

© Borgis

Analiza epidemiologiczna występowania *Candida species* oraz ich lekooporności u pacjentów ze stomatopatią protetyczną**

***Andrzej Miskiewicz¹, Grzegorz Szparecki², Maciej Nowak¹, Renata Górka¹**

¹Zakład Chorób Błony Śluzowej i Przyzębia, Instytut Stomatologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny
Kierownik Zakładu: prof. dr hab. n. med. Renata Górka

²Katedra i Zakład Patologii Ogólnej i Doświadczalnej, Warszawski Uniwersytet Medyczny
Kierownik Zakładu: prof. dr hab. n. med. Barbara Górnicka

EPIDEMIOLOGICAL ANALYSIS OF *CANDIDA* SPECIES COLONIZATION AND DRUG RESISTANCE IN PATIENTS WITH PROSTHETIC STOMATOPATHY

Summary

Introduction: Currently a disquieting increase of oral candidosis in patients using removable dentures with acrylic plate has been noticed. When untreated, the condition leads to prosthetic stomatopathy which is characterized by dry and burning mouth symptoms. On clinical examination changes on mucous membrane in oral cavity are visible. They are placed under prosthesis plate and present as little plaques, erythema or granulomatosis.

Aim: The objective of the study was to confirm and establish the prevalence of oral candidosis in patients diagnosed with prosthetic stomatopathy. Furthermore it was crucial to ascertain drug-resistance of *Candida* against classically used antifungal agents.

Material and methods: A real-time PCR was performed in order to detect *Candida* spp. DNA in the group of 15 patients diagnosed with oral stomatopathy according to Newton's classification and confirmed by cytological detection of oral *Candida*. The biological material was taken from oral mucosa and acrylic plate of dentures.

Results: In all of the patients, diagnosed with a prosthetic stomatopathy, a significant amount of total *Candida* load and *Candida albicans* colonization were discovered. The *C. albicans* isolated from the patients was fully resistant to fluconazole. The resistance levels against ketoconazole and natamycine were also high (> 75%).

Conclusions: In the light of growing resistance against commonly used antifungal drugs it seems necessary to develop new method of prophylaxis and therapy, which would not induce multidrug resistance and cause dangerous adverse effects.

Key words: *Candida albicans*, drug resistance, oral candidosis

WSTĘP

Odsetek populacji europejskiej w wieku powyżej 65 lat wzrósł z obecnych 15,5 do 24,3% w ciągu najbliższych 25 lat, w związku z tym zwiększy się potrzeba leczenia protetycznego przy użyciu częściowych oraz całkowitych protez ruchomych z płytą akrylową (ang. *full denture* – FD, ang. *removable partial denture* – RPD) (1). Mimo że leczenie protetyczne ruchomymi protezami (RPD) jest w wielu przypadkach jedynym rozwiązaniem zastępowania brakujących zębów i innych struktur układu stomatognatycznego, autorzy zarówno polscy, jak

i zagraniczni zwracają uwagę na ograniczenia i efekty uboczne długotrwałego stosowania ruchomych protez całkowitych i częściowych. Stomatopatia protetyczna (pod postacią grzybiczego zapalenia jamy ustnej) występuje u 20-70% pacjentów użytkujących ruchome protezy z płytą akrylową (2). Zwiększona oczekiwana długość życia i dostępność leczenia dentystrycznego sprawia, że protezy są przystosowane do dłuższego użytkowania. Jednak z drugiej strony ruchoma proteza umieszczona w jamie ustnej zaburza stan dynamicznej równowagi pomiędzy patogenami jamy ustnej

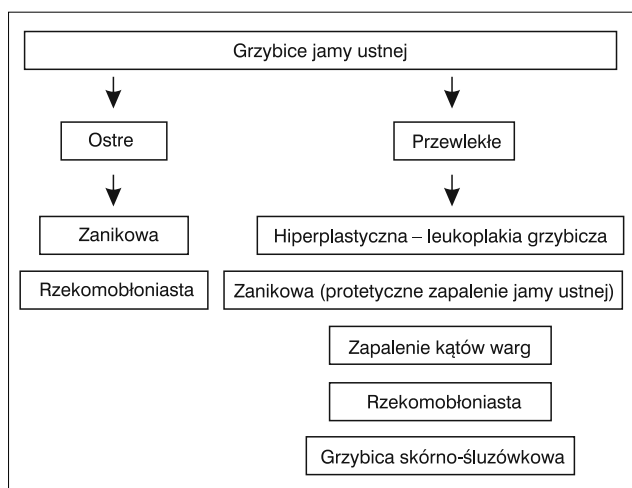
**Praca powstała we współpracy z Pierre-Fabre Medicament Polska Sp. z o.o.

a układem odpornościowym gospodarza. Promuje to transformację *Candida albicans* z saprofitycznej formy blastosporowej do formy inwazyjnej pseudostrzepkowej (3, 4). Aktualne badania wskazują, że płyta akrylowa obecna w protezach jest decydującym czynnikiem predysponującym do zwiększonej kolonizacji i rozwinięcia stomatopatii protetycznej (4, 5). Techniki izolacji eksfoliatywnej w połączeniu z mykogramem stanowią wiarygodne narzędzie dla klinicysty w diagnozowaniu oraz leczeniu pacjentów, u których podejrzewamy zakażenie *Candida albicans* w przebiegu stomatopatii (4, 6). Jednakże ciągle narastająca oporność *Candida* spp. przeciwko powszechnie używanym antybiotekom przeciw grzybom, takim jak: nystatyna, flukonazol, mikonazol, itraconazol i ketokonazol stanowi poważny problem w leczeniu miejscowym, jak i ogólnym pacjentów ze zdiagnozowaną grzybicą (7-10) (ryc. 1).

Biorąc zatem pod uwagę zwiększone ryzyko wytworzenia ultraopornych szczepów *Candida*, które nie odpowiadają na leczenie, celem badaczy powinno być opracowanie nowej metody diagnostyki i leczenia stomatopatii bez użycia azoli i alkiloamin, aby zachować je dla terapii stanów zagrażających życiu, takim jak grzybice układowe (11, 12).

MATERIAŁ I METODY

Do badania zostało włączonych 15 pacjentów Zakładu Chorób Błony Śluzowej i Przyzębia IS WUM ze zdiagnozowaną stomatopatią protetyczną w oparciu o klasyfikację wg Newtona potwierdzoną klasycznym badaniem mykologicznym wraz z mykogramem (oporność na wybrane leki przeciwgrzybicze). Pacjenci użytkowali ruchome uzupełnienia protetyczne w postaci górnych protez całkowitych oraz częściowych protez ruchomych z rozległą akrylową płytą podniebienną (proteza uzupełnia więcej niż brak 5 zębów w szczęce) (FD, RPD). W pierwszym etapie został zebrany wywiad stomatologiczny oraz ogólnomedyczny, ze szczególnym uwzględnieniem: czasu użytkowania dotychczasowej protezy, występowania suchości i pieczenia jamy ustnej z oznaczeniem



Ryc. 1. Rodzaje grzybic: podział wg Górskiej i wsp.

w 10-stopniowej skali VAS subiektywnego stopnia dyskomfortu, chorób ogólnoustrojowych, w tym cukrzycy typu I i II oraz astmy oskrzelowej (13, 14). Ponadto każdy z badanych wypełniał formularz dotyczący stanu zdrowia oraz przyjmowanych leków. Wyselekcjonowana w ten sposób grupa badawcza została włączona do badania genetycznego w oparciu o technikę real-time PCR, w kierunku ilościowego oznaczenia *Candida albicans*.

W celu przeprowadzenia badania autorzy uzyskali zgodę Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym (nr: KB/215/2013 z dnia 23 lipca 2013 r.). Ponadto warunkiem włączenia każdego z kandydatów do badania było własnoręczne podpisanie formularza świadomego zgody na udział w badaniu.

Ilościowe oznaczenie patogenów

Pobrane z błony śluzowej jamy ustnej oraz powierzchni płyty protezy próbki zostały poddane analizie ilościowej pod kątem całkowitej liczby patogenów z rodzaju *Candida* oraz gatunku *Candida albicans*. Oznaczenie wykonano przy użyciu zestawu diagnostycznego CAT oferowanego komercyjnie przez firmę MIP Pharma (Niemcy). Oznaczenie opierało się na metodzie PCR w czasie rzeczywistym przy użyciu dwóch par starterów: pary specyficznej dla *C. albicans* oraz pary wykrywającej wszystkie gatunki rodzaju *Candida*.

Analiza statystyczna

Wyniki badań zostały poddane analizie statystycznej przy użyciu programu Statistica v. 10 (StatSoft, USA). Istotność statystyczną sprawdzano przy użyciu testu U Manna-Whitneya, przyjmując za istotny statystycznie poziom istotności $p < 0,05$.

WYNIKI

Badania kliniczne

U badanych pacjentów stopień stomatopatii wg Newtona wynosił od 1 do 3 (mediana = 2). Był on wyraźnie niższy u pacjentów o krótszym czasie stosowania protezy ($p = 0,049$) oraz u pacjentów z protezą częściową w porównaniu do protezy całkowitej ($p = 0,04225$). Jednakże choroby układowe, np. cukrzyca, oraz stosowanie glikokortykosteroidów nie wykazywały istotnego statystycznie związku z klinicznym zaawansowaniem stomatopatii w naszej grupie badanej. Podobnie istotnego statystycznie związku nie wykryto w zależności od płci i wieku. W podobny sposób zmieniał się wynik w skali VAS dotyczący subiektywnie deklarowanych objawów klinicznych w skali 1 do 10. Mediana wśród naszych pacjentów wynosiła 5.

Badanie mikrobiologiczne

U wszystkich badanych pacjentów wykryto znaczącą ilość patogenów z rodzaju *Candida* (TCC) w próbkach pobranych z jamy ustnej. Liczba ich wahała się od $5,6 \times 10^2$ do $2,2 \times 10^5$ (mediana = $1,4 \times 10^4$). Zróżnicowany natomiast był odsetek wśród nich przedstawicieli gatunku *C. albicans*, który wahał się od < 1 do 57,73%

(mediana = 20,07%). W liczbach bezwzględnych całkowita liczba patogenów *C. albicans* wynosiła od $1,6 \times 10^1$ do $3,5 \times 10^4$ (mediana = $6,4 \times 10^2$). Oznacza to, że u każdego pacjenta obecna była, w mniejszym lub większym natężeniu, kolonizacja *Candida* spp., z wariacją odsetka gatunku *Candida albicans* (ryc. 2).

Badanie mykologiczne

W naszej próbie badanej u wszystkich pacjentów wyhodowano gatunek *Candida albicans*, który był oporny na flukonazol. Ponadto u 83,3% pacjentów stwierdzono oporność grzybów na ketokonazol oraz 75% na natamycynę. Wszystkie wyhodowane patogeny były wrażliwe na ekonazol, klotrimazol, mikonazol oraz nystatynę. W powyższych danych zwraca uwagę współwystępowanie oporności na najczęściej stosowane leki przeciwgrzybicze, tj. flukonazol, natamycynę oraz ketokonazol (tab. 1).

DYSKUSJA

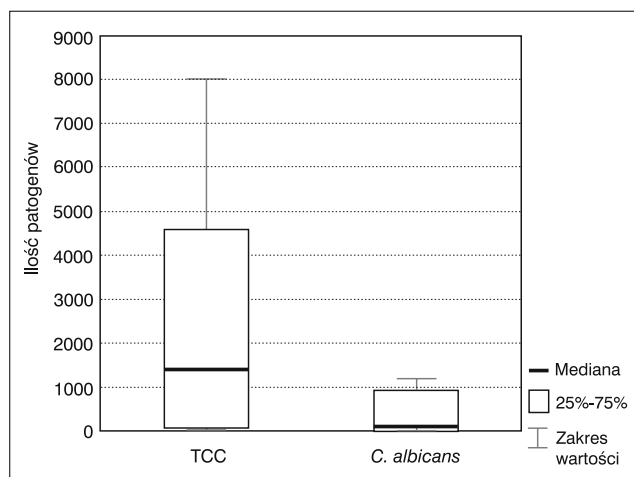
Stomatopatie protetyczne stanowią najczęstszą przyczynę dolegliwości o charakterze pieczenia i suchości w jamie ustnej u pacjentów użytkujących częściowe lub całkowite protezy ruchome. Newton i wsp. sklasyfikowali stan zapalny błony śluzowej jamy ustnej w oparciu o zmiany widoczne w badaniu klinicznym od drobnych, punktowych zaczerwień – typ I, poprzez rozlany rumień zapalny – typ II, aż do zmian ziarninujących i przerostów – typ III (14, 15). Na podstawie licznych badań z zakresu mikrobiologii oraz materiałoznawstwa uważa się, iż etiopatogeneza stomatopatii jest wieloczynnikowa. Płyta akrylowa użytkowanej protezy, poprzez ucisk powoduje powstanie mikrourazów nabłonka błony śluzowej jamy ustnej. Powtarzające się drażnienie wynikające z urazu mechanicznego sprzyja powstaniu mikronadżerek, które zostają skolonizowane przez grzyby z rodzaju *Candida* (16, 17). Najczęściej występującym przedstawicielem tego rodzaju jest gatunek *Candida albicans*, który w zrównoważonym ekosystemie jamy ustnej jest

Tabela 1. Odsetek oporności *Candida albicans* izolowanego z płyty protezy na klasyczne leki przeciwgrzybicze będące w powszechnym stosowaniu przez lekarzy dentyków. Badanie dotyczy pacjentów ze zdiagnozowaną klinicznie stomatopatią protetyczną potwierdzoną wymazem i kulturą mykologiczną.

Lek przeciwgrzybiczy	Odsetek oporności
ekonazol	0%
klotrimazol	0%
ketokonazol	83,3%
mikonazol	0%
nystatyna	0%
natamycyna	75%
flukonazol	100%

gatunkiem saprofitycznym i występuje w postaci blastosporowej. Jednak w przypadku zaburzenia stanu dynamicznej równowagi pomiędzy mikroorganizmami jamy ustnej a układem immunologicznym gospodarza dochodzi do przejścia formy blastosporowej w pseudostrzepkową – patologiczną (18). Na ten stan wpływają czynniki miejscowe, m.in. w postaci urazu wywołanego niewłaściwie wykonaną protezą, oraz czynniki ogólnoustrojowe. Zaliczamy do nich choroby systemowe, w tym metaboliczne – cukrzyca, autoimmunologiczne – Zespół Sjögrena, zakaźne – infekcja wirusem HIV (zespół AIDS), przyjmowane leki – immunosupresyjne oraz glikokortykosteroidy. Ponadto autorzy zagraniczni wskazują na istotną rolę reakcji stresowej w patogenezie kandydozy jamy ustnej (19-21).

Przeprowadzone przez nas badanie wykazało, że pacjenci użytkujący całkowite i częściowe protezy ruchome są narażeni w stopniu o wiele większym niż reszta populacji na zakażenie grzybicze o etiologii *Candida albicans*. Objawy, zarówno zgłaszane przez pacjentów w badaniu przedmiotowym i oceniane przy pomocy liczbowej skali VAS, jak i oceniane w badaniu przedmiotowym w skali Newtona są bardziej nasilone u pacjentów z dłuższym czasem użytkowania protezy (powyżej 5 lat) oraz przy stosowaniu protez całkowitych (FD) w porównaniu z częściowymi (RPD). U wszystkich tych pacjentów objawy współwystępowały ze znaczącą kolonizacją grzybami z rodzaju *Candida*, zwłaszcza *C. albicans*. Co bardziej niepokojące, w badanej populacji dominowały szczepy odporne na jedno z najczęściej stosowanych środków przeciwgrzybiczych – flukonazol, natamycynę i ketokonazol. Oporność na wszystkie trzy leki występowała łącznie, co znacznie ogranicza możliwości terapeutyczne. Jest to problem tym bardziej niepokojący, ponieważ zalecenia niemieckie i europejskie (opracowane przez AMWF – Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften) dotyczące leczenia grzybic jamy ustnej wskazują na możliwość leczenia empirycznego przy użyciu natamycyny



Ryc. 2. Analiza ilościowa kopii grzybiczego DNA przy użyciu RT-PCR. Pod uwagę wzięto całkowitą ilość przedstawicieli rządu *Candida species* – TCC oraz gatunku *Candida albicans*.

miejscowo i flukonazolu doustnie (22). Oznacza to, że rekomendowane leczenie empiryczne może być nieskuteczne u niemal wszystkich pacjentów stosujących protezy ruchome. W tym zakresie o wiele zasadniejsze wydają się wytyczne polskie, zalecające każdorazowo wykonanie wymazu z jamy ustnej z wykonaniem mykogramu. Jest to jednak procedura skomplikowana, na której wynik czeka się około tygodnia, znacznie przedłużająca proces diagnostyczno-terapeutyczny. Z drugiej strony, jej przeprowadzenie umożliwia jednoznaczne wyselekcjonowanie skutecznego leczenia, co przeciwdziała narastaniu oporności, zmniejsza ryzyko działań niepożądanych występujących przy błędnym, nieskutecznym leczeniu oraz umożliwia oszczędzanie najskuteczniejszych i najsilniejszych środków dla ciężkich grzybic inwazyjnych i układowych. W obliczu szybko narastającej oporności na leki przeciwgrzybicze jest to o tyle istotne, iż terapia empiryczna, co pokazano na przykładzie wytycznych niemieckich, nie daje zadowalających rezultatów w świetle wykazanej w naszym badaniu oporności grzybów z rodzaju *Candida*.

WNIOSKI

Wzrastający średni wiek populacji wpływa na konieczność częstszego i długotrwałego stosowania protez ruchomych, w związku z tym problemem mogą okazać się objawy stomatopatii protetycznej. Zważywszy, że większość jej objawów jest związanych z kolonizacją grzybami rodzaju *Candida*, zwłaszcza *C. albicans*, które wykazują narastającą oporność na powszechnie stosowane miejscowo i ogólnie leki przeciwgrzybicze, konieczne wydaje się poszukiwanie prostych i pozbawionych działań niepożądanych środków profilaktycznych i leczniczych znajdujących zastosowanie u wymienionej grupy pacjentów. Dobieranie leków zgodnie z mykogramem wydaje się procedurą skuteczną, jednak długotrwałą i kosztowną. Ponadto nie bez znaczenia są działania niepożądane leków z grupy azoli i alkiloamin dla pacjentów w podeszłym wieku, którzy narażeni są na niekorzystne skutki polipragmatyzacji. Leki przeciwgrzybicze wykazują dużą liczbę działań niepożądanych, w tym zaburzenia funkcji wątroby, zaburzenia żołądkowo-jelitowe, reakcje nadwrażliwości oraz zaburzenia równowagi hormonalnej. □

Piśmiennictwo

1. Kinsella KG: Future longevity-demographic concerns and consequences. *J Am Geriatr Soc* 2005 Sep; 53 (suppl. 9): S299-303. 2. Sobolewska E, Fraczak B, Czarnomys-Furowicz D et al.: Bacteria adhesion to the surface of various prosthetics materials. *Ann Acad Med Stetin*

2007; 53(2): 68-71. 3. McCarron PA, Donnelly RF, Canning PE et al.: Bioadhesive, non-drug-loaded nanoparticles as modulators of candidal adherence to buccal epithelial cells: a potentially novel prophylaxis for candidosis. *Biomaterials* 2004 May; 25(12): 2399-2407. 4. Elahi S, Clancy R, Pang G: A therapeutic vaccine for mucosal candidiasis. *Vaccine* 2001 Mar 21; 19(17-19): 2516-2521. 5. Pereira-Cenci T, Fernandes FS, Skupien JA et al.: Can new dentures decrease *Candida* levels? *Int J Prosthodont* 2013 Sep-Oct; 26(5): 470-477. 6. Pereira CA, Toledo BC, Santos CT et al.: Opportunistic microorganisms in individuals with lesions of denture stomatitis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013 Aug; 76(4): 419-424. 7. Yamashita K, Ohara M, Kojima T et al.: Prevalence of drug-resistant opportunistic microorganisms in oral cavity after treatment for oral cancer. *J Oral Sci* 2013; 55(2): 145-155. 8. Nittayananta W, Pangsoomboon K, Panichayupakaranan P et al.: Effects of lawsone methyl ether mouthwash on oral *Candida* in HIV-infected subjects and subjects with denture stomatitis. *J Oral Pathol Med* 2013 Oct; 42(9): 698-704. 9. Mulu A, Kassu A, Anagaw B et al.: Frequent detection of "azole" resistant *Candida* species among late presenting AIDS patients in northwest Ethiopia. *BMC Infect Dis* 2013; 13: 82. 10. Scott LJ: Micafungin: a review of its use in the prophylaxis and treatment of invasive *Candida* infections. *Drugs* 2012 Nov 12; 72(16): 2141-2165. 11. Taff HT, Mitchell KF, Edward JA, Andes DR: Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. *Future Microbiol* 2013 Oct; 8: 1325-1337. 12. Douglas LJ: Medical importance of biofilms in *Candida* infections. *Rev Iberoam Micol* 2002 Sep; 19(3): 139-143. 13. Petrucci M, Grassi FR, Nardi GM et al.: Sodium iodide associated to salicylic acid in the topical management of chronic oral candidiasis: a randomized trial. *J Biol Regul Homeost Agents* 2010 Jul-Sep; 24(3): 381-384. 14. Terai H, Shimahara M: Atrophic tongue associated with *Candida*. *J Oral Pathol Med* 2005 Aug; 34(7): 397-400. 15. Santarpia RP 3rd, Pollock JJ, Renner RP, Gwinnett AJ: *In vivo* antifungal efficacy of salivary histidine-rich polypeptides: preliminary findings in a denture stomatitis model system. *J Prosthet Dent* 1991 Nov; 66(5): 693-699. 16. Sanita PV, Mima EG, Pavarina AC et al.: Susceptibility profile of a Brazilian yeast stock collection of *Candida* species isolated from subjects with *Candida*-associated denture stomatitis with or without diabetes. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2013 Nov; 116(5): 562-569. 17. Atashrazm P, Sadri D: Prevalence of oral mucosal lesions in a group of Iranian dependent elderly complete denture wearers. *J Contemp Dent Pract* 2013 Mar-Apr; 14(2): 174-178. 18. Spiechowicz E et al.: Badania nad dimorfizmem *C. albicans* na powierzchniach protezy i błony śluzowej pacjentów ze stomatopatią protetyczną. *Prot Stom* 1994; 2: 65-70. 19. Maurya V, Srivastava A, Mishra J et al.: Oropharyngeal candidiasis and *Candida* colonization in HIV positive patients in northern India. *J Infect Dev Ctries* 2013 Aug; 7(8): 608-613. 20. Preciado A, Del Rio J, Suarez-Garcia MJ et al.: Differences in impact of patient and prosthetic characteristics on oral health-related quality of life among implant-retained overdenture wearers. *J Dent* 2012 Oct; 40(10): 857-865. 21. Martin R, Wachtler B, Schaller M et al.: Host-pathogen interactions and virulence-associated genes during *Candida albicans* oral infections. *Int J Med Microbiol* 2011 Jun; 301(5): 417-422. 22. Bengel W: Mundschleimhautberatung der Deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde. *Der Freie Zahnarzt* 2012; 56(10): 70-80.

nadesłano: 10.05.2013

zaakceptowano do druku: 24.06.2013

Adres do korespondencji:

*Andrzej Miskiewicz

Zakład Chorób Błony Śluzowej

i Przyzębia IS WUM

ul. Miodowa 18, 00-246 Warszawa

tel./fax: +48 (22) 502-20-36

e-mail: andrzej.miskiewicz@wum.edu.pl