

Cechy morfologiczne i biochemiczne grzybów wyodrębnionych od pacjentów z niewydolnością nerek

Morphological and biochemical features of fungi isolated from patients with renal failure

Agata Drozdowska

Praca doktorska wykonana w Zakładzie Biologii i Parazytologii Lekarskiej, Katedry Biologii i Genetyki Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi i obroniona 29 czerwca 2006.

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Piotr Kurnatowski

Recenzenci: Prof. dr hab. n. med. Anna B. Macura

Prof. dr hab. n. med. Ewa Małecka-Panas

ABSTRACT. Patients with renal failure are more frequently at risk of fungal infections than the healthy individuals. The aim of the study was: (1) Evaluation of the prevalence of fungi in biological materials obtained from different ontocenoses from patients with end-stage and chronic renal failure undergoing haemodialysis and conservative treatment, respectively. (2) Species determining of isolated fungal strains and evaluation their morphological and biochemical features with regard to biotyping. (3) Examining the connection between intraspecies features of fungal strains isolated from different ontocenoses of the same patient.

The study group comprised 136 persons, including 56 patients with end-stage renal failure dialysed for the mean period of 36.2 (\pm 1.62) months — all patients were on chronic haemodialysis therapy (4 hours sessions, 3 times per week), 50 patients with chronic renal failure undergoing conservative treatment and 30 persons with the negative history of any renal disease — control group. At the moment of the evaluation and collection of samples all patients were in good condition, none of the patients revealed symptoms suggesting possible fungal infection.

Material for mycological examinations included washings from the oral cavity and samples of urine and faeces. In order to evaluate morphological and biochemical features of fungi the following methods were applied: (1) macrocultures in solid Sabouraud medium, (2) direct microscopic slides, (3) API 20 C AUX test and (4) API ZYM test (bioMérieux).

Totally 385 samples for mycological examinations were collected from different ontocenoses, from which 161 fungal strains were isolated and classified to 17 species from 5 genera. Most strains belonged to the genus *Candida* 96.9% and the most frequently occurring species was *C. albicans* (60.3%). Other species from this genus composed 39.7%, among which in 11.8% of cases *C. parapsilosis* was determined, and the following were: *C. guilliermondii* and *C. humicola* — both species isolated in 5.59%, *C. glabrata* (4.35%), *C. rugosa* and *C. tropicalis* (both species were isolated in 2.48%). The remaining isolated fungal strains ($3.11 \pm 1.37\%$) belonged to genera *Cryptococcus*, *Geotrichum*, *Saccharomyces* and *Trichosporon*. The prevalence of fungi in collected biological materials from chronic dialysed patients, treated conservatively and persons from control group was determined at the level of 96.4%, 64.0% and 63.3%, respectively. In all examined groups fungi were found in high percentage in the ontocenoses of oral cavity and gastrointestinal tract; in dialysed patients (40.7%), treated conservatively (34.4%) and in persons with negative history of any renal disease (42.1%). It should be expressed that in 9.37% of patients with chronic renal failure undergoing conservative treatment fungi were determined at the same time in materials obtained from three ontocenoses — oral cavity, gastrointestinal tract and urinary tract. The majority of *C. albicans* strains (34.0%) was described by the use of code AUX 2 576 174; code 2 566 174 was found in 23.4% of species. Strains with code AUX 2 576 174 in 96.9% were isolated from chronic haemodialysed patients whereas code 2 566 174 characterized strains (68.2%) obtained from patients treated conservatively. Examined fungal strains from genus *Candida* obtained from all persons revealed the activity of 10 to 17 enzymes in the API ZYM test. Strains of genus *Candida albicans* obtained from patients with chronic renal failure treated conservatively and undergoing haemodialysis in majority belonged to biotype A (58.8%) and D3 (40.4%), respectively.

Key words: biotyping, chronic renal failure, fungi, haemodialysis.

Streszczenie

Populacja chorych z przewlekłą niewydolnością nerek, zwłaszcza schyłkową, wymagającą leczenia nerkozastępczego, charakteryzuje się większą podatnością na infekcje. Celem niniejszej rozprawy było: (1) określenie prewalencji grzybów w materiałach biologicznych pochodzących z różnych ontocenoz chorych z przewlekłą niewydolnością nerek, leczonych zachowawczo oraz ze schyłkową niewydolnością nerek, leczonych dializami; (2) oznaczenie gatunków wyizolowanych szczepów grzybów oraz określenie ich cech morfologicznych i biochemicznych z uwzględnieniem biotypowania; (3) zbadanie zbieżności cech wewnątrzgatunkowych szczepów grzybów wyodrębnionych z różnych ontocenoz tego samego pacjenta.

Badaniami objęto 136 osób, w tym 56 pacjentów dializowanych w Oddziale Dializ Kliniki Nefrologii, Hipertensjologii i Transplantologii Nerek Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego Nr 1 w Łodzi, 50 pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek leczonych zachowawczo w Przyszpitalnej Poradni Nefrologicznej oraz 30 osób z negatywnym wywiadem w kierunku niewydolności nerek (grupa kontrolna).

Materiał biologiczny do badań stanowiły popłuczyny jamy ustnej wykonane jałowym, płynnym podłożem Sabourauda oraz kał i mocz pobierane do jałowych pojemników. Badania wykonano w Zakładzie Biologii i Parazytologii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi zgodnie z trybem postępowania opracowanym przez Kurnatowską (1995).

Uzyskane szczepy akseńniczne oceniano pod względem morfologicznym oraz biochemicznym badając zdolność asymilacji cukrów (auksanogram węglowodanowy) — testem API 20 C AUX (bioMérieux) — co pozwoliło zidentyfikować gatunki grzybów. Oceniano również aktywność enzymów hydrolitycznych wyizolowanych szczepów grzybów — testem API ZYM (bioMérieux).

Badana grupa chorych z przewlekłą niewydolnością nerek, hemodializowana i leczona zachowawczo, wykazywała duże zróżnicowanie pod względem przyczyn wywołujących tę niewydolność. Pobranie materiału do badań mikologicznych było poprzedzone zebraniem wywiadu i badaniem przedmiotowym chorych, ze szczególnym zwróceniem uwagi na objawy mogące sugerować zarażenie grzybami. Zwracano także uwagę na występowanie czynników sprzyjających pojawianiu się infekcji grzybiczych, a uzyskane dane zamieszczano

w opracowanej Karcie Badania Pacjenta.

W momencie pobierania materiału biologicznego do badań stan wszystkich chorych określono jako zadowolający lub dobry; u żadnej osoby nie stwierdzono objawów wskazujących na zarażenie grzybami.

Do badań mikologicznych pobrano łącznie 385 próbek pochodzących z różnych ontocenoz narządowych, z których wyizolowano ogółem 161 akseńniczych szczepów grzybów należących do 17 gatunków z 5 rodzajów.

Większość szczepów zaliczono do rodzaju *Candida* ($96,9 \pm 1,37\%$), a najczęściej wykrywanym gatunkiem była *C. albicans* — 60,3%; inne gatunki tego rodzaju stanowiły 39,7%, wśród nich w 11,8% przypadków izolowana była *C. parapsilosis*, a następnie *C. guilliermondii* i *C. humicola* (oba gatunki stanowiły po 5,59%), *C. glabrata* (4,35%), *C. rugosa* i *C. tropicalis* (oba gatunki wykrywano w 2,48% przypadków izolowania grzybów tego rodzaju). Pozostałe wyizolowane szczepy grzybów (3,11%) należały do rodzajów *Cryptococcus*, *Geotrichum*, *Saccharomyces* i *Trichosporon*.

Obecność grzybów w materiałach biologicznych pobranych z różnych ontocenoz narządowych stwierdzono u 96,4% chorych dializowanych, 64,0% pacjentów z niewydolnością nerek leczonych zachowawczo oraz u 63,3% osób z negatywnym wywiadem w kierunku chorób nerek (grupa kontrolna). Wykazano, że grzyby statystycznie istotnie częściej występują u chorych z przewlekłą niewydolnością nerek poddawanych leczeniu nerkozastępczemu w porównaniu z leczonymi zachowawczo i grupą kontrolną.

Rozpatrując łącznie chorych z niewydolnością nerek, zarówno dializowanych, jak i leczonych zachowawczo, stwierdzono znamienne statystycznie wyższą prewalencję grzybów w ontocenozie jamy ustnej tej grupy, w porównaniu z osobami z negatywnym wywiadem w kierunku niewydolności tego narządu. Wykazano także istotnie częstsze występowanie grzybów w moczu chorych z przewlekłą niewydolnością nerek leczonych zachowawczo w porównaniu z grupą kontrolną.

We wszystkich badanych grupach, grzyby występowały w wysokim odsetku jednocześnie w ontocenozach jamy ustnej i przewodu pokarmowego; u dializowanych (40,7%), leczonych zachowawczo (34,4%) i w grupie kontrolnej (42,1%) badanych osób. Na uwagę zasługuje fakt, że u 9,37% chorych z niewydolnością nerek leczonych zachowawczo grzyby wyizolowano równocześnie w ma-

teriale pobranym z trzech ontocenozy — jamy ustnej, przewodu pokarmowego i dróg moczowych.

Wśród pacjentów leczonych hemodializami najczęstszym izolowanym gatunkiem była *C. albicans*, którą stwierdzono u 60,7% chorych w jamie ustnej i u 23,2% w próbkach kału. Drugim co do częstości występującym gatunkiem w jamie ustnej była *C. tropicalis* (5,36%). Natomiast w przypadku próbek kału u 10,7% chorych stwierdzono obecność *C. humicola*, a u 8,93% — *C. glabrata*.

U pacjentów z niewydolnością nerek leczonych zachowawczo również najczęściej izolowanym gatunkiem z jamy ustnej, kału i moczu była *C. albicans*, odpowiednio w 38,0%, 20,0% oraz 10,0% przypadków. Z ontocenozy jamy ustnej w dalszej kolejności wyodrębniono: *C. guilliermondii* (6,00%) i *C. parapsilosis* (4,00%). *C. guilliermondii* była również drugim najczęściej izolowanym gatunkiem w próbkach kału oraz moczu i stanowiła w obu materiałach po 4,00%. Z tą samą częstością izolowano z kału *C. parapsilosis* i *C. rugosa* oraz z moczu *C. kefyr*.

Wśród osób z negatywnym wywiadem w kierunku chorób nerek *C. albicans* była najczęściej izolowanym gatunkiem z jamy ustnej (16,7%), natomiast w próbkach kału gatunek ten był stwierdzany z taką samą, wysoką częstością jak *C. parapsilosis* (26,7%).

Poza gatunkami z rodzaju *Candida*, wykryto także u pacjentów dializowanych pojedyncze szczepy *Cryptococcus albidus*, *Geotrichum penicillatum* i *Saccharomyces cerevisiae* w ontocenozy jamy ustnej; ostatni z wymienionych gatunków występował również w kale jednego z pacjentów. Wyodrębniono także gatunek *Trichosporon cutaneum* z moczu u jednego pacjenta leczonego zachowawczo.

Stwierdzono duże zróżnicowanie wewnątrzgatunkowe szczepów z rodzaju *Candida* pod względem zdolności wykorzystywania węgla z różnych węglowodanów w teście API 20 C AUX. Za pomocą kodu AUX 2 576 174 opisano najwięcej szczepów *C. albicans* (34,0%); kod AUX 2 566 174 występował u 23,4% szczepów. Szczepy o kodzie AUX 2 576 174 w 96,9% były izolowane od pacjentów z niewydolnością nerek poddanych hemodializom, natomiast o kodzie AUX 2 566 174 — w 68,2% od pacjentów leczonych zachowawczo.

Wśród pacjentów z niewydolnością nerek poddanych hemodializom — u pięciu osób wykazano obecność jednocześnie w jamie ustnej, i w kale gatunków o tych samych kodach AUX (cztery — *C. albicans* i jedna — *C. humicola*). U pozostałych pa-

cjentów występowały równocześnie w badanym materiale z ontocenozy odmienne gatunki. W grupie chorych leczonych zachowawczo u dziewięciu pacjentów wyodrębniono gatunki o tych samych kodach — u pięciu te same gatunki izolowano z ontocenozy jamy ustnej i przewodu pokarmowego; u dwóch z ontocenozy jamy ustnej i dróg moczowych; u jednego z przewodu pokarmowego i dróg moczowych oraz u jednego chorego gatunki grzybów o tych samych kodach AUX występowały we wszystkich pobranych materiałach (popłuczyny jamy ustnej, kał i mocz). Grzyby współwystępujące w różnych ontocenozach tych pacjentów należały do różnych gatunków z rodzaju *Candida*. W grupie kontrolnej tylko dwie osoby charakteryzowało występowanie szczepów z gatunku *C. albicans* o tych samych kodach, izolowanych jednocześnie z ontocenozy jamy ustnej i przewodu pokarmowego.

Stwierdzono także duże zróżnicowanie wewnątrzgatunkowe szczepów z rodzaju *Candida* pod względem aktywności wydzielanych enzymów hydrolitycznych. Wykazano statystycznie istotne różnice aktywności hydrolaz szczepów *C. albicans* pochodzących z jamy ustnej i kału wśród chorych z przewlekłą niewydolnością nerek. Lipaza esterażowa (C8) i aryamidaza walinowa wykazywały znacząco wyższą aktywność u szczepów pochodzących z kału chorych dializowanych, natomiast α -mannozydaza u szczepów wyizolowanych z jamy ustnej. W grupie chorych leczonych zachowawczo jedynie α -mannozydaza wykazywała statystycznie znamienne wyższą aktywność u szczepów z ontocenozy jamy ustnej. Natomiast w grupie kontrolnej statystyczną istotność różnicy średniej aktywności hydrolitycznej dla szczepów *C. albicans* wykazano w przypadku enzymu α -glukozydazy, który wykazywał znacząco wyższą aktywność u szczepów pochodzących z jamy ustnej.

Statystycznie znamienne różnice aktywności hydrolaz wykazano dla szczepów *C. albicans* wyhodowanych z różnych materiałów od chorych z niewydolnością nerek w porównaniu z aktywnością u szczepów pochodzących od osób z negatywnym wywiadem w kierunku niewydolności tego narządu.

Szczepy pochodzące z jamy ustnej chorych dializowanych wykazywały statystycznie znamienne niższą aktywność enzymów: lipazy esterażowej (C8), aryamidazy leucynowej, aryamidazy walinowej, trypsyny, β -galaktozydazy, α -glukozydazy, β -glukozydazy i N-acetylo- β -glukozyloaminidazy w porównaniu z aktywnością hydrolityczną szczepów uzyskanych od grupy kontrolnej. Natomiast

szczyepy pochodzące z kału tej samej grupy pacjentów charakteryzowały się istotnie niższą aktywnością hydrolaz: arylamidazy walinowej, arylamidazy cystynowej, trypsyny, α -galaktozydazy, β -glukuronidazy, α -glukozydazy i N-acetylo- β -glukozyloaminidazy.

Szczyepy *C. albicans* wyodrębnione z ontocenozy jamy ustnej chorych leczonych zachowawczo wykazywały statystycznie znamienne wyższą aktywność hydrolityczną, w porównaniu z aktywnością szczepów uzyskanych od grupy kontrolnej, w przypadku następujących hydrolaz: fosfatazy zasadowej, esterazy(C4), lipazy(C14), N-acetylo- β -glukozyloaminidazy i α -mannozydazy oraz istotnie niższą — lipazy esterazowej(C8), arylamidazy leucynowej, arylamidazy walinowej, trypsyny, fosfatazy kwaśnej, fosfohydrolazy naftolowej-AS-BI, α -galaktozydazy, β -galaktozydazy, α -glukozydazy i β -glukozydazy. Natomiast szczepy wyhodowane z kału tej grupy chorych charakteryzowały się statystycznie znamienne wyższą aktywnością fosfatazy zasadowej, esterazy(C4), lipazy esterazowej(C8), lipazy(C14), fosfohydrolazy naftolowej-AS-BI, α -galaktozydazy, α -glukozydazy, β -glukozydazy i N-acetylo- β -glukozyloaminidazy oraz istotnie niższą niż w grupie kontrolnej — arylamidazy leucy-

nowej, arylamidazy walinowej, trypsyny, fosfatazy kwaśnej, β -galaktozydazy i β -glukuronidazy.

Najwięcej szczepów *C. albicans* wyizolowanych z materiału pobranego we wszystkich zbadanych grupach należało do biotypu A ($33,0 \pm 5,20\%$), a następnie do biotypu D3 ($25,5 \pm 4,49\%$). Biotyp A *C. albicans* statystycznie istotnie częściej występował u pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek leczonych zachowawczo niż u chorych hemodializowanych, natomiast biotyp D3 tego gatunku znamienne częściej u leczonych nerkozastępczo.

Wyniki niniejszej pracy wskazują na wysoką prevalencję grzybów w materiałach pochodzących z różnych ontocenozy narządowych chorych z przewlekłą niewydolnością nerek, zarówno leczonych nerkozastępczo, jak i zachowawczo, a także u osób z negatywnym wywiadem w kierunku tej niewydolności. Wykazano dużą różnorodność wykrywanych gatunków, jak również ich duże zróżnicowanie wewnątrzgatunkowe. Zwraca także uwagę fakt częstego, wieloogniskowego występowania grzybów, zarówno u chorych z niewydolnością nerek, jak i w grupie kontrolnej.

Wpłynęło 13 listopada 2006

Zaakceptowano 1 grudnia 2006