ROBERT GONTEK^{A–F}

Aktywność enzymów hydrolitycznych szczepów grzybów drożdżopodobnych izolowanych z ontocenozy jamy ustnej i moczu użytkowników protez płytowych – badania wstępne

The Activity of Hydrolytic Enzymes of Yeast-Like Fungal Strains Isolated from the Oral Ontocenosis and from the Urine of the Plate Denture Wearers: Initial Evaluation

Katedra Protetyki Stomatologicznej, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Warszawa, Polska

A – koncepcja i projekt badania, B – gromadzenie i/lub zestawianie danych, C – analiza i interpretacja danych, D – napisanie artykułu, E – krytyczne zrecenzowanie artykułu, F – zatwierdzenie ostatecznej wersji artykułu

Streszczenie

Wprowadzenie. Obecność w jamie ustnej ruchomych, płytowych uzupełnień protetycznych jest ważnym czynnikiem ryzyka powstawania stomatopatii protetycznych powikłanych zakażeniem grzybiczym. W powstawaniu i rozwoju zakażenia grzybiczego ważną rolę odgrywają enzymy hydrolityczne.

Cel pracy. Przeprowadzono identyfikację gatunkową szczepów grzybów drożdżopodobnych u użytkowników płytowych, ruchomych uzupełnień protetycznych, u których stwierdzono stomatopatię protetyczną oraz oceniono aktywności enzymów hydrolitycznych w uzyskanych izolatach i w bezpośrednich próbkach moczu.

Materiał i metody. Badanie przeprowadzono wśród 20 pacjentów, u których stwierdzono stomatopatię protetyczną, bez cech zaburzonej immunokompetencji układu odpornościowego. Pobrano 40 próbek materiału biologicznego, na które składało się 20 wymazów z podniebienia oraz 20 próbek moczu. W badanych próbkach oznaczano gatunki grzybów drożdżopodobnych oraz wykonywano oznaczenie aktywności enzymów hydrolitycznych.

Wyniki. Na podstawie hodowli z wymazów z podniebienia uzyskano 16 szczepów *Candida albicans* i 5 szczepów *Candida tropicalis*. Badanie aktywności hydrolaz w uzyskanych izolatach *Candida albicans* pozwoliło zakwalifikować badane grzyby do: biotypu A w 8 przypadkach, biotypu C3 – w 6, biotypu B1 – w 2 oraz C2 – w 1. W próbkach moczu nie wykazano wzrostu kolonii grzybów drożdżopodobnych, stwierdzono natomiast aktywność enzymów hydrolitycznych.

Wnioski. Wśród użytkowników płytowych protez ruchomych, u których stwierdzono stomatopatię protetyczną dominującym gatunkiem w uzyskanych izolatach była *Candida albicans*. W stomatopatiach protetycznych powikłanych zakażeniem grzybiczym zaobserwowano uwalnianie enzymów hydrolitycznych do moczu bez cech kandydury. Wraz ze zwiększającym się zaawansowaniem stadiów stomatopatii protetycznej zwiększała się także wirulentność izolowanych szczepów grzybiczych (**Dent. Med. Probl.** 2016, 53, 1, 56–65).

Słowa kluczowe: stomatopatia protetyczna, grzyby drożdżopodobne, aktywność enzymów hydrolitycznych.

Abstract

Background. The presence of removable, plate dentures in the mouth is a major risk factor for denture stomatitis complicated by fungal infection. Hydrolytic enzymes play a very important role in the formation and development of fungal infection.

Objectives. The aim of this study was to identify the species of yeast-like fungal strains in patients with plate-removable dentures and diagnosed denture stomatitis as well as to evaluate the activity of hydrolytic enzymes in derived isolates and in direct urine specimens.

Material and Methods. The study was conducted in a group of 20 patients with diagnosed denture stomatitis

without the features of impaired immunocompetence of the immune system. The authors collected 40 samples of biological material (20 palate smear samples; 20 urine samples) in order to determine the yeast-like fungi and the activity of hydrolytic enzymes.

Results. On the basis of grown cultures, the authors obtained 16 strains of *Candida albicans* and 5 strains of *Candida tropicalis*. The hydrolase activity testing in the *Candida albicans* isolates allowed for the classification of examined fungi into biotype A in 8 cases, into biotype C3 in 6 cases, into biotype B1 in 2 cases, and into biotype C2 in 1 case.

Conclusions. The authors reported that *Candida albicans* predominated among all strains in patients with plate dentures and diagnosed prosthetic stomatopathy. The release of hydrolytic enzymes into the urine without any features of candiduria was reported in patients with denture stomatitis complicated with fungal infections. The virulence of isolated fungal strains increased with the increasing severity of prosthetic stomatopathy stages (**Dent. Med. Probl.** 2016, 53, 1, 56–65).

Key words: denture stomatitis, yeast-like fungi, hydrolase activity.

Jama ustna to naturalny ekosystem bytowania w warunkach komensalizmu mikroorganizmów bakteryjnych i grzybiczych. Wydolny układ immunologiczny gospodarza oraz prawidłowa fizjologia jamy ustnej utrzymują w naturalnej równowadze mikroflorę jamy ustnej. Najczęściej spotykanym gatunkiem grzybów drożdżopodobnych występującym w jamie ustnej jest *Candida albicans*. Szacuje się, że w zdrowej populacji gatunek ten występuje u 30–40% pacjentów [1, 2].

Obecność w jamie ustnej ruchomych, płytowych uzupełnień protetycznych powoduje znaczącą zmianę warunków bytowania komensalnych grzybów drożdżopodobnych. Mechanizm powstawania нефизиологических warunków w jamie ustnej przez płytę protezy jest spowodowany wieloma czynnikami. Polega na zaburzeniu metabolizmu tkanek podłoża protetycznego przez ograniczenie dopływu tlenu, zaleganie śliny oraz resztek pokarmowych, a także utrudnioną sekrecję gruczołów śluzowych wywołanych mechanicznym uciskiem przez płytę protezy. Mały współczynnik przepuszczalności cieplnej tworzywa akrylowego może prowadzić do miejscowego wzrostu temperatury pod płytą protezy, nawet do 40°C, co w połączeniu z utrudnionym samooczyszczaniem resztek pokarmowych przez ślinę doprowadza do wzmożonego odkładania się płytki protez oraz powstawania biofilmu grzybiczego. Dodatkowo dochodzi do obniżenia pH błony śluzowej podłoża protetycznego obserwowanego zwłaszcza w diecie bogatej w węglowodany, zaostrzającego stanu zapalnego i przyspieszenia namnażania się kolonii grzybów drożdżopodobnych [3, 4].

Do czynników inicjujących i podtrzymujących stan zapalny błony podłoża protetycznego zalicza się również uraz mechaniczny wywołany szorstkością dośluzowej strony płyty protezy, nieprawidłową okluzją oraz niedostateczną stabilizacją. Pewną rolę odgrywają również czynniki chemiczno-toksyczne związane z obecnością wolnego monomeru akrylowego.

Stosowanie szybko polimeryzującego tworzywa akrylowego w jamie ustnej oprócz pojawiania

się znacznych ilości wolnego monomeru powoduje również uwalnianie znacznej ilości ciepła, doprowadzając dodatkowo do urazu termicznego [3, 5]. Istotnym czynnikiem wpływającym na rozwój zakażeń grzybiczych jamy ustnej osób mających ruchome uzupełnienia protetyczne jest sposób użytkowania protez oraz nawyki higieniczne. Zły stan higieny jamy ustnej i uzupełnień protetycznych, całodobowe ich użytkowanie oraz przechowywanie protez w wilgotnym środowisku w znacznym stopniu wpływają na rozwój i przebieg stomatopatii protetycznych powikłanych zakażeniem grzybiczym [5–8]. Za główne patogeny uważa się grzyby z rodzaju: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida crusei* oraz *Torulopsis glabrata*, rzadziej *Candida parapsilosis* i *Candida guilliermondii* [3–5, 9, 10]. Stomatopatie protetyczne powikłane zakażeniem grzybiczym to narastający problem zdrowotny starzejących się społeczeństw krajów rozwiniętych. Potwierdza to coraz większa częstość występowania, trudności w zapobieganiu i leczeniu oraz możliwość nawrotów i powikłań [11, 12]. Częstość występowania stomatopatii protetycznych u użytkowników protez jest określana na poziomie 36–85%, wśród których zakażenie grzybami drożdżopodobnymi odnotowuje się w 60–100% przypadków [13]. W badaniach przeprowadzonych wśród 100 pacjentów użytkujących protezy całkowite Mierzwińska-Nastalska et al. [14] potwierdzili obecność grzybów drożdżopodobnych w 71% przypadków, stosując metodę wymazu bezpośredniego z błony śluzowej jamy oraz w 94% przypadków posługując się diagnostyczną metodą repliki.

W przeprowadzonych badaniach ocenie poddano florę grzybiczą jamy ustnej użytkowników ruchomych protez płytowych, u których stwierdzono stomatopatię protetyczną w różnym stopniu zaawansowania oraz określono aktywności enzymów hydrolitycznych szczepów uzyskanych z hodowli na podstawie wymazów bezpośrednich z podniebienia oraz w bezpośrednich próbkach moczu. Oznaczono również biotypy szczepów *Candida albicans* uzyskanych z hodowli na podłożu Sabourauda.

Material i metody

Spośród 82 pacjentów Katedry Protetyki Stomatologicznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego oraz Kliniki Chirurgii Ogólnej i Transplantacyjnej Szpitala Klinicznego Dzieciątka Jezus w Warszawie wybrano grupę 20 osób użytkujących ruchome, płytowe uzupełnienia protetyczne, u których nie stwierdzono objawów zaburzenia czynności układu odpornościowego. W badanej grupie pacjentów na podstawie badania podmiotowego i przedmiotowego stwierdzono objawy stomatopatii protetycznej dającej podstawy do zakwalifikowania stadium procesu chorobowego do jednej z 3 grup zgodnie z klasyfikacją Newtona [15]. Badaną grupę stanowiło 11 mężczyzn i 9 kobiet w wieku 45–66 lat (średnia wieku 52,75 lat), u których nie stwierdzono chorób ogólnych mających wpływ na zaburzenie czynności układu odpornościowego. Pacjenci użytkowali ponad rok ruchome uzupełnienia akrylowe pokrywające swoim zasięgiem ponad połowę powierzchni podniebienia.

Badania kliniczne składały się z badania podmiotowego oraz badania przedmiotowego stanu błony śluzowej jamy ustnej i oceny użytkowanych protez. W badaniu podmiotowym uwzględniano objawy subiektywne zgłaszane przez pacjentów w postaci dolegliwości bólowych, uczucia pieczenia pod protezą, suchości w jamie ustnej i zaburzeń smaku. Stan błony śluzowej podłoża protetycznego oceniano według kryteriów klasyfikacji Newtona. W ocenie stanu protez zwracano uwagę na czas i sposób użytkowania, nawyki żywieniowe, stabilizację i okluzję uzupełnień protetycznych oraz stan higieny.

Do badań mikrobiologicznych użyto 40 próbek będących materiałem klinicznym składającym się z 20 wymazów z podniebienia i 20 próbek moczu uzyskanych od pacjentów użytkujących ruchome, płytowe uzupełnienia protetyczne, u których stwierdzono stomatopatię protetyczną o różnym stopniu zaawansowania. Wymaz z podniebienia był pobierany z wykorzystaniem jednorazowego zestawu złożonego z jałowej pałeczki wymazowej i próbówki z podłożem transportowym Transmedium® firmy Hagmed. Mocz do badania pobierano do jednorazowego, sterylnego pojemnika. Uzyskane próbki biologiczne przekazywano niezwłocznie do Pracowni Mikologicznej Zakładu Mikrobiologii Lekarskiej Wydziału Lekarsko-Dentystycznego WUM.

Hodowli grzybów drożdżopodobnych dokonywano przez posiew uzyskanych próbek stanowiących materiał kliniczny na uniwersalne podłoże Sabourauda i inkubację przez 24–72 godziny w temperaturze 30°C. Identyfikacji gatunkowej uzyskanych izolatów dokonywano z użyciem ko-

mercyjnych testów ID 32C. W tym celu sporządzano zawiesinę uzyskanych kolonii grzybów w 2 ml Suspension Medium o gęstości 2 w skali McFarlanda. Następnie 250 µl uzyskanej zawiesiny umieszczano w API C Medium, a potem wypełniano testowe mikroprobówki o pojemności 13 µl. Po inkubacji w temperaturze 37°C przez 24–48 godzin odczytywano test z zastosowaniem automatycznego systemu identyfikacji ATB Expression.

Badania aktywności enzymów hydrolitycznych uwalnianych przez uzyskane izolaty grzybicze wykonywano z użyciem testu API-ZYM® firmy Bio Mérieux. Ta półilościowa mikrometoda określa 19 swoistych reakcji enzymatycznych z określonym substratem w obecności bufora. Pierwsza studzienka testowa stanowi ujemną kontrolę testu. Druga wykrywa reakcję enzymatyczną charakterystyczną dla fosfatazy zasadowej. W mikroprobówkach 3–5 znajduje się substrat dla reakcji enzymatycznej lipaz, w studzienkach diagnostycznych 6–10 zachodzi reakcja swoista dla proteaz. Mikroprobówki 11 i 12 określają sekrecję fosfataz, studzienki diagnostyczne 13–20 przeprowadzają reakcję swoistą dla glikozydaz (tab. 1).

W celu określenia aktywności enzymów hydrolitycznych z izolatów grzybów drożdżopodobnych sporządzano w 2 ml API Suspension Medium zawiesinę kolonii o gęstości 5–6 w skali McFarlanda. Następnie porcje 65 µl umieszczano w mikrostudzienkach testowych, poddając inkubacji w temperaturze 37°C przez 4–4,5 godziny. Po okresie inkubacji dodawano po 1 kropli odczynnika ZYM A i ZYM B do każdej z mikroprobówek testowych.

Skład odczynnika ZYM A to: 15 g tri-hydroksymetylu-amino-metanu, 21 ml kwasu chlorowodorowego, 10 g siarczanu laurowego oraz do 100 ml wody destylowanej. Odczynnik ZYM B zawiera: 0,33 g Fast Blue BB oraz do 100 ml 2-metoksy-etanolu. Intensywność barwnej reakcji enzymatycznej określano po upływie 5 minut z wykorzystaniem tabeli odczytów dołączonej do zestawu testowego w skali 0–5 (tab. 2).

Półilościowy mikrotest API-ZYM zastosowano również do określenia aktywności enzymatycznej hydrolaz w bezpośrednich próbkach klinicznych moczu. Porcje 65 µl badanej próbki moczu umieszczano w mikrokomorach inkubacyjnych testu API-ZYM i poddawano inkubacji w temperaturze 37°C przez 4 godziny.

Następnie dodawano barwnie reagujące odczynniki ZYM A i ZYM B. Intensywność reakcji barwnej określano po 5 minutach zgodnie ze wzorcową skalą barwną testu.

Potencjalnie wirulentne szczepy *Candida albicans* określano zgodnie z klasyfikacją Williamsona

Tabela 1. Oznaczane hydrolazy i substraty reakcji enzymatycznych**Table 1.** Hydrolases and the substrates of enzymatic reactions

Nr/ No.	Enzym / Enzyme	Substrat / Substrate	pH
1.	kontrola		
2.	fosfataza alkaliczna	2-naftylo-fosforan	8,5
3.	esteraza (C 4)	2-naftylo-maślan	6,5
4.	esteraza Lipaza (C 8)	2-naftylo-kaprylan	7,5
5.	lipaza (C 14)	2-naftylo-mirystynian	7,5
6.	arylamidaza leucyny	L-leucylo-2-naftylamid	7,5
7.	arylamidaza waliny	L-walilo-2-naftylamid	7,5
8.	arylamidaza cystyny	L-cystylo-2-naftylamid	7,5
9.	trypsyna	N-benzoilo-DL-arginino-2-naftylamid	8,5
10.	α -chymotrypsyna	N-glutarylo-feniloalanino-2-naftylamid	7,5
11.	fosfataza kwaśna	2-naftylo-fosforan	5,4
12.	fosfohydrolaza naftylo-AS-BI	Naftylo-AS-BI-fosforan	5,4
13.	α -galaktozydaza	6-Br-2-naftylo- α D-galaktopiranozyd	5,4
14.	β -galaktozydaza	2-naftylo- β D-galaktopiranozyd	5,4
15.	β -glukuronidaza	Naftylo-AS-BI- β D-glukuronid	5,4
16.	α -glukozydaza	2-naftylo- α D-glukopiranozyd	5,4
17.	β -glukozydaza	6-Br-2-naftylo- β D-glukopiranozyd	5,4
18.	N-acetylo- β -glukozaminidaza	1-naftylo-N-acetyl- β D-glukozaminid	5,4
19.	α -mannozydaza	6-Br-2-naftylo- α D-mannopiranozyd	5,4
20.	β -fukozydaza	2-naftylo- α L-fukopiranozyd	5,4

Tabela 2. Intensywność reakcji enzymów hydrolitycznych testu API-ZYM**Table 2.** The intensity of the hydrolytic enzymes reaction according to the API-ZYM test

Intensywność reakcji barwnej The intensity	Intensywność reakcji enzymatycznej – nmol The intensity of enzymes reaction
0	reakcja ujemna – 0
1	5
2	10
3	20
4	30
5	40

et al. [16] w modyfikacji Kurnatowskiej i Kurnatowskiego [17]. Taksonomicznie różnicującym czynnikiem biotypowania była aktywność enzymatyczna 4 enzymów: ariylamidazy walinowej (E 7), fosfohydrolazy naftylo-AS-BI (E 12), α -glukozydazy (E 16) oraz N-acetylo- β -glukozaminidazy (E 18) (tab. 3).

Wyniki

Na podstawie badania podmiotowego i przedmiotowego spośród 20 badanych osób wyszczególniono 2 pacjentów mających objawy stomatopatii protetycznej w I stadium według klasyfikacji Newtona, 11 – w II stadium, a 7 – w III.

W tabeli 4 przedstawiono wyniki badań mikologicznych 40 próbek stanowiących materiał kliniczny w postaci 20 wymazów z podniebienia i 20 próbek moczu. Z posiewu materiału uzyskanego z wymazów z podniebienia zaobserwowano wzrost 15 szczepów grzybów należących do gatunku *Candida albicans* oraz 6 szczepów z gatunku *Candida tropicalis*. U jednego pacjenta hodowla na podłożu Sabourauda wykonana z wymazu z podniebienia pozwoliła na wyodrębnienie jednocześnie obu uzyskanych gatunków grzybów drożdżopodobnych. Z posiewu mikologicznego próbek moczu nie uzyskano wzrostu grzybów (tab. 4).

W badanej grupie pacjentów mających objawy stomatopatii protetycznej w I stadium według klasyfikacji Newtona wyodrębniono z hodowli pojedyncze oraz liczne kolonie należące do gatunku *Candida albicans*. Ocena sekrecji enzymów hydrolitycznych umożliwiła zakwalifikowa-

Tabela 3. Enzymatyczne biotypy *Candida albicans* (klasyfikacja Williamsona w modyfikacji Kurnatowskiej i Kurnatowskiego)

Table 3. The enzymatic biotypes of *Candida albicans* (according to Williamson classification modified by Kurnatowska and Kurnatowski)

Grupa Group	Biotyp Biotype	Arylamidaza walinowa (E 7)	Fosfohydrolaza naftylo-AS-BI (E 12)	α -Glukozydaza (E 16)	N-acetylo- β - glukozaminidaza (E 18)
A	A	+	+	+	+
B	B1	–	+	+	+
	B2	+	–	+	+
	B3	+	+	–	+
	B4	+	+	+	–
C	C1	–	–	+	+
	C2	–	+	–	+
	C4	+	–	–	+
	C5	+	–	+	–
	C6	+	+	–	–
D	D1	–	–	–	+
	D2	–	–	+	–
	D3	–	+	–	–
	D4	+	–	–	–
E	E	–	–	–	–

Tabela 4. Wyizolowane gatunki grzybów drożdżopodobnych z badanych próbek materiału klinicznego

Table 4. The yeast-like fungi species isolated in the evaluated sample material

Próbki materiału klinicznego The evaluated samples	Liczba próbek mate- riału klinicznego The number of evalu- ated samples	Liczba izolowanych szczepów The number of isola- ted species	Gatunek grzybów drożdżopodobnych Yeast-like fungi species	
			<i>Candida albicans</i>	<i>Candida tropicalis</i>
Wymaz z podniebienia	20	21	15	6
Mocz	20	–	–	–
Ogółem	40	21	15	6
%		100	71,4	28,6

nie uzyskanych izolatów grzybów do biotypu C2 oraz C3 według klasyfikacji Williamsona w modyfikacji Kurnatowskiej i Kurnatowskiego. Wyhodowane szczepy *Candida albicans* nie wydzielili enzymu atrylamidazy walinowej (E7) oraz β -galaktozydazy (E14). Szczep zaliczony do biotypu C2 nie wydzieliał również α -glukozydazy (E16), a szczep zaliczony do biotypu C3 enzymu N-acetylo- β -glukozaminidazy (E18).

W posiewie próbek moczu nie wykazano wzrostu kolonii grzybów drożdżopodobnych. Ocena aktywności enzymatycznej w bezpośredniej próbce moczu u pacjenta, u którego z wymazu z jamy ustnej wyizolowano biotyp C2 z dodatkowej hodowli, wykazała aktywność enzymu fosfatazy alkalicznej (E2), fosfatazy kwaśnej (E11) oraz fosfohydrolazy naftylo-AS-BI (E12). Analogiczne badanie próbki moczu z biotypem C3 izolatów *Candida albicans* wykazało brak wydzielania en-

zymu atrylamidazy walinowej (E7) oraz N-acetylo- β -glukozaminidazy (E18) (tab. 5).

W grupie pacjentów mających objawy stomatopatii protetycznej w II stadium zaawansowania według klasyfikacji Newtona uzyskano dodatnie wyniki hodowli z pobranych wymazów z podniebienia oraz nie odnotowano wzrostu grzybów z posiewów próbek moczu. Wyodrębniono 8 szczepów należących do gatunku *Candida albicans* oraz 3 szczepy z gatunku *Candida tropicalis*.

Aktywność uwolnionych enzymów hydrolitycznych umożliwiła zakwalifikowanie szczepów *Candida albicans* do biotypów: A (4 szczepy), C3 (3 szczepy) oraz B1 (1 szczep) według klasyfikacji Williamsona w modyfikacji Kurnatowskiej i Kurnatowskiego.

Szczepy zaliczone do biotypu C3 nie wykazały aktywności enzymatycznej odnośnie enzymu atrylamidazy walinowej (E7) oraz β -Galaktozydazy (E14). Nie stwierdzono również aktywności tych

Tabela 5. Aktywność enzymatyczna w materiale klinicznym uzyskanym od pacjentów, u których stwierdzono stomatopatię protetyczną w I stadium według klasyfikacji Newtona

Table 5. The enzymatic activity in clinical material obtained from patients with confirmed prosthetic stomatopathy in stadium I according to Newton classification

Nr badania No. of the study	Materiał kliniczny Clinical material	Wyhodowany gatunek Grown species	Aktywność enzymów hydrolitycznych The enzymatic activity – nmol										
			E2	E3	E4	E6	E7	E11	E12	E14	E16	E18	BIOTYP
1.	wymaz z podniebienia	poj. kol. <i>C. albicans</i>	0	20	10	20	0	40	10	0	0	30	C2
	mocz	ujemny	20	0	0	0	0	30	5	0	0	0	
2.	wymaz z podniebienia	licz. kol. <i>C. albicans</i>	5	10	30	20	0	10	10	0	20	0	C3
	mocz	ujemny	40	20	30	40	0	40	20	30	30	0	

Tabela 6. Aktywność enzymatyczna w materiale klinicznym uzyskanym od pacjentów, u których stwierdzono stomatopatię protetyczną w II stadium według klasyfikacji Newtona

Table 6. The enzymatic activity in clinical material obtained from patients with confirmed prosthetic stomatopathy in stadium II according to Newton classification

Nr badania No. of the study	Materiał kliniczny Clinical material	Wyhodowany gatunek Grown species	Aktywność enzymów hydrolitycznych The enzymatic activity – nmol										
			E2	E3	E4	E6	E7	E11	E12	E14	E16	E18	BIOTYP
1.	wymaz z podniebienia	licz. kol. <i>C. albicans</i>	10	20	5	30	0	30	10	30	30	20	A
	mocz	ujemny	30	0	0	40	0	40	30	40	40	30	
2.	wymaz z podniebienia	b. licz. kol. <i>C. albicans</i>	20	20	40	40	30	40	10	0	10	20	A
	mocz	ujemny	30	5	30	30	20	40	30	30	40	30	
3.	wymaz z podniebienia	b. licz. kol. <i>C. albicans</i>	30	0	0	40	0	40	10	0	40	0	C3
	mocz	ujemny	30	0	20	30	0	40	30	40	40	0	
4.	wymaz z podniebienia	b. licz. kol. <i>C. albicans</i>	30	20	20	30	0	40	10	0	40	0	C3
	mocz	ujemny	20	0	0	0	0	20	30	5	20	0	
5.	wymaz z podniebienia	b. licz. kol. <i>C. albicans</i>	30	20	10	30	0	30	20	40	30	30	B1
	mocz	ujemny	40	0	0	40	0	40	40	30	40	30	
6.	wymaz z podniebienia	licz. kol. <i>C. albicans</i>	30	20	30	0	40	20	40	20	10	40	A
	mocz	ujemny	40	10	0	0	0	30	30	30	20	30	
7.	wymaz z podniebienia	b. licz. kol. <i>C. albicans</i>	30	40	30	40	30	40	30	0	40	40	A
	mocz	ujemny	20	0	20	40	10	40	40	10	30	20	
8.	wymaz z podniebienia	b. licz. kol. <i>C. albicans</i>	10	20	30	30	0	20	10	0	40	0	C3
	mocz	ujemny	30	10	20	30	0	40	30	40	30	0	
9.	wymaz z podniebienia	b. licz. kol. <i>C. tropicalis</i>	30	20	20	40	0	40	10	0	30	0	
	mocz	ujemny	20	0	0	0	0	30	40	0	30	0	
10.	wymaz z podniebienia	licz. kol. <i>C. tropicalis</i>	40	10	5	30	0	30	10	0	40	0	
	mocz	ujemny	30	10	0	20	0	30	30	0	20	0	
11.	wymaz z podniebienia	b. licz. kol. <i>C. tropicalis</i>	30	20	30	40	0	40	10	0	40	0	
	mocz	ujemny	20	0	5	10	0	30	5	0	30	0	

Tabela 7. Aktywność enzymatyczna w materiale klinicznym uzyskanym od pacjentów, u których rozpoznano stomatopatię protetyczną w III stadium według klasyfikacji Newtona

Table 7. The enzymatic activity in clinical material obtained from patients with confirmed prosthetic stomatopathy in stadium III according to Newton classification

Nr badania No. of the study	Materiał kliniczny Clinical material	Wyhodowany gatunek Grown species	Aktywność enzymów hydrolitycznych The enzymatic activity – nmol										BIOTYP
			E2	E3	E4	E6	E7	E11	E12	E14	E16	E18	
1.	wymaz z podniebienia	licz. kol. <i>C. albicans</i>	20	10	20	40	0	30	10	0	40	0	C3
	mocz	ujemny	20	5	0	0	0	40	10	0	30	0	
2.	wymaz z podniebienia	b. licz. kol. <i>C. albicans</i>	30	20	10	30	10	20	10	20	30	40	A
	mocz	ujemny	30	5	5	20	0	40	40	20	5	5	
3.	wymaz z podniebienia	b. licz. kol. <i>C. albicans</i>	30	10	20	30	20	40	30	30	40	30	A
	mocz	ujemny	40	10	10	40	30	30	30	40	30	20	
4.	wymaz z podniebienia	b. licz. kol. <i>C. albicans</i>	20	10	5	40	10	40	30	20	40	20	A
	mocz	ujemny	30	0	0	10	0	40	30	20	10	0	
5.	wymaz z podniebienia	b. licz. kol. <i>C. albicans</i>	30	20	30	30	30	40	20	30	40	30	A
	mocz	ujemny	40	10	20	40	40	30	30	40	40	20	
6.	wymaz z podniebienia	licz. kol. <i>C. tropicalis</i>	30	30	20	40	10	40	20	30	30	0	
	mocz	ujemny	40	20	30	40	5	20	10	0	40	0	
7.	wymaz z podniebienia	licz. kol. <i>C. albicans</i>	30	30	20	40	0	40	5	30	20	5	B1
		b. licz. kol. <i>C. tropicalis</i>	10	20	10	40	5	40	5	20	40	5	
	mocz	ujemny	20	0	0	30	0	40	20	40	40	20	

enzymów w badaniu bezpośrednich próbek moczu. Szczep zakwalifikowany do biotypu B1 nie wykazał sekrecji z uzyskanych izolatów *Candida albicans* oraz w badaniu próbki moczu odnośnie enzymu aryamidazy walinowej (E7) (tab. 6).

U pacjentów, u których stwierdzono stomatopatię protetyczną III stopnia według klasyfikacji Newtona zaobserwowano duży i bardzo duży wzrost grzybów drożdżopodobnych w hodowlach z wymazu z podniebienia. Uzyskano 5 szczepów grzybów należących do gatunku *Candida albicans* oraz 2 szczepy gatunku *Candida tropicalis*. U jednego pacjenta otrzymano w hodowli oba gatunki grzybów drożdżopodobnych. Nie uzyskano wzrostu grzybów w hodowlach z bezpośrednich próbek moczu.

Sekrecja enzymów hydrolitycznych umożliwiła wyodrębnienie 4 szczepów *Candida albicans* zaliczonych do biotypu A, 1 szczepu do biotypu B1 i 1 szczepu do biotypu C3 według klasyfikacji Williamsona w modyfikacji Kurnatowskiej i Kurnatowskiego. Szczepy *Candida albicans* o biotypie A wykazały uwalnianie wszystkich oznacza-

nych hydrolaz. Szczep zaliczony do biotypu B1 nie uwalniał enzymu aryamidazy walinowej (E7). Izolat o biotypie C3 nie uwolnił hydrolazy aryamidazy walinowej (E7) oraz N-acetylo- β -glukozaminidazy (E18) (tab. 7).

Omówienie

Obecność w jamie ustnej ruchomych uzupełnień protetycznych jest udowodnionym czynnikiem ryzyka powstawania zakażeń grzybiczych błony śluzowej jamy ustnej podnoszonym przez wielu autorów [3–5, 9–12]. Powikłanie w postaci zakażenia grzybami drożdżopodobnymi obserwuje się w 60–100% przypadków rozpoznanych stomatopatii protetycznych [13]. Badając materiał kliniczny pobrany z błony śluzowej jamy ustnej pacjentów, u których stwierdzono stomatopatię protetyczną II i III stopnia według klasyfikacji Newtona, Gümrü et al. [18] zaobserwowali zakażenie grzybicze w 100% przypadków. Wska-

zywali jako główny czynnik etiologiczny grzyby z rodzaju *Candida albicans*, *Candida tropicalis* i *Candida krusei*. Podobną częstość występowania grzybów drożdżopodobnych w jamie ustnej u użytkowników protez (91,7%) odnotowała Kurnatowska [19]. W badaniach Ciesielskiej et al. [20] odsetek zakażenia grzybiczego błony śluzowej jamy ustnej u użytkowników protez ruchomych był nieco mniejszy i obejmował 72% przypadków. Pinto et al. [21] w badaniach przeprowadzonych wśród 140 pacjentów użytkujących ruchome uzupełnienia protetyczne odtwarzające braki zębowe w szczęce stwierdzili wzrost grzybów drożdżopodobnych u 92,9% osób, u których rozpoznano stomatopatię protetyczną, przy czym dominującym gatunkiem (87,7%) była *Candida albicans*. W identycznej pod względem liczebności grupie pacjentów użytkujących ruchome uzupełnienia protetyczne (70 osób), u których nie stwierdzono stomatopatii protetycznej, wzrost kolonii grzybów drożdżopodobnych obserwowano w 58,6% przypadków, a dominującym patogenem (61%) była *Candida albicans*.

W badaniach własnych zaobserwowano wzrost grzybów drożdżopodobnych w hodowlach uzyskanych z wymazów z błony śluzowej jamy ustnej u wszystkich badanych pacjentów (100%). Najczęściej izolowanym gatunkiem grzybów drożdżopodobnych była *Candida albicans* uzyskana w 71,4% przypadków. W pozostałych izolatach czynnikiem etiologicznym była *Candida tropicalis* występująca w 28,6% oznaczeń. U jednego pacjenta, u którego rozpoznano stomatopatię protetyczną III stopnia według klasyfikacji Newtona odnotowano wzrost grzybów obu gatunków. Nie zaobserwowano w żadnym przypadku wzrostu kolonii grzybów drożdżopodobnych w hodowlach z bezpośrednich próbek moczu. Również ujemne wyniki hodowli z bezpośrednich próbek moczu pacjentów, u których stwierdzono stomatopatię protetyczną o etiologii grzybiczej uzyskała Dąbkowska [22], przy jednoczesnych 100% dodatnich wynikach posiewów w przypadkach stwierdzonej kandydury.

Jedną z najistotniejszych cech inwazyjnych form grzybów drożdżopodobnych jest zdolność do sekrecji egzokomórkowych hydrolaz. Umożliwiają one inicjację i rozprzestrzenianie się zakażeń w głąb organizmu gospodarza. W pierwszej fazie inwazji szczególną rolę odgrywają esteraza, lipaza esterazowa i lipaza, mobilizując niezbędny do metabolizmu grzybów węgiel. Istotną korelację między aktywnością enzymatyczną fosfolipazy a powstawaniem inwazyjnych form grzybiczych wykazali Batura-Gabryel i Młynarczyk [23] w badaniach izolatów z błony śluzowej jamy ustnej. Badania te sugerują możliwość wnikania i penetra-

cji tych form przez błonę śluzową organizmu. Pinto et al. [21] oceniając aktywność fosfolipazy u 140 użytkowników protez płytowych, wykazali 100% sekrecję tych hydrolaz w grupie pacjentów, u których rozpoznano stomatopatię oraz 97,9% przypadków uwalniania tych enzymów wśród osób, u których nie stwierdzono stomatopatii protetycznej.

Ważną rolę w osłabieniu odpowiedzi układu odpornościowego zakażonego organizmu odgrywają N-acetylo- β -glukozaminidaza oraz α -glukozydaza. Wpływają one hamująco na migrację neutrofilów oraz osłabiają aktywność granulocytów obojętnochłonnych [23]. Wpływ N-acetylo- β -glukozaminidazy na powstawanie inwazyjnych form „germ tubes” wykazali w swojej pracy Mattia et al. [24]. Znalazło to potwierdzenie w przeprowadzonych przez Huang et al. [25] badaniach nad zmiennością fenotypową *Candida albicans*, w których autorzy wskazują N-acetylo- β -glukozaminidazę jako potencjalny induktor filamentacji.

W badaniach własnych największą aktywność enzymatyczną szczepów *Candida albicans* wykazano odnośnie wydzielania fosfatazy kwasnej (E 11), aryamidazy leucynowej (E 6) oraz α -glukozydazy (E 16), przy czym najwyższe wartości obserwowano w grupie pacjentów, u których rozpoznano stomatopatię w III stadium według klasyfikacji Newtona. Również w izolatach grzybów z gatunku *Candida tropicalis* te same enzymy wykazywały największą aktywność, szczególnie w grupie pacjentów, u których stwierdzono stomatopatię protetyczną III stopnia zgodnie z klasyfikacją Newtona. Najmniejszą aktywność w hodowlach obu oznaczonych gatunków grzybów drożdżopodobnych wykazały: aryamidaza walinowa (E7), β -galaktozydaza (E 14) oraz N-acetylo- β -glukozaminidaza (E 18), przy czym stosunkowo największą aktywność obserwowano w grupie pacjentów, u których rozpoznano III stopień stomatopatii według klasyfikacji Newtona. Podobne wyniki w swoich pracach przedstawili Dąbkowska [22] oraz Pinto et al. [21].

Próba biotypowania uzyskanych szczepów z gatunku *Candida albicans* na podstawie uwalniania hydrolazy, zgodnie z klasyfikacją Williamsona et al. [16] zmodyfikowaną przez Kurnatowską i Kurnatowskiego [17], umożliwiła zakwalifikowanie 8 szczepów do biotypu A, 5 do biotypu C3, 2 do B1 oraz 1 do C2. Wszystkie szczepy o biotypie A oznaczono w grupie pacjentów, u których stwierdzono stomatopatię w II i III stadium według klasyfikacji Newtona. W tych 2 grupach badanych pacjentów zaobserwowano również 4 szczepy o biotypie C3 oraz wszystkie szczepy biotypu B1.

Badane grzyby z gatunku *Candida albicans* zakwalifikowane do biotypu A, B1 uwolniły taksonomicznie istotne enzymy: aryamidazę walinową (E7),

fosfohydrolazę naftylo-AS-BI (E12), α -glukozydazę (E 16) oraz N-acetylo- β -glukozaminidazę (E 18), co znajduje potwierdzenie w badaniach innych autorów [17, 22]. Szczepy grzybów z gatunku *Candida albicans* uwalniające α -glukozydazę (E 16) oraz N-acetylo- β -glukozaminidazę (E 18) w świetle tych badań są zaliczane do najbardziej wirulentnych. Podobnie duży potencjał patogenności izolatów o tych samych biotypach wykazali Batura-Gabryel et al. [26] oraz Mnichowska et al. [27] w badaniach innych ontocenoz człowieka.

Podsumowując, należy stwierdzić, że wśród użytkowników płytowych protez ruchomych, u których rozpoznano stomatopatię protetyczną dominującym gatunkiem w uzyskanych oznaczeniach była *Candida albicans*. W stomatopatiach protetycznych powikłanych zakażeniem grzybiczym zaobserwowano uwalnianie enzymów hydrolitycznych do moczu bez cech kandydurii. Wraz ze zwiększającym się zaawansowaniem stadiów stomatopatii protetycznej zwiększała się także wirulentność izolowanych szczepów grzybiczych.

Piśmiennictwo

- [1] FOTOS P.G., JEFFREY P.L.: Clinical management of oral and perioral candidosis. *Dermatol. Clin.* 1996, 14, 273–280.
- [2] BUDTZ-JØRGENSEN E.: Oral mucosal lesions associated with the wearing of removable dentures. *J. Oral Pathol.* 1981, 10, 65–80.
- [3] BUDTZ-JØRGENSEN E.: Etiology, pathogenesis, therapy, and prophylaxis of oral yeast infections. *Acta Odontol. Scand.* 1990, 48, 61–69.
- [4] GENDREAU L., LOEWY Z.G.: Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *J. Prosthodont.* 2011, 20, 251–260.
- [5] PEREIRA-CENCI T., DEL BEL CURY A.A., CRIELAARD W., TEN CATE J.M.: Development of *Candida*-associated denture stomatitis: new insights. *J. Appl. Oral Sci.* 2008, 16, 86–94.
- [6] MIERZWIŃSKA-NASTALSKA E., RUSINIAK-KUBIK K., GONTEK R., OKOŃSKI P.: The influence of denture hygiene on the oral candidiasis. *Nowa Stomatol.* 2000, 5, 4, 52–54 [in Polish].
- [7] MIERZWIŃSKA-NASTALSKA E., RUSINIAK-KUBIK K., GONTEK R., ADAMCZYK E.: Participation of the lifetime of dental restorations in the etiology of fungal infections of the mouth. *Protet. Stomatol.* 2002, 37, 85–90 [in Polish].
- [8] WOJCIECHOWSKA E., KAMIŃSKA A.: Effect of denture and oral hygiene on the intensity of denture plaque. *Protet. Stomatol.* 2001, 36, 295–300 [in Polish].
- [9] WEBB B.C., THOMAS C.J., WILLCOX M.D., HARTY D.W., KNOX K.W.: *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 1. Factors influencing distribution of *Candida species* in the oral cavity. *Aust. Dent. J.* 1998, 43, 45–50.
- [10] WEBB B.C., THOMAS C.J., WILLCOX M.D., HARTY D.W., KNOX K.W.: *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 2. Oral diseases caused by *Candida species*. *Aust. Dent. J.* 1998, 43, 160–166.
- [11] GRIMOUD A.M., MARTY N., BOCQUET H., ANDRIEU S., LODTER J.P., CHABANON G.: Colonization of the oral cavity by *Candida species*: risk factors in long-term geriatric care. *J. Oral Sci.* 2003, 45, 51–55.
- [12] SHULMAN J.D., RIVERA-HIDALGO F., BEACH M.M.: Risk factor associated with denture stomatitis in the United States. *J. Oral Pathol. Med.* 2005, 34, 340–346.
- [13] VARDEN ABEELE A., DE MEEL H., AHARIZ M., PEERAUNDIN J.P., BEYER I., COURTOIS P.: Denture contamination by yeast in the elderly. *Gerontology*, 2008, 26, 14–21.
- [14] MIERZWIŃSKA-NASTALSKA E., RUSINIAK-KUBIK K., GONTEK R., ADAMCZYK E.: The clinical condition of the mucosa in patients with fungal infections. *Stomat. Współcz.* 2002, 7, 5, 34–38 [in Polish].
- [15] NEWTON A.: Denture sore mouth. *Br. Dent. J.* 1962, 112, 357–360.
- [16] WILLIAMSON M., SAMARANAYAKE L.P., MACFARLANE T.W.: Biotypes of *Candida albicans* using the API 20C system. *FEMS Microbiol. Lett.* 1986, 37, 27–29.
- [17] KURNATOWSKA A.J., KURNATOWSKI P.: Biotypes of fungi isolated from patients with oral cavity diseases. *Mikol. Lek.* 1998, 5, 213–217.
- [18] GÜMRÜ B., KADIR T., UYGUN-CAN B., ÖZBAYRAK S.: Distribution and phospholipase activity of *Candida species* in different denture stomatitis types. *Mycopathol.* 2006, 162, 389–394.
- [19] KURNATOWSKA A.J.: Search correlation between symptoms and signs of changes in the oral mucosa and presence of fungi. *Mycoses* 2001, 44, 379–382.
- [20] CIESIELSKA M., GAWRZEWSKA B., KNYCHALSKA-KARWAN Z., SENDUR A.: Microbiological and mycological examinations of oral cavity in cases of diseases of the oral mucosa. *Dent. Med. Probl.* 2002, 39, 63–67 [in Polish].
- [21] PINTO E., RIBEIRO I.CH., FERREIRA N.J., FORTES C.E., FONSECA P.A., FIGUEIRAL M.H.: Correlation between enzyme production, germ tube formation and susceptibility to fluconazole in *Candida species* isolated from patients with denture-related stomatitis and control individuals. *J. Oral Pathol. Med.* 2008, 37, 587–592.
- [22] DĄBKOWSKA M.: The enzymatic activity of yeast-like fungi of the *Candida strains* and its use in the early diagnosis of fungal infections. *Praca doktorska WUM, Warszawa* 2011, 67–68 [in Polish].
- [23] BATURA-GABRYEL H., MŁYNARCZYK W.: Proteolytic and lipolytic activity of *Candida strains* isolated from patients with chronic respiratory diseases. *Mikol. Lek.* 2000, 7, 139–143 [in Polish].
- [24] MATTIA E., CARRUBA G., ANGIOLELLA L., CASSONE A.: Induction of germ tube formation by N-acetyl-D-Glucosamine in *Candida albicans*: uptake of inducer and germinative response. *J. Bacteriol.* 1982, 11, 555–562.
- [25] HUANG G., YI S., SAHNI N., DANIELS K.J., SRIKANTHA T., SCOLL D.R.: N-Acetylglucosamine induces white to opaque switching, a mating prerequisite in *Candida albicans*. *PLoS Pathogens* 2010, 6, 3, 1000806.

- [26] BATURA-GABRYEL H., BRAJER B., KUŹNAR-KAMIŃSKA B.: Enzymatic biotypes of *Candida albicans* strains isolated from patients with chronic obstructive pulmonary disease (POChP). Mikol. Lek. 2003, 10, 243–248 [in Polish].
- [27] MNICHOWSKA M., SZYMANIAK L., KLIMOWICZ B., GIEDRY-KALEMBA S.: Biotypes and hydrolytic activity of *Candida albicans* strains isolated repeatedly from women with vaginal candidiasis. Mikol. Lek. 2005, 12, 285–289 [in Polish].

Adres do korespondencji:

Robert Gontek
Katedra Protetyki Stomatologicznej
Wydział Lekarsko-Dentystyczny
Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Nowogrodzka 59 paw. 11 A
02-005 Warszawa
tel.: (22) 502 18 86
faks: (22) 502 21 45
e-mail: katedraprotetyki@wum.edu.pl

Konflikt interesów: nie występuje

Praca wpłynęła do Redakcji: 2.06.2015 r.
Po recenzji: 3.07.2015 r.
Zaakceptowano do druku: 16.10.2015 r.

Received: 2.06.2015
Revised: 3.07.2015
Accepted: 16.10.2015