Krajewska-Kulak E.: Przeg. Derm., 1990, 77, 118. - 18. Nowak W., Bartkiewicz-Mika M., Zabel J.: Ped. Pol., 1979, 54, 417. - 19. Odds F.C., Abbott A.B.: Sabouraudia, 1980, 18, 301. - 20. Odds F.C., Abbott A.B.: Sabouraudia, 1983, 21, 79.
21. Pawlik B., Liber Z., Jurkowska E.: Med. Dośw. Mikrobiol., 1989, 41, 60. - 22. Perrot M.O., Grillot R., Ambroise-Thomas P.: Etude de 680 souches. Bulletin de la Societe Francaise de Mycologie Medicale 1977, 6, 305. - 23. Rieth H.: Grzybice wywołane przez drożdżaki. PZWL, Warszawa 1983. - 24. Rodrigueus R.J., Wolff W.J.: Ann. Surg., 1974, 180, 741. - 25. Staib F.: Sabouraudia, 1965, 4, 187. - 26. Stożek K., Pawlik B.: Przeg. Epid., 1982, 36, 263. - 27. Szarmach H., Malyszko E., Poniecka H., Zaremba A.: Przeg. Derm., 1977, 64, 591. - 28. Werner H.: Zbl. Bakt. I Orig., 1966, 200, 113.

Adres: Oś. Wichrowe Wzgórze 15/135, 61-676 Poznań