

PRACE ORYGINALNE

WIELOOGNISKOWE ZARAŻENIA GRZYBAMI U KOBIET: PREWALENCJA, CHARAKTERYSTYKA GATUNKÓW I NIEKTÓRYCH CECH WEWNĄTRZGATUNKOWYCH

ANETA RENATA MAMOS I ALICJA KURNATOWSKA

Katedra Biologii i Genetyki Medycznej, Zakład Biologii i Parazytologii Lekarskiej, Uniwersytet Medyczny, Pl. Gen. J. Hallera 1, 90-647 Łódź; E-mail: katbiol@poczta.onet.pl

ABSTRACT. Multifocal mycoses in women: prevalence, species characteristics, and some intraspecific features. The aim of this study was to detect fungi in three ontocenoses of 947 women (aged 20-45). The prevalence of multifocal fungal infections in women varied from $62.2 \pm 2.99\%$ to $81.0 \pm 3.92\%$ in different ontocenoses. They assumed the following mean values: $38.4 \pm 1.77\%$ for the vagina, $42.2 \pm 1.80\%$ for the oral cavity, and $25.0 \pm 1.58\%$ for the anus. The clinical manifestations of sexual organs inflammations were statistically significantly ($p < 0.01$) more frequent in women infected with fungi than in those without fungi in the vaginal ontocenosis. The highest convergence of the fungi presence with subjective and objective symptoms (assessed using the Yule Q index value) concerned: pruritus of the vulva or/and vaginal walls, burning sensation or painful urethra, as well as oedema of the external opening of the urethra, vulva or/and the vagina (Q from +0.808 to +0.970). However, there was no statistically significant convergence between occurrence of the fungi and vaginal discharge and painful hypogastrium. Based on more than 40 phenotypical features (morphological, biochemical) of the axenic strains originating from vaginal, oral, and anal ontocenoses, a total of 12 species of fungi were identified: *Candida albicans*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. utilis*, *C. humicola*, *C. viswanathii*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, and *Geotrichum candidum*. For intraspecific features, depending on the profile of the compounds used for auxanogram, 9 codes were read for *Candida albicans* and only one code for each of other species was detected. In API ZYM test based on assessment of 19 hydrolase activities the enzymograms of species included from 6 to 11 enzymes.

Key words: fungi, intraspecific features, multifocal infections.

WSTĘP

Zarażenie grzybami może dotyczyć jednego narządu ustroju człowieka, jednak w sprzyjających warunkach rozwój grzybów przebiega jednocześnie w różnych ogniskach tego samego żywiciela. Opisane po raz pierwszy w naszej Katedrze Biologii i Parazytologii Lekarskiej AM w Łodzi zarażenia wieloogniskowe związane

z nawracającymi grzybicami narządów płciowych kobiet, dotychczas nie są dokładnie poznane. Nadal poszukuje się zbieżności między przebiegiem klinicznym zarażenia a cechami fenotypowymi grzybów.

Cel pracy obejmował: analizę prevalencji grzybów w ontocenozach pochwy, jamy ustnej i odbytu oraz zarażeń wieloogniskowych wśród kobiet zgłaszających się do naszego Ośrodka Leczenia Chorób Pasożytniczych i Grzybic, w latach 1997-2002; zastosowanie doboru celowego do porównania danych klinicznych w grupach kobiet badanych przesiewowo z wykrytą inwazją grzybami pochwy (grupa A) oraz bez tego zarażenia (grupa B) i charakterystykę gatunków grzybów wyodrębnionych z treści pochwy a także analizę prevalencji zarażeń wieloogniskowych wśród kobiet z grupy A; ocenę materiałów biologicznych (treść pochwy, jamy ustnej i odbytu) pobranych od kobiet z nawracającą grzybicą według standardów diagnostyki mikologicznej opracowanej w Katedrze, z uwzględnieniem wybranych cech różnicowania wewnątrzgatunkowego.

MATERIAŁY I METODY

Ogółem zbadano 947 kobiet w wieku 20-45 lat. Pobrany od nich materiał biologiczny (z ontocenozy pochwy, jamy ustnej i odbytu) posiewano na płynne podłoże Sabourauda, następnie izolowano akseniczne szczepy, które posłużyły do mikrohodowli (dalsza ocena cech morfologicznych) oraz zbadania wybranych cech biochemicznych, za pomocą testów API 20C AUX i API ZYM (firmy bioMérieux). Analizę matematyczną przeprowadzono przy zastosowaniu wskaźnika różnicy istotnej Fishera (dla porównania frakcji); do oceny zależności między zarażeniem grzybami a poszczególnymi objawami podmiotowymi i przedmiotowymi wykorzystano współczynnik Yule'a oraz test niezależności χ^2 ; dla określenia występowania różnic między szczepami wyizolowanymi od tych samych kobiet, a różniących się cechami wewnątrzgatunkowymi (innych kodów) użyto testu znaków.

WYNIKI

Prewalencję grzybów w różnych ontocenozach opracowano na podstawie wyników badań przeprowadzonych wśród 711 kobiet, zgłaszających się z dolegliwościami ze strony narządów płciowych. Pobrano od nich 1401 próbek materiałów biologicznych, z których wyizolowano 749 szczepów. Średnia prevalencja grzybów w ontocenozach pochwy i jamy ustnej była podobna (odpowiednio: $38,4 \pm 1,77\%$, $42,2 \pm 1,80\%$), natomiast u 1/4 ($25,0 \pm 1,58\%$) tych kobiet wykryto grzyby w wymazach z odbytu. Wartości wskaźnika Fishera (t) wskazują na różnicę statystycznie istotną między odsetkami otrzymanymi dla prevalencji grzybów w narządach płciowych i jamy ustnej a częstością wykrywania tych mikroorganizmów w ontocenozie odbytu ($p < 0,05$). Łącznie inwazje wieloogniskowe rozpoznano u 1/3 zba-

danych, wśród nich najczęściej stwierdzano inwazję dwuogniskową ($20,0 \pm 1,07\%$), natomiast zarażenie grzybami tylko w jednym narządzie zdiagnozowano u $33,3 \pm 1,26\%$; nie istnieje różnica statystycznie znamienne między odsetkami inwazji wieloogniskowych a występowaniem tych mikroorganizmów w jednym tylko narządzie ustroju człowieka ($p > 0,05$).

Następnie porównano dwie grupy kobiet: grupę A stanowiło 100 osób, z rozpoznaną grzybicą narządów płciowych, zaś do grupy B zaliczono 100 pacjentek, u których takiej inwazji w ontocenozy pochwy nie stwierdzono. W obu grupach znalazły się osoby z badań przesiewowych zgłaszających się spontanicznie do oceny stanu narządów płciowych (profilaktyka raka szyjki macicy, wykrywanie czynników patogennych).

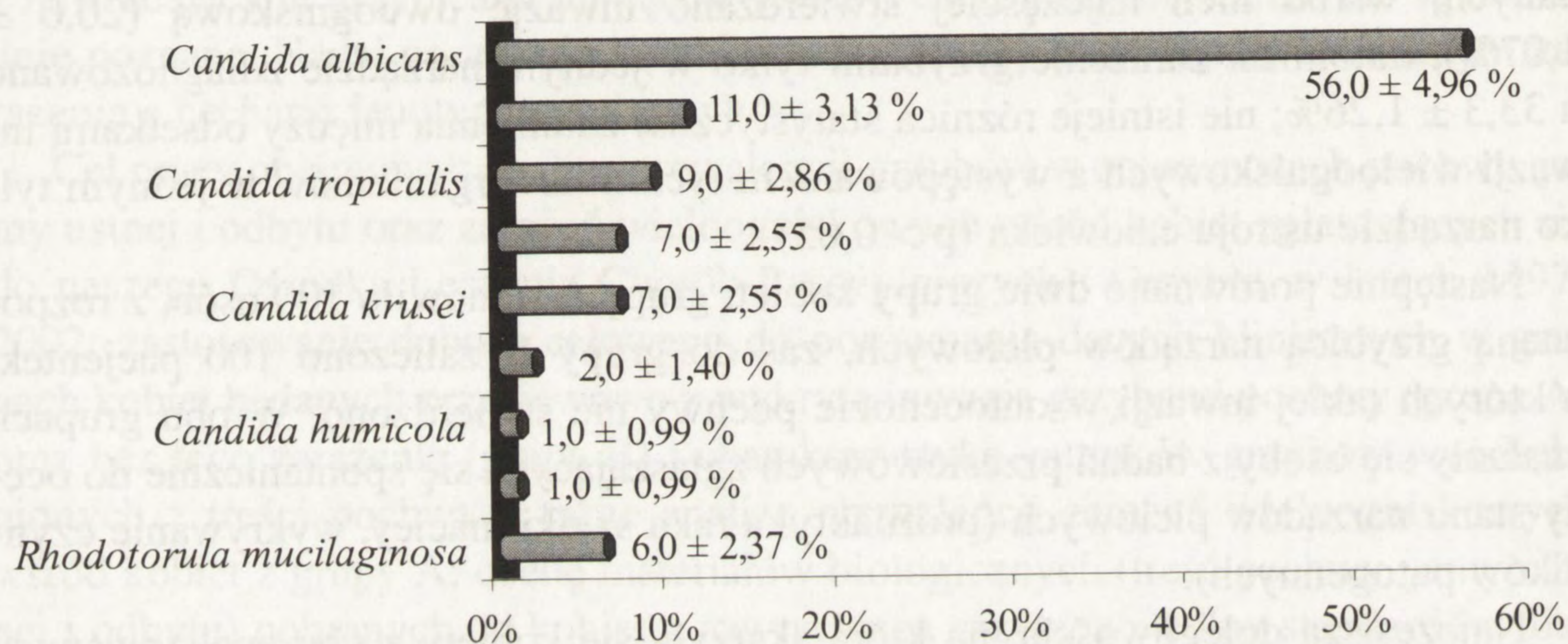
Najczęstszą dolegliwością, na którą skarżyły się kobiety z obu analizowanych grup były upławy (odpowiednio: $81,0 \pm 1,96\%$ i $84,0 \pm 3,66\%$) pozostałe objawy kliniczne (świąd, pieczenie w pochwie lub/i cewce moczowej, ból w ujściu zewnętrznym cewki moczowej, obrzęk sromu lub/i cewki moczowej oraz nadżerka sromu) występowały częściej u osób z grupy A niż z B.

Wartości współczynnika współzależności Yule'a (Q) dla objawów podmiotowych: świądu sromu lub/i w pochwie, upławów, pieczenia w pochwie, pieczenia w ujściu zewnętrznym cewki moczowej, bólów w ujściu zewnętrznym cewki moczowej, bólów w podbrzuszu i częstomoczu wahały się od $-0,328$ do $+0,970$. Natomiast dla objawów przedmiotowych: obrzęk ujścia zewnętrznego cewki moczowej, obrzęk sromu lub/i w pochwie, nadżerka sromu i nadżerka szyjki macicy – od $+0,466$ do $+0,967$. Stwierdzono bardzo silny związek między występowaniem świądu sromu lub/i w pochwie, pieczenia w cewce moczowej oraz obrzęku ujścia zewnętrznego cewki moczowej a izolowaniem grzybów z narządów płciowych zbadanych kobiet. Brak zbieżności z grzybami wykazano dla upławów i bólów w podbrzuszu. Stosując test niezależności χ^2 – dla zweryfikowania stwierdzenia o istnieniu zależności między badanymi objawami a izolowaniem grzybów z ontocenozy pochwy, przyjęto poziom istotności $\alpha = 0,05$; potwierdzono brak zbieżności pomiędzy obecnością grzybów w narządach płciowych a występowaniem tych samych objawów klinicznych.

Wśród wyodrębnionych z ontocenozy pochwy gatunków grzybów znakomitą większość stanowiły grzyby z rodzaju *Candida* ($94,0 \pm 1,6\%$); w pojedynczych przypadkach wyizolowano szczepy *Rhodotorula mucilaginosa* (Rys. 1).

Dodatkowo z 4 materiałów pobranych z okolic odbytu wyhodowano *Geotrichum candidum*. U $81,0 \pm 3,92\%$ kobiet z grupy A stwierdzono inwazje wieloogniskowe, jednak u większości były to zarażenia dwuogniskowe, a u 1/3 zbadanych osób trzyogniskowe; istnieje różnica statystycznie istotna między odsetkami inwazji wieloogniskowych a występowaniem zarażeń jednoogniskowych ($p < 0,05$).

Niezależnie od wyizolowanych gatunków grzybów od kobiet z grupy A najwyższą zbieżność ($Q = +0,970$) z objawami klinicznymi stwierdzono wobec świądu sromu lub/i w pochwie.



Rys. 1. Prewalencja gatunków grzybów wyhodowanych z ontocenozy pochwy kobiet z grupy A

Od 36 kobiet z inwazją wieloogniskową wyizolowano 100 szczepów grzybów, które posłużyły do oceny fenotypowych cech gatunkowych i niektórych właściwości wewnątrzgatunkowych.

Ostateczne oznaczenie gatunków analizowanych szczepów potwierdzono testem API 20C AUX, posługując się zasadą numerycznej identyfikacji. Z pobranych materiałów biologicznych wyizolowano 87 szczepów *Candida albicans*, 8 – *C. glabrata*, 2 – *C. guilliermondii* i po jednym szczepie *C. krusei*, *C. parapsilosis* i *C. tropicalis*.

Największą różnorodnością biochemicznych cech wewnątrzgatunkowych charakteryzowały się szczepy *C. albicans* (odczytano 9 różnych kodów); dla 69 szczepów był to kod 2576174, dla 9 – 2776174, dla 2 – 2576175, 2 – 2176174, zaś kody: 2776175, 6176174, 2562174, 2566174 i 2576374 odczytano dla pojedynczych szczepów tego gatunku. Różnica pomiędzy najczęściej izolowanymi szczepami *C. albicans*, o tym samym kodzie a pozostałymi szczepami o innych kodach, wynikała ze zdolności lub jej braku przyswajania węgla z glicerolu, L-arabinozy, 2-keto-D-glukanionu, adonitolu, α -metylo-D-glukozydu, celobiozy oraz melezytozy. Pozostałe gatunki charakteryzowały się tylko jednym kodem, innym dla każdego gatunku (Tabela 1).

Duża różnorodność kodów i gatunków cechowała szczepy wyizolowane z ontocenz narządów płciowych (dla *C. albicans* 5 kodów i 4 różne gatunki grzybów) i jamy ustnej (dla *C. albicans* 5 kodów i 3 gatunki).

Wśród 29 kobiet, u których rozpoznano zarażenie wywołane przez *C. albicans*, za pomocą testu znaków potwierdzono zgodność kodów biochemicznych u przeszło połowy tych osób, natomiast u 7 kody te różniły się między sobą.

W dalszej części pracy określono za pomocą testu API ZYM aktywność enzymów hydrolitycznych grzybów, wobec różnych substratów. Szczepy *C. albicans* cechowały się – w badanym zestawie 19 hydrolaz – aktywnością od 6 do 11 enzymów.

Najwyższą aktywność uzyskano dla arylamidazy leucynowej i fosfatazy kwaśnej (ponad połowa szczepów znalazła się w klasie 40 nanomoli i powyżej). W żadnym z tych szczepów nie wykryto obecności trypsyny, α -galaktozydazy i α -fukozydazy.

Tabela 1. Zestawienie gatunków grzybów oraz kodów odczytanych podczas ich różnicowania

| Gatunek | % \pm błąd frakcji | Kod wg Analytical Profile Index, bioMérieux, Lyon, 1990 |
|--|----------------------|---|
| <i>Candida albicans</i> (Robin, 1853) | 69,0 \pm 4,62% | 2576174 |
| Berkhout, 1923 | 9,0 \pm 2,86% | 2776174 |
| | 2,0 \pm 1,40% | 2576175 |
| | 2,0 \pm 1,40% | 2176174 |
| | 1,0 \pm 0,99% | 2776175 |
| | 1,0 \pm 0,99% | 6176174 |
| | 1,0 \pm 0,99% | 2562174 |
| | 1,0 \pm 0,99% | 2566174 |
| | 1,0 \pm 0,99% | 2576374 |
| <i>Candida glabrata</i> (Anderson, 1917) | 8,0 \pm 2,71% | 200004 |
| Meyer et Yarrow, 1978 | | |
| <i>Candida guilliermondii</i> Langeron et Guerra, 1938 | 2,0 \pm 1,40% | 6756377 |
| <i>Candida krusei</i> (Castellani, 1910) Berkhout, 1923 | 1,0 \pm 0,99% | 200010 |
| <i>Candida parapsilosis</i> (Ashford, 1928) Langeron et Talice, 1932 | 1,0 \pm 0,99% | 665217 |
| <i>Candida tropicalis</i> (Castellani, 1910) Berkhout, 1923 | 1,0 \pm 0,99% | 255657 |

Wśród szczepów *C. glabrata* wszystkie charakteryzowały się enzymogramem obejmującym 6-9 hydrolaz. Wyróżniły się: arylamidoza leucynowa, fosfataza kwaśna i fosfohydrolaza naftolowa AS-BI. Najniższą aktywność wykazano w odniesieniu do fosfatazy zasadowej, esterazy, lipazy esterazowej, arylamidazy walinowej i arylamidazy cystynowej.

Dla pozostałych wyizolowanych szczepów z rodzaju *Candida* enzymogramy obejmowały od 6 do 9 hydrolaz.

W wyniku tych badań stwierdzono, że wszystkie szczepy z rodzaju *Candida* cechowały się aktywnością 4 enzymów, a mianowicie: esterazy, lipazy esterazowej, arylamidazy leucynowej i fosfatazy kwaśnej. Natomiast w żadnym ze zbadanych szczepów nie wykryto α -galaktozydazy i α -fukozydazy.

DYSKUSJA

Kandydoza narządów płciowych występuje na całym świecie, gdyż grzyby z rodzaju *Candida* należą do kosmopolitycznych. Mimo, że jest to choroba stanowiąca ważny problem medycyny praktycznej (Poirier i wsp. 1990, Bodey 1993), naszym

zdaniem jej opisy w podręcznikach dla studentów i lekarzy są niedostateczne, zaś ostatnio w piśmiennictwie polskim brakuje oryginalnych prac na ten temat, zwłaszcza dotyczących zarażeń wieloogniskowych.

Niektórzy autorzy (Rodgers i Beardall 1999) zadają wprost pytanie: dlaczego występuje nawracająca kandydoza narządów płciowych kobiet? Na to pytanie starano się odpowiedzieć w naszym ośrodku już w drugiej połowie lat sześćdziesiątych, kiedy rozpoczęto badania nad możliwością zajmowania przez grzyby wyższych odcinków narządów płciowych drogą wstępującą lub krwiopochodną (Kurnatowska i Komorowska 1971). Problem nawracających grzybic narządów płciowych kobiet jest stale aktualny i wielu autorów (Witkin i wsp. 1989, Smith i wsp. 1993; Fong 1994, Sobel i Vazquez 1999, Giraldo i wsp. 2000) stara się znaleźć odpowiedź na to nurtujące od lat pytanie.

Stwierdzono istotnie wyższą prevalencję grzybów w ontocenozie pochwy wśród kobiet populacji łódzkiej, zgłaszających się z objawami zapalenia narządów płciowych ($38,4 \pm 1,8\%$), niż u zbadanych w czasie akcji profilaktyki raka szyjki macicy ($14,8 \pm 1,94\%$) (Magnowski 1999). Kontynuując poszukiwania zarażeń wieloogniskowych (Kurnatowska 1995, Kurnatowska i wsp. 2002) w innych niż pochwa ontocenozach – uwzględniając jednocześnie posiewy na podłoża Sabourauda z treści pochwy, jamy ustnej i odbytu – stwierdzono obecność grzybów w jamie ustnej $42,2 \pm 1,61\%$, natomiast w wymazach z odbytu grzyby izolowano u $25,0 \pm 1,61\%$ osób. Dlatego słusznie starano się uzyskać do badań porównawczych szczepki grzybów z tych narządów. Perek (1988a, b), który prowadził badania w Kotlinie Kłodzkiej wyodrębnił grzyby z narządów płciowych 13,7% badanych kobiet (przyjętych za 100% poddanych dalszym badaniom mikologicznym), dodatkowo wykryto u nich grzyby w treści jamy ustnej u $34,3 \pm 3,13\%$ oraz w wymazie odbytu u $28,3 \pm 2,37\%$; łącznie inwazje wieloogniskowe dotyczyły prawie połowy omawianych kobiet ($47,0 \pm 3,28\%$). W naszych aktualnych badaniach prevalencja grzybów w poszczególnych ontocenozach była wyższa niż w cytowanych grupach kobiet zbadanych 20 lat wcześniej. Coraz częściej też inni autorzy zwracają uwagę na występowanie tych samych gatunków grzybów w różnych narządach; i tak: Chen i wsp. (1998) wykazali obecność grzybów w gałce ocznej oraz w pochwie; Gugnani i wsp. (1989) potwierdzili występowanie tych samych grzybów jednocześnie w szyjce macicy, odbycie oraz na skórze krocza; Maleszka i Adamski (2000) opisali u ponad połowy chorych z grzybicą paznokci równoczesne zarażenie grzybami narządów płciowych.

Wobec powtarzającego się ostatnio w piśmiennictwie pytania o przyczynę grzybic nawracających pochwy, jeszcze raz – podobnie jak w kilku poprzednich naszych pracach – w omówionym opracowaniu udowodniono duże znaczenie wewnątrzstrojowej transmisji grzybów prowadzącej do wieloogniskowych zarażeń.

LITERATURA

- Bodey G.P. 1993. *Candidosis*. Pathogenesis, Dignosis and Treatment. Raven Press, New York.
- Chen S.J., Chung Y.M., Liu J.H. 1998. Endogenous *Candida* endophthalmitis after induced abortion. *American Journal of Ophthalmology* 125: 873-875.
- Fong I.W. 1994. The rectal carriage of yeast in patients with vaginal *Candidiasis*. *Clinical and Investigative Medicine* 17: 426-431.
- Giraldo P., von-Nowaskonski A., Gomes F.A., Linhares I., Neves N.A. 2000. Vaginal colonization by *Candida* in asymptomatic women with and without a history of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Obstetrics and Gynecology* 95: 413-416.
- Gugnani H.C., Nzelibe F.K., Gini P.C., Chukudebelu W.O., Njoku-Obi A.N. 1989. Incidence of yeasts in pregnant and non-pregnant women in Nigeria. *Mycoses* 32: 131-135.
- Kurnatowska A., Komorowska A. 1971. Grzyby w operowanych guzach zapalnych przydatków. *Annales Academiae Medicae Lodzensis* 13: 51-53.
- Kurnatowska A. 1995. Wybrane zagadnienia mikologii medycznej. Wyd. II, Promedi, Łódź.
- Kurnatowska A., Gołąb-Lipińska M., Mamos A.R. 2002. Aktualne dane o prevalencji grzybów w różnych ontocenozach u kobiet w okresie prokreacji. *Wiadomości Parazytologiczne* 48: 257-262.
- Magnowski J. 1999. Analiza kliniczna i mikologiczna kandydozy narządów płciowych i jamy ustnej, z uwzględnieniem właściwości biochemicznych grzybów oraz stężenia sIgA w wydzielinie kanału szyjki macicy i w treści jamy ustnej. Rozprawa doktorska, AM, Łódź.
- Maleszka R., Adamski Z. 2000. Zakażenia grzybami drożdżopodobnymi narządów moczowo-płciowych u chorych z grzybicą paznokci. *Mikologia Lekarska* 7: 153-157.
- Perek E. 1988a. Wieloogniskowe zarażenia grzybami u kobiet. Część I. Ocena stanu narządu rodnego u kobiet w wybranych zakładach przemysłowych z uwzględnieniem występowania grzybów w ontocenozie pochwy. *Ginekologia Polska, Materiały Naukowe XXIII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego, Wrocław* 59: 480-484.
- Perek E. 1988b. Wieloogniskowe zarażenia u kobiet. Część II. Poszukiwanie grzybów w ontocenozie jamy ustnej i przewodzie pokarmowym u kobiet z inwazją grzybiczą pochwy. *Ginekologia Polska, Materiały Naukowe XXIII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego, Wrocław* 59: 484-488.
- Poirier S., Auger P., Joly J., Steben M. 1990. Interest of biotyping *Candida albicans* in chronic vulvovaginitis. *Mycoses* 33: 24-28.
- Rodgers C.A., Beardall A.J. 1999. Recurrent vulvovaginal candidiasis: why does it occur? *International Journal of STD and AIDS* 10: 435-439.
- Smith J.R., Wells C., Jolly M., Shah P., Savage M., Reginald P., Kitchen V.S. 1993. Is endometrial infection with *Candida albicans* a cause of recurrent vaginal thrush? *Genitourinary Medicine* 69: 295-296.
- Sobel J.D., Vazquez J.A. 1999. Fungal infections of the urinary tract. *World Journal of Urology* 17: 410-414.
- Witkin S.S., Jeremias J., Ledger W.J. 1989. Vaginal eosinophils and IgE antibodies to *Candida albicans* in women with recurrent vaginitis. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* 27: 57-58.