

## ZWIĄZEK MIĘDZY AKTYWNOŚCIĄ HYDROLAZ GRZYBÓW WYIZOLOWANYCH Z POCHWY KOBIEŃ CIĘŻARNYCH I WYBRANYMI OBJAWAMI KLINICZNYMI

DOROTA NOWAKOWSKA<sup>1,2</sup>, ALICJA KURNATOWSKA<sup>2</sup> I JAN WILCZYŃSKI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Klinika Medycyny Matczyno-Płodowej, Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki, Rzgowska 281/289, 93-338 Łódź; <sup>2</sup>Katedra Biologii i Parazytologii Lekarskiej, Akademia Medyczna, Al. Kościuszki 85, 90-436 Łódź

**ABSTRACT.** Relationship between activity of hydrolases in fungi isolated from vagina of pregnant women and selected symptoms. Pregnancy is considered a factor of vulvovaginal mycosis. Secretion of hydrolases is an important determinant of *Candida* virulence. Thus, the aim of the study was to find the relationship between activity of 19 hydrolases in fungi isolated from vagina of pregnant women and symptoms of mycosis. 251 pregnant women were examined. Samples were collected from vagina and cultured on Sabouraud media. Activity of hydrolytic enzymes was evaluated using API ZYM (bioMerieux) test. Fungi were found in 20.1% of vaginal samples. Symptoms were detected in 45.8% of women. Only 32.1% of women with discharge and 26.4% with pruritus had mycosis. Out of the 19 examined hydrolases, 13 active enzymes were detected in fungal strains. We found for the first time the relationship between activity of fungal esterase lipase and the presence of vaginal discharge in pregnant women.

**Key words:** fungi, hydrolases activity.

### WSTĘP

Ciążę powszechnie uznaje się za stan sprzyjający rozwojowi grzybicy (Mailliot i wsp. 1978, Sobel 1989, Reed 1992). Kurnatowska (1998) badając zbieżność wybranych objawów klinicznych u kobiet z wykrytym zarażeniem pochwy grzybami, stwierdziła statystycznie istotny związek między takimi objawami jak: upławy, świąd oraz pieczenie a omawianą infekcją.

Uważa się, że chorobotwórczość grzybów związana jest z oddziaływaniem wielu czynników, m.in. zdolnością przylegania do komórek nabłonkowych, przystosowaniem się do zmienionych warunków zewnętrznych, wydzielaniem enzymów hydrolitycznych, wytwarzaniem adhezyn i toksyn oraz możliwością występowania komórki wegetatywnej w fazie pączkującej i/lub pseudostrzępki (Calderone i Fonzi 2001, Haynes 2001). Poznanie czynników wirulencji jest niezwykle ważne, bowiem zmierza do wyjaśnienia patomechanizmu procesu chorobotwórczego towarzyszącego inwazji grzybów.

W piśmiennictwie nie znaleziono opracowania dotyczącego analizy aktywności enzymatycznej w szczepach grzybów wyizolowanych od kobiet z klinicz-

nymi cechami zapalenia pochwy i w inwazjach bezobjawowych. Celem pracy stało się więc zbadanie związku między aktywnością 19 hydrolaz w szczepach wyodrębnionych z pochwy kobiet ciężarnych a wybranymi objawami grzybicy.

#### MATERIAŁ I METODY

Badania przeprowadzono wśród 251 ciężarnych, które pozostawały pod opieką Poradni Patologii Cięży Instytutu Centrum Zdrowia Matki Polki (ICZMP) w Łodzi lub były hospitalizowane w Klinice Medycyny Matczyno-Płodowej ICZMP, w latach 1998–2000.

Badaniem mikologicznym objęto 251 próbek materiałów pobranych z tylnego sklepienia pochwy badanych kobiet ciężarnych. Wyizolowano 53 szczepy grzybów; 46 z nich stało się przedmiotem dalszej szczegółowej charakterystyki ich właściwości gatunkowych i wewnątrzgatunkowych.

Do oceny mikologicznej treść pochwy pobierano na płynne podłoże Sabourauda i umieszczano w cieplarni (37°C). Po 24 i 48 h wykonywano z osadu i błonki wytworzonej na powierzchni pożywki preparaty mikroskopowe (pow. 400 lub 600 x). Po stwierdzeniu w nich elementów grzybów hodowlę przesiewano kilkakrotnie na agar Sabourauda, dla wyizolowania aksecnicznych szczepów z pojedynczych kolonii. Akseciczne szczepy grzybów wysiewano na płytki Petriego z agarem Sabourauda i pozostawiono w temperaturze pokojowej, a następnie określano cechy makroskopowe kolonii (barwa, powierzchnia, struktura, brzeg itd.). Ze wszystkich kolonii sporządzano preparaty bezpośrednie i oceniano wielkość komórek wegetatywnych, obecność strzępek i pseudostrzępek, chlamydospor, „germ tubes” lub innych wytworów grzybni. Do dalszych badań mikroskopowych z każdego wyodrębnionego szczepu grzyba zakładano mikrohodowle. Wybrane właściwości biochemiczne wszystkich wyizolowanych szczepów badano następnie za pomocą testów bioMeriux API 20 C i API 20 C AUX.

W dalszych badaniach określono dla uzyskanych szczepów grzybów aktywność 19 enzymów hydrolitycznych wykorzystując test API ZYM (bio-Meriéux).

Przygotowane w teście API ZYM szczepy grzybów posiewano na podłoża agarowe Sabourauda, hodowano 48 h w temperaturze 37°C. W jałowej wodzie destylowanej przygotowywano zawiesinę komórek grzybów o odpowiedniej gęstości (5–6) wg skali Mc Farlanda. Następnie dodawano ją pipetą pasteurowską w ilości 3–4 kropli do kapsułek testu API ZYM, które inkubowano 4h w temperaturze 37°C, po wcześniejszym dodaniu do komór po około 5 ml wody. Wyniki odczytywano zgodnie z instrukcją producenta. Aktywność enzymów określano w nanomolach hydrolizowanego substratu – wg intensywności reakcji barwnej w skali 5 stopniowej, a mianowicie: 0 – brak reakcji, 1 – 5 nmol, 2 – 10 nmol, 3 – 20 nmol, 4 – 30 nmol, 5 – 40 nmol i powyżej 40 nmol.



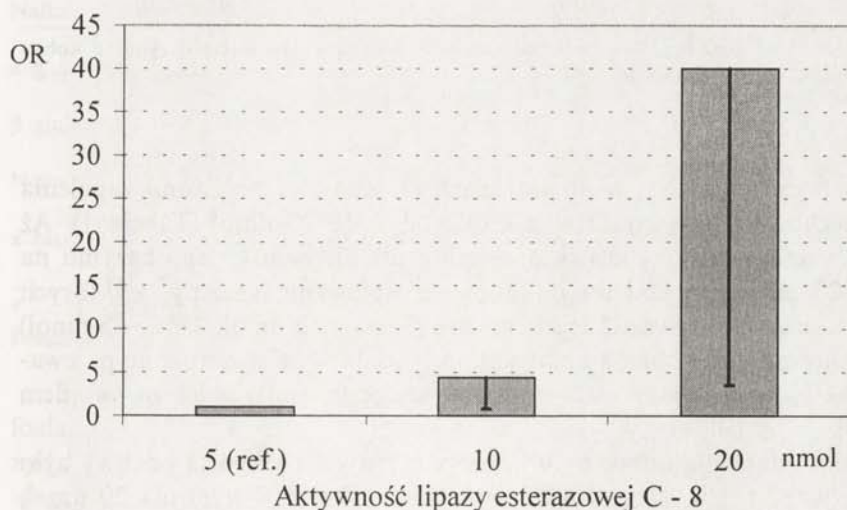
Dla każdej badanej ciężarnej przygotowano ankietę, w której pytano o występowanie upławów, świądu oraz innych dolegliwości związanych ze stanem zapalnym pochwy.

Wnioskowanie statystyczne przeprowadzono przy poziomie ufności  $\alpha = 0,05$ . Dla porównania frakcji w badanych grupach zastosowano test dokładny Fishera.

#### WYNIKI

Szczepy grzybów wyizolowano z 53 (21,1%) próbek materiałów pobranych z pochwy badanych ciężarnych. Objawy zapalenia pochwy stwierdzono u 45,8% ( $n = 115$ ) kobiet. Upławy zgłaszało 32,1% ( $n = 17$ ) kobiet z grzybicą pochwy natomiast świąd 26,4% ( $n = 14$ ) z nich.

Analizując aktywność 19 enzymów hydrolitycznych w 46 szczepach grzybów wyizolowanych z ontocenozy pochwy, stwierdzono aktywność 13 z nich. Wszystkie badane szczepy grzybów wykazywały aktywność fosfatazy zasadowej, esterazy-C4, lipazy esterazowej-C8, arylamidazy leucynowej, fosfatazy kwaśnej, naftolu-AS-BI-fosfohydrolazy. W większości szczepów grzybów ujawniono aktywność arylamidazy walinowej oraz  $\alpha$ -glukozydazy. Większość badanych szczepów nie wykazywała aktywności arylamidazy cystynowej,  $\beta$ -galaktozydazy,  $\beta$ -glukozydazy, N-acetylo- $\beta$ -glukozamidazy oraz  $\alpha$ -mannozydazy. Żaden z badanych szczepów grzybów nie wykazywał aktywności lipazy-C14, tripsyny,  $\alpha$ -chymotrypsyny,  $\alpha$ -galaktozydazy,  $\beta$ -glukuronidazy i  $\alpha$ -fukozydazy.



Rys. 1. Ryzyko wystąpienia upławów a aktywność lipazy esterazowej w szczepach grzybów wyizolowanych z pochwy kobiet ciężarnych

Tabela 1. Aktywność hydrolaz w szczepach grzybów wyizolowanych z pochwy kobiet ciężarnych z upławami

Enzym	Aktywność enzymu (nmol)*/% (n)						p
	0	5	10	20	30	40	
Fosfataza zasadowa	0 (0)	20,0 (3)	28,6 (2)	55,6 (5)	57,1 (4)	37,5 (3)	0,337
Esteraza C-4	0 (0)	28,6 (10)	50,0 (5)	100 (1)	0 (0)	0 (0)	0,066
Lipaza esterazowa C-8	0 (0)	11,1 (1)	35,5 (11)	83,3 (5)	0 (0)	0 (0)	0,023
Arylamidaza leucynowa	0 (0)	0 (0)	0 (0)	30,0 (3)	35,7 (5)	40,9 (9)	0,923
Arylamidaza walinowa	0 (0)	37,5 (15)	40,0 (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1,0
Arylamidaza cystynowa	37,5 (15)	33,3 (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1,0
Fosfataza kwaśna	0 (0)	0 (0)	40,0 (2)	0 (0)	44,4 (4)	45,8 (11)	0,218
Naftolu-AS-BI-fosfohydrolaza	0 (0)	57,4 (4)	20,0 (2)	18,2 (2)	58,3 (7)	33,3 (2)	0,178
$\alpha$ glukozydaza	40,0 (4)	34,5 (10)	50,0 (1)	33,3 (1)	50,0 (1)	0 (0)	1,0
$\beta$ glukozydaza	35,6 (16)	100 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,370
N-acetyl- $\beta$ -glukozamidaza	41,7 (10)	40,0 (6)	0 (0)	50,0 (1)	0 (0)	0 (0)	0,550
$\alpha$ mannozydaza	41,0 (16)	14,3 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,234

\* – wyraża wartość średnią; % – odsetek szczepów z daną aktywnością enzymu u kobiet z upławami, n – liczba szczepów.

Lipazę esterazową C-8, w 46 szczepach od kobiet z objawami zapalenia pochwy, cechowała aktywność w zakresie od 0 do 20 nmol (Tabela 1). Aż ponad 80% szczepów grzybów, które cechowała aktywność tego enzymu na poziomie 20 nmol, pochodziło od kobiet z upławami; szczepy, w których stwierdzono niższą aktywność tego enzymu (35% – 10 nmol; 11% – 5 nmol) rzadziej izolowano od kobiet z upławami ( $p = 0,023$ ). Nie stwierdzono przewagi danej aktywności lipazy esterazowej w szczepach od kobiet ze świądem ( $p = 0,288$ ).

Ryzyko wystąpienia upławów u kobiet ciężarnych z grzybicą pochwy było 20-krotnie wyższe, gdy aktywność lipazy esterazowej C-8 wynosiła 20 nmol, natomiast blisko 5-krotnie wyższe przy aktywności tego enzymu równej 10 nmol (Rys. 1). Niska aktywność lipazy esterazowej (5 nmol) wiązała z niskim ryzykiem występowania upławów.

Nie stwierdzono związku między aktywnością fosfatazy zasadowej, esterazy C-4, arylamidazy leucynowej, arylamidazy walinowej, fosfatazy kwaśnej, naftolu-AS-BI-fosfohydrolazy,  $\alpha$ -glukozydazy,  $\beta$ -glukozydazy, N-acetyl- $\beta$ -glukozamidazy,  $\alpha$ -mannozydazy w grzybach wyodrębnionych z pochwy a obecnością upławów w badanej grupie kobiet (Tabela 1). Podobnie, nie wykazano zależności między aktywnością wymienionych hydrolaz a występowaniem świądu (Tabela 2).

Tabela 2. Aktywność hydrolaz w szczepach grzybów wyizolowanych z pochwy kobiet ciężarnych ze świądem

Enzym	Aktywność enzymu (nmol)*/% (n)						p
	0	5	10	20	30	40	
Fosfataza zasadowa	0 (0)	20,0 (3)	50,0 (4)	18,2 (2)	25,0 (2)	37,5 (3)	0,552
Esteraza C-4	0 (0)	28,2 (11)	20,0 (2)	100 (1)	0 (0)	0 (0)	0,288
Lipaza esterazowa C-8	0 (0)	11,1 (1)	32,4 (11)	28,6 (2)	0 (0)	0 (0)	0,566
Arylamidaza leucynowa	0 (0)	0 (0)	0 (0)	18,2 (2)	20,0 (3)	37,5 (9)	0,425
Arylamidaza walinowa	0 (0)	25,6 (11)	50,0 (3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,521
Arylamidaza cystynowa	25,6 (11)	42,8 (3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,384
Fosfataza kwaśna	0 (0)	100 (2)	20,0 (1)	16,7 (1)	27,3 (3)	26,9 (7)	0,296
Naftolu-AS-BI-fosfohydrolaza	0 (0)	42,9 (3)	0 (0)	36,4 (4)	40,0 (6)	16,7 (1)	0,092
$\alpha$ glukozydaza	25,0 (3)	20,7 (6)	33,3 (1)	66,7 (2)	66,7 (2)	0 (0)	0,175
$\beta$ glukozydaza	28,6 (14)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1,0
N-acetyl- $\beta$ -glukozamidaza	26,9 (7)	25,0 (4)	0 (0)	50,0 (2)	100 (1)	100 (1)	0,185
$\alpha$ mannozydaza	30,2 (13)	14,3 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0,657

\* — wyraża wartość średnią; % — odsetek szczepów z daną aktywnością enzymu u kobiet ze świądem, n — liczba szczepów.

Szeroki zakres aktywności enzymatycznej (od 5 do 40 nmol) wykazywała fosfataza zasadowa, fosfataza kwaśna, naftolu-AS-BI-fosfohydrolaza,  $\alpha$  glukozydaza — w szczepach od kobiet z upławami i ze świądem oraz N-acetyl- $\beta$ -glukozamidaza — w grzybach wyodrębnionych od ciężarnych ze świądem. Arylamidazę cystynową,  $\beta$ -glukozydazę,  $\alpha$ -mannozydazę cechowała niska aktywność (5–10 nmol) w grzybach wyizolowanych od badanych z upławami oraz ze świądem.



## DYSKUSJA

Kandydoza pochwy u ciężarnych występuje ponad dwukrotnie częściej niż u kobiet nieciążarnych (Tobin 1995). W badanej grupie kobiet ciężarnych, grzyby wyizolowano z 21% próbek materiałów pobranych z pochwy. Choć obecność nawet niewielkiej liczby komórek grzybów wystarcza, aby ujawniły się charakterystyczne dla zarażenia grzybami objawy, takie jak: upławy, świąd i pieczenie (Kurnatowska 1961), szczepy z rodzaju *Candida* są według doniesień różnych autorów oraz badań własnych (Gilstrap i Faro 1997, Nowakowska 2001), w 30% do 40% przypadków przyczyną zarażeń bezobjawowych.

Eckert i wsp. (1998), stwierdzili wśród kobiet z rozpoznaniem zarażeniem pochwy grzybami, upławy u 47% z nich, a świąd u 50%. W naszym materiale objawy zapalenia pochwy zgłaszało 46% kobiet. Tylko u 32% kobiet z grzybicą pochwy występowały upławy, natomiast świąd u 26% pacjentek. Cotch i wsp. (1998), badając ciężarne, wykazali statystycznie częściej obecność upławów u kobiet z rozpoznaniem zarażeniem pochwy grzybami z rodzaju *Candida*, w porównaniu z zapaleniem pochwy o innej etiologii.

Do najistotniejszych czynników patogenności grzybów należą enzymy hydrolityczne, rozkładające związki wielocząsteczkowe – wielocukry, białka, lipidy i węglowodory, wydzielane do środowiska zewnętrznego (MacDonald i Odds 1980). W naszym materiale, badając aktywność 19 enzymów hydrolitycznych w 46 szczepach grzybów wyizolowanych z ontocenozy pochwy, stwierdzono aktywność 13 z nich. Uważa się, że te zewnątrzkomórkowe hydrolazy mogą brać udział w inwazji i proliferacji grzybów powodując uszkodzenie komórek żywiciela, tym samym dostarczają komórkom grzybów składników odżywczych (Odds 1979, Ghannonum i Abu-Elteen 1990).

Istotną determinantą wirulencji poszczególnych szczepów jest ich aktywność proteolityczna; im wyższa tym większa śmiertelność zwierząt doświadczalnych lub kolonizacja tkanek. Niektóre grzyby, w tym należące do rodzaju *Candida*, wytwarzają znaczne ilości enzymów lipolitycznych, głównie lipaz należących do grupy esteraz (Ogawa i Tsubi 1997). *C. albicans* posiada różnorodne enzymy związane z metabolizmem fosfolipidów. Barrett-Bee i wsp. (1985) stwierdzili korelację pomiędzy aktywnością fosfolipazy *C. albicans*, patogennością szczepów oraz przyleganiem grzybów do komórek nabłonkowych. Opisano także inne enzymy *C. albicans*, związane z metabolizmem węglowodanów tj. glukozydaza, glukoza-6-fosfataza, dehydrogenaza uczestniczące w przemianach aminocukrów, polisacharydów oraz steroli (Ogawa i Tsubi 1997). Korelacja pomiędzy aktywnością zewnątrzkomórkowych enzymów grzybów a ich chorobotwórczością nie jest jednak w pełni wyjaśniona.

Prezentowane badania dotyczyły zależności między aktywnością 19 hydrolaz w szczepach wyodrębnionych z pochwy kobiet ciężarnych a wybranymi objawami grzybic. W toku analizy nie wykryliśmy zależności między natęże-

niem aktywności enzymatycznej a występowaniem świądu. Podobnie, upławy nie były związane z określoną aktywnością większości hydrolaz. Wyjątek stanowiła lipaza esterazowa C8. Stwierdziliśmy, że ryzyko wystąpienia upławów u kobiet ciężarnych z grzybicą pochwy było 20-krotnie wyższe, gdy aktywność lipazy esterazowej C-8 wynosiła 20 nmol, natomiast blisko 5-krotnie wyższe dla aktywności tego enzymu równej 10 nmol. Niska aktywność lipazy esterazowej (5 nmol) wiązała z niskim ryzykiem występowania upławów.

Dalsze badania, wykorzystujące aktywność enzymatyczną komórek grzybów nie tylko jako cechy w biotypowaniu szczepów, ale także jako czynnika wirulencji, będą kontynuowane.

#### LITERATURA

- Barrett-Bee K., Hayes Y., Wilson R.G. 1985. A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. *Journal of Genetic Microbiology* 131: 1217–1221
- Calderone R.A., Fonzi W.A. 2001. Virulence factors in *Candida albicans*. *Trends in Microbiology* 9: 327–334.
- Coth M.F., Hillier S.L., Gibbs R.S., Eschenbach D.A. 1998. Epidemiology and outcomes associated with moderate to heavy *Candida* colonization during pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 178: 374–380.
- Eckert L.O., Hawes S.E., Stevens C.E., Koutsky L.A., Eschenbach D.A., Holmes K.K. 1998. Vulvovaginal candidiasis: clinical manifestations, risk factors, management algorithm. *Obstetrics and Gynecology* 92: 757–765.
- Ghannoum M.A., Abu-Elteen K.H. 1990. Pathogenicity determinants of *Candida*. *Mycoses* 33: 265–282.
- Gilstrap L.C., Faro S. 1997. Infections in Pregnancy. John Wiley = Sons Inc., 39–46.
- Haynes K. 2001. Virulence in *Candida* species. *Trends in Microbiology* 9: 591–596.
- Kurnatowska A. 1961. Wykrywanie i oznaczanie grzybów występujących w pochwie kobiety. *Ginekologia Polska* 32: 44–50.
- Kurnatowska A. 1998. Biologia i ekologia grzybów chorobotwórczych. Grzybnice narządów płciowych i moczowych. W: *Zarys Mikologii Lekarskiej*. (Red. E. Baran), Volumes, Wrocław.
- MacDonald F., Odds F.C. 1980. Inducible proteinase of *Candida albicans* in diagnostic serology and in the pathogenesis of systemic candidosis. *Journal of Medical Microbiology* 13: 423–435.
- Mailliot K., Rummel W., Kleissl P. 1978. *Candida* mycosis in pregnant women and related risks to the newborn. *Mycosen* 1(Suppl): 246–251.
- Nowakowska D. 2001. Charakterystyka cech gatunkowych i wewnątrzgatunkowych grzybów wyodrębnionych z inwazji wieloogniskowych kobiet ciężarnych z cukrzycą. Praca doktorska, A.M. Łódź.
- Odds F.C. 1979. *Candida* and Candidosis. Leicester University Press.
- Ogawa H., Tsuobi R. 1997. Fungal enzymes related to the pathogenesis of mycoses. In: *Fungal Disease: Biology, Immunology and Diagnosis*. (Eds. Jackobs P.H., Nail L. Marcel Dekker), New York, 191–207.
- Reed B.D. 1992. Risk factors for *Candida* vulvovaginitis. *Obstetrical and Gynecological Survey* 47: 551–560.
- Sobel J.D. 1989. Pathophysiology of vulvovaginitis candidiasis. *Journal of Reproductive Medicine* 34: 572–579.
- Tobin M.J. 1995. Vulvovaginal candidiasis: Topical vs. oral therapy. *American Family Physician* 51: 1715–1720.