

Ocena wrażliwości na wybrane leki przeciwgrzybicze szczepów grzybów wyizolowanych od kobiet ciężarnych z cukrzycą oraz zdrowych

Evaluation of susceptibility to antifungal agents of fungal strains isolated from pregnant women with diabetes and healthy pregnant women

Nowakowska Dorota^{1,2}, Gaj Zuzanna², Sobala Wojciech⁴, Wilczyński Jan^{1,3}

¹ Klinika Medycyny Matczyno-Plodowej i Ginekologii (KMMPiG), Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki (ICZMP) w Łodzi

² Zakład Zakażeń i Terapii Płodu, III Katedra Położnictwa i Ginekologii (III KPiG), Uniwersytet Medyczny (UM) w Łodzi

³ KMMPiG, III KPiG, UM w Łodzi

⁴ Instytut Medycyny Pracy w Łodzi, Zakład Epidemiologii Środowiskowej

Streszczenie

Wstęp: Obserwowany wzrost częstości zarażeń grzybami jest związany z postępowaniem diagnostyki mikologicznej oraz ze zmniejszoną wrażliwością szczepów grzybów na powszechnie używane leki przeciwgrzybicze. Cukrzyca i ciąża są rozpatrywane jako niezależne czynniki zwiększające ryzyko zarażeń grzybami.

Cel pracy: Celem pracy była ocena wrażliwości szczepów grzybów, wyizolowanych od kobiet ciężarnych z cukrzycą i zdrowych, na dziesięć leków przeciwgrzybiczych.

Materiały i metody: Badania przeprowadzono wśród 102 ciężarnych z cukrzycą oraz 106 losowo wybranych zdrowych ciężarnych. Oznaczenia wrażliwości grzybów na leki dokonano metodą dyfuzyjno-krążkową.

Wyniki: Spośród 624 próbek pobranych z pochwy, odbytu i jamy ustnej od 208 kobiet, grzyby wykryto łącznie w 190 (30,4%) próbkach, w tym u 42,1% ciężarnych z cukrzycą oraz u 41,5% zdrowych ciężarnych. Szczepy wyizolowane od ciężarnych z cukrzycą wykazywały największą wrażliwość na pimarycyne (34,4%), nystatynę (31,3%) oraz tiokonazol (31,3%), natomiast szczepy izolowane od zdrowych ciężarnych były najbardziej wrażliwe na itraconazol (59,6%) i mikonazol (53,2%). Porównanie stopnia wrażliwości szczepów na poszczególne leki w obu badanych grupach wykazało, że grzyby izolowane od zdrowych ciężarnych wykazywały większą wrażliwość na działanie klotrimazolu ($p=0,003$), itraconazolu ($p<0,001$) oraz mikonazolu ($p=0,001$).

Nie wykazano istotnych różnic we wrażliwości szczepów między badanymi grupami na działanie pimarycyny ($p=0,54$), nystatyny ($p=0,75$), amfoterycyny B ($p=0,84$), ketokonazolu ($p=0,123$) i flukonazolu ($p=0,61$).

Wnioski: Najskuteczniej działającym lekiem *in vitro* wobec szczepów wyizolowanych od kobiet ciężarnych z cukrzycą były: pimarycyna, nystatyna oraz tiokonazol, podczas gdy najwięcej szczepów wyizolowanych od zdrowych ciężarnych wykazywało wrażliwość na itraconazol i mikonazol.

Stwierdzone istotne różnice we wrażliwości szczepów izolowanych od ciężarnych z cukrzycą na działanie klotrimazolu, itraconazolu oraz mikonazolu sugerują, że cukrzyca może mieć wpływ na zwiększenie oporności grzybów na niektóre leki przeciwgrzybicze.

Słowa kluczowe: zarażenia grzybami / wrażliwość / leki przeciwgrzybicze / cukrzyca / ciąża /

Adres do korespondencji:

Dorota Nowakowska
Klinika Medycyny Matczyno-Plodowej i Ginekologii
Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki
ul. Rzgowska 281/289, 93-338 Łódź
tel. + 48 42 271 1305, fax. + 48 42 271 14 71
e-mail: dnowakowska@yahoo.com

Otrzymano: 15.02.2009

Zaakceptowano do druku: 25.03.2009

Abstract

Objectives: An increase in the frequency of fungal infections is related with progress in mycology and decreased susceptibility of fungal strains to commonly used antifungal agents. Diabetes and pregnancy are two independent factors believed to be responsible for an increased risk of mycoses.

The aim: The aim of the study was to assess the susceptibility of fungal strains isolated from pregnant women with diabetes as well as healthy pregnant women to ten antifungal agents.

Material and methods: In the study 106 diabetic pregnant women and 102 healthy pregnant women were included. Susceptibility of the fungal strains was assessed *in vitro* by disk diffusion test.

Results: Fungal strains were detected in 190 (30.4%) out of 624 samples obtained from vagina, rectum and oral cavity of 208 women. Fungi were found in 42.1% of pregnant women with diabetes and in 41.5% of healthy pregnant patients. Strains isolated from the diabetic women showed the highest susceptibility to pimaricin (34.4%), nystatin (31.3%) and tioconazole (31.3%) while those from healthy pregnant women were mostly susceptible to itraconazole (59.6%) and miconazole (53.2%). The comparison of the susceptibility of fungi to antifungal agents revealed that the strains isolated from healthy women were significantly more susceptible to clotrimazole ($p=0.003$), itraconazole ($p<0.001$) and miconazole ($p=0.001$). No difference was found in susceptibility to pimaricin ($p=0.54$), nystatin ($p=0.75$), amphotericine B ($p=0.84$), ketoconazole ($p=0.123$) and fluconazole ($p=0.61$) between those two groups of fungal strains.

Conclusions: Significant differences in susceptibility of fungi isolated from pregnant diabetic women to clotrimazole, itraconazole and miconazole suggest that diabetes has influence on resistance of fungal strains to some antifungal agents.

Key words: **fungal infections / antifungal agents / diabetes mellitus / pregnancy / susceptibility /**

Wstęp

W ostatnich latach obserwuje się stały wzrost częstości zarażeń grzybami, w tym zarówno powierzchniowych jak i uogólnionych [1]. Najczęściej wykrywanym gatunkiem jest *C. albicans*, izolowany w 80-90% zapaleń pochwy wywołanych przez grzyby [2]. Wśród pozostałych gatunków obserwuje się także *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* i *C. tropicalis*. Rzadziej wykrywa się *C. pseudotropicalis*, *C. guilliermondii* i *C. lusitanae* [3, 4].

Ryzyko zarażenia grzybami uzależnione jest od odpowiedzi immunologicznej gospodarza, wieku i sposobu odżywiania. Czynniki zwiększającymi ryzyko zarażenia są m.in. inwazyjne zabiegi diagnostyczne i terapeutyczne oraz przebyte długotrwałe terapie antybiotykami i steroidami. Wzrost częstości zarażeń grzybami wykazano także w przypadku ciąży i cukrzycy, a także pierwotnych i wtórnych niedoborów immunologicznych (tj. AIDS, procesy nowotworowe) oraz chorób o podłożu autoimmunologicznym [5].

Współcześnie używane w profilaktyce i leczeniu zarażeń grzybami leki należą głównie do grupy polienów i pochodnych azoli. Do nowych leków zalicza się antymetabolity, allylaminy i echinokandyny. Leki polienowe (m.in. amfoterycyna B, nystatyna, pimarycyna) wiążą się ze sterolami błony komórkowej grzybów, co prowadzi do zwiększenia jej przepuszczalności, zaburzenia procesów metabolicznych, a w ostateczności do śmierci komórki grzyba [6]. Pochodne azoli m.in. imidazole (klotrimazol, mikonazol, tioconazol) i triazole (flukonazol, itraconazol i ketokonazol) działają na białko hemu cytochromu P-450 zależnego od 14- α -demetylazy sterolu. Zablockowanie aktywności działania tego enzymu powoduje zmniejszenie poziomu ergosterolu w błonie komórkowej grzyba i akumulacji jego prekursorów, co prowadzi do zmian struktury i funkcji błony komórkowej. Pochodne imidazolu zaburzają także syntezę triglicerydów [7].

Leki z grupy antymetabolitów, do których należy 5-fluorocytozyna, mają zdolność do przenikania do cytoplazmy komórki grzyba, gdzie po redukcji do fluorouracylu wbudowują się do kwasu RNA i blokują syntezę białka. 5-fluorocytozyna może także ulegać przekształceniu we fluorodeoksyuridyne i zaburzać syntezę kwasu DNA co prowadzi do nieprawidłowych podziałów komórek [6]. Najnowszą grupą leków stosowanych w zarażeniach grzybami są allylaminy reprezentowane przez terbinafinę oraz echikandyny, do których zaliczamy kaspofunginę i mikafulingę. Allylaminy blokują początkowy etap syntezy ergosterolu, a echikandyny hamują syntezę glukanu [7].

Obserwowany wzrost częstości zarażeń grzybami jest związany z postępowaniem diagnostyki mikologicznej, ale także z wykazywaną przez wielu autorów zmniejszoną wrażliwością szczepów grzybów na powszechnie używane leki przeciwgrzybicze. Powoduje to zwiększenie liczby i częstości stosowanych leków, jak również konieczność powtarzania terapii. Ocena wrażliwości izolowanych szczepów na powszechnie stosowane leki przed podjęciem leczenia, może ułatwić wybór skutecznego leku i zapobiegać rozprzestrzenianiu się opornych szczepów grzybów.

Cel pracy

Celem prezentowanej pracy było przeprowadzenie w warunkach *in vitro*, oceny wrażliwości szczepów grzybów wyizolowanych od kobiet ciężarnych z cukrzycą i zdrowych na dziesięć powszechnie stosowanych leków przeciwgrzybiczych.

Materiał i metody

Grupa badana

Badania przeprowadzono wśród 208 ciężarnych kobiet hospitalizowanych w KMMPiG ICZMP w Łodzi, w tym 106 z cukrzycą oraz 102 ciężarnych wybranych losowo, u których wykluczono cukrzycę.

Badanie mikologiczne u wszystkich badanych kobiet obejmowało analizę materiałów pobranych z tylnego sklepienia pochwy oraz odbytu, a także popłuczyn jamy ustnej. Ogółem zbadano 624 próbki materiałów biologicznych, z których wyizolowano 190 aksonicznych szczepów grzybów.

Rozpoznawanie cukrzycy

U ciężarnych przeprowadzono testy przesiewowe i diagnostyczne w oparciu o zalecenia Komitetu Ekspertów Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego [8]. Wszystkim badanym podczas pierwszej wizyty zalecono oznaczenie stężenia glukozy we krwi żyłnej na czczo, a jeżeli było ono większe lub równe 5,8mmol/l (105mg/dl), wykonywano test wg zaleceń Światowej Organizacji Zdrowia (*World Health Organization*, WHO), z obciążeniem doustnym 75g glukozy.

Między 24 a 28 tygodniem ciąży, u wszystkich ciężarnych wykonano test przesiewowy obciążenia 50g glukozy podanej doustnie z oznaczeniem poziomu glukozy we krwi po upływie 60 min. Jeżeli stężenie glukozy we krwi żyłnej było wyższe od 140mg/dl (7,8mmol/l), ale niższe od 180mg/dl (10mmol/l), przeprowadzono test diagnostyczny z doustnym obciążeniem 75g glukozy. Przy nieprawidłowym wyniku testu przesiewowego, a prawidłowym wyniku testu diagnostycznego, ponownie wykonywano test w 32 tygodniu ciąży. Dla przeprowadzenia testu diagnostycznego (75g) przyjęto kryteria WHO [8].

W procesie diagnostycznym przyjęto kryteria wyrównania cukrzycy według wytycznych Europejskiej Grupy ds. Postępowania w Cukrzycy Insulinozależnej, według których minimalny poziom glukozy na czczo powinien wynosić 60-95mg/dl, poziom glukozy w 1 godzinie po posiłku – poniżej 140mg/dl, a poziom glukozy w 2 godzinie po posiłku nie powinien przekraczać 120mg/dl [9].

Badania mikologiczne

Badania mikologiczne były wykonywane w Zakładzie Diagnostyki i Leczenia Chorób Pasożytniczych i Grzybic Katedry Biologii i Genetyki Medycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Materiał do oceny mikologicznej preparatów uzyskanych od badanych kobiet był pobierany na płynne podłoże Sabourauda i inkubowany w temperaturze 20°C, 25°C oraz 37°C przez okres 24h, a następnie w temperaturze pokojowej przez kolejne 48h. Po badaniu mikroskopowym (w powiększeniu 100 i 400 x) i stwierdzeniu elementów grzybów, hodowle przesiewano kilkakrotnie na agar Sabourauda w celu wyizolowania z pojedynczych kolonii aksonicznych szczepów. Kolonie wysiewano na płytki Petriego z agarem Sabourauda, pozostawiano w temperaturze pokojowej i następnie określano ich cechy makroskopowe. Następnie sporządzano preparaty bezpośrednie i oceniano wielkość komórek wegetatywnych, obecność strzępek i pseudostrzępek, blastospor, chlamydo-spor, *germ tubes* lub innych wytworów grzybni.

Do badań mikroskopowych, z każdego wyodrębnionego szczepu zakładano mikrohodowle na szkiełkach podstawowych. W celu identyfikacji gatunku badano wybrane właściwości biochemiczne poszczególnych szczepów, za pomocą testów API 20 C i API C AUX (bioMérieux).

Ocena wrażliwości szczepów grzybów na leki

Do oceny stopnia wrażliwości szczepów grzybów użyto metody dyfuzyjno-krażkowej na podłożu YNB (*yeast nitrogen base*). W tym celu zastosowano zestaw do oznaczania wrażliwości grzybów na leki (Dom Handlowy Nauki Sp. z o.o., PAN w Krakowie).

Każdy zestaw zawierał 10 substancji o następujących stężeniach leku: nystatyna (N) 100 j, pimarycyna (P) 10µg, amfoterycyna B (A) 10µg, 5-fluorocytozyna (F) 0,5µg, klotrimazol (C) 10µg, mikonazol (M) 10µg, ketokonazol (K) 10µg, tiokonazol (T) 10µg, flukonazol (Fl) 10µg oraz itrakonazol (I) 10µg. Do oznaczeń stosowano 0,5% podłoże YNB (Difco) z dodatkiem 3% glukozy i 1,8% agaru (pH 7,0), które wylewano na szalki Petriego o średnicy 9cm. Zawiesinę wyizolowanych aksonicznych szczepów pochodzących z 24-72 godzinnej hodowli na podłożu Sabourauda przygotowano zgodnie z zaleceniem producenta rozprowadzając płasko wypełnione „oczko” ezy średnicy 2mm w 5ml płynu fizjologicznego i równomiernie rozprowadzano po powierzchni podłoża YNB usuwając zbędny nadmiar.

Następnie na powierzchni posianego podłoża nakładano krążki bibułowe nasączone odpowiednim lekiem i inkubowano w temp. 37°C. Strefy zahamowania wzrostu odczytywano po 24 godz. inkubacji, a dla szczepów wolno rosnących po 48-72 godz.

Stopień wrażliwości danego szczepu określano w oparciu o wielkość strefy zahamowania wzrostu wokół krążka z badanym lekiem mierzonej w mm. W odniesieniu do amfoterycyny B przy średnicy strefy zahamowania wzrostu ≥ 16 mm szczep grzyba określano jako wrażliwy przy średnicy 12-16mm – o zmniejszonej wrażliwości, a przy < 12 mm jako szczep oporny. Dla 5-fluorocytozyny zahamowanie wzrostu dla szczepów wrażliwych wynosiło ≥ 20 mm, dla szczepów o zmniejszonej wrażliwości 16-20mm, natomiast dla szczepów opornych < 16 mm. W przypadku pozostałych leków średnica strefy zahamowania wzrostu dla szczepu wrażliwego wynosiła ≥ 18 mm, dla szczepu o zmniejszonej wrażliwości 14-18mm, podczas gdy dla szczepu opornego < 14 mm.

Analiza statystyczna

Wnioskowanie statystyczne przeprowadzono przy poziomie istotności $p < 0,05$ przy użyciu testów dwustronnych. Wrażliwość na antybiotyki w dwu badanych grupach porównano przy użyciu testu dokładnego Fishera. Różnice częstości w oporności na antybiotyki przedstawiono jako iloraz szans. Obliczeń statystycznych dokonano przy pomocy pakietu statystycznego STATA 9.

Wyniki

Charakterystyka badanych grup

Badania przeprowadzono wśród 102 ciężarnych z cukrzycą, w tym 44 (43,1%) z cukrzycą rozpoznaną przed ciążą oraz 58 (56,9%) z cukrzycą wykrytą po raz pierwszy w ciąży. Grupę kontrolną stanowiło 106 losowo wybranych zdrowych ciężarnych.

Średnia wieku w grupie ciężarnych z cukrzycą wynosiła 31 lat (± 5), natomiast w grupie zdrowych ciężarnych 28,9 lat ($\pm 4,5$).

Tabela I. Porównanie wrażliwości na leki przeciwgrzybicze szczepów grzybów wyizolowanych od kobiet ciężarnych z cukrzycą i zdrowych.

Lek przeciwgrzybiczy	Grupa		OR	p
	Bez cukrzycy	Cukrzyca		
P oporny + ow wrażliwy	66 (70,2%) 28 (29,8%)	63 (65,6%) 33 (34,4%)	1 1,23	0,54
N oporny + ow wrażliwy	67 (71,3%) 27 (28,7%)	66 (68,8%) 30 (31,3%)	1 1,13	0,75
A oporny + ow wrażliwy	79 (84%) 15 (16%)	82 (85,45%) 14 (14,6%)	1 0,90	0,84
F oporny + ow wrażliwy	80 (85,1%) 14 (14,9%)	67 (69,8%) 29 (30,2%)	1 2,46	0,015
K oporny + ow wrażliwy	79 (84%) 15 (16%)	88 (91,7%) 8 (8,3%)	1 0,48	0,123
C oporny + ow wrażliwy	59 (62,8%) 35 (37,2%)	79 (82,3%) 17 (17,7%)	1 0,36	0,003
I oporny + ow wrażliwy	38 (40,4%) 56 (59,6%)	72 (75%) 24 (25%)	1 0,23	<0,001
T oporny + ow wrażliwy	51 (54,3%) 42 (45,7%)	66 (68,8%) 30 (31,3%)	1 0,55	0,053
M oporny + ow wrażliwy	44 (46,8%) 49 (53,2%)	68 (70,8%) 28 (29,2%)	1 0,37	0,001
FL oporny + ow wrażliwy	70 (74,5%) 24 (25,5%)	75 (78,1%) 21 (21,9%)	1 0,82	0,61

Wykaz skrótów:

ow – szczep o obniżonej wrażliwości; OR – iloraz szans (*odds ratio*); P – pimarycyna;

N – nystatyna; A – amfoterycyna B; F – 5-fluorocytozyna; K – ketokonazol; C – klotrimazol;

I – itrakonazol; T – tiokonazol; M – mikonazol; FL – flukonazol

Częstość zarażeń i rozkład gatunków grzybów w badanej grupie kobiet

Oceniając w toku badań mikologicznych 624 próbek pobranych od 208 kobiet, grzyby wykryto łącznie w 30,4% próbek. Występowanie grzybów stwierdzono u 42,1% ciężarnych z cukrzycą oraz u 41,5% zdrowych kobiet. Ogółem w materiałach pobranych z pochwy, odbytu i jamy ustnej badanych kobiet stwierdzono obecność 190 szczepów grzybów, które zakwalifikowano do 2 rodzajów i 7 gatunków. Wśród nich 97,4% należało do rodzaju *Candida*, natomiast pozostałe 2,6% do rodzaju *Geotrichum*. Wśród grzybów z rodzaju *Candida* przeważającą większość stanowiły szczepy z gatunku *C. albicans* (91,6%). Ponadto stwierdzono obecność *C. parapsilosis* (3,7%), *C. glabrata* (0,5%), *C. krusei* (0,5%), *C. kefyr* (0,5%) i *C. guilliermondii* (0,5%).

Ocena wrażliwości analizowanych szczepów na leki

W przedstawionej pracy badano wrażliwość wyizolowanych szczepów grzybów na leki polienowe (amfoterycyna B, pimarycyna, nystatyna), pochodne azoli (klotrimazol, mikonazol, ketokonazol, tiokonazol, flukonazol i itrakonazol) oraz antymetabolity (5-fluorocytozyna). (Tabela I).

Największą aktywność *in vitro* wobec szczepów wyizolowanych w grupie ciężarnych z cukrzycą wykazywała pimarycyna (34,4%), nystatyna (31,3%) oraz tiokonazol (31,3%). Wrażliwość na ketokonazol wykryto natomiast tylko u 8,3% badanych szczepów w tej grupie, a na amfoterycynę B u 16%.

W grupie zdrowych ciężarnych najwięcej szczepów wykazywało wrażliwość na itrakonazol (59,6%) i mikonazol (53,2%). (Tabela I).

Najmniejsza liczba szczepów była wrażliwa na 5-fluorocytozynę (14,9%), ketokonazol (16%) i amfoterycynę B (16%).

Ocena wrażliwości na wybrane leki przeciwgrzybicze...

Porównanie stopnia wrażliwości szczepów na poszczególne leki w obu badanych grupach wykazało, że w większości przypadków grzyby izolowane od zdrowych ciężarnych wykazywały większą wrażliwość na badane *in vitro* leki przeciwgrzybicze. Stwierdzono istnienie szeregu statystycznie istotnych różnic we wrażliwości szczepów pochodzących od zdrowych ciężarnych w stosunku do szczepów pochodzących od ciężarnych z cukrzycą, tj. na działanie klotrimazolu ($p=0,003$, $OR=0,36$), itrakonazolu ($p<0,001$, $OR=0,23$) oraz mikonazolu ($p=0,001$, $OR=0,37$). (Tabela I).

W przypadku aktywności tiokonazolu różnica we wrażliwości była bliska istotności statystycznej ($p=0,053$, $OR=0,55$). Wyjątkiem okazała się aktywność 5-fluorocytozyny. Zaobserwowano, że wrażliwość na ten lek wykazywało ponad dwukrotnie więcej szczepów wyizolowanych od ciężarnych z cukrzycą (30,2%), niż od grupy zdrowych ciężarnych (14,9%). Różnica ta była istotna statystycznie ($p=0,015$, $OR=2,46$). (Tabela I).

Analiza aktywności pozostałych leków przeciwgrzybiczych nie wykazała statystycznie istotnych różnic we wrażliwości szczepów między badanymi grupami (pimarycyna $p=0,54$, $OR=1,23$; nystatyna $p=0,75$, $OR=1,13$; amfoterycyna B $p=0,84$, $OR=0,90$; ketokonazol $p=0,123$, $OR=0,48$; flukonazol $p=0,61$, $OR=0,82$). (Tabela I).

Dyskusja

Cukrzyca i ciąża są rozpatrywane jako niezależne czynniki zwiększające ryzyko zarażeń grzybami, zwłaszcza z rodzaju *Candida* [10-12]. W oparciu o bazę PubMed, można stwierdzić, że w prezentowanej pracy po raz pierwszy dokonano oceny wrażliwości szczepów grzybów wyizolowanych od kobiet ciężarnych z cukrzycą oraz zdrowych na wybrane leki przeciwgrzybicze.

Zarażenia grzybami stwierdza się u 30%, a nawet u ponad 50% ciężarnych [13-15]. Odsetek izolacji zależy od liczby i rodzaju badanej ontocenozy [16]. W badanym materiale grzyby wykryto u 42,1% ciężarnych z cukrzycą oraz u 41,5% zdrowych kobiet. Zgodnie z wcześniejszymi doniesieniami, najczęściej stwierdzano w obu grupach *C. albicans*, odpowiednio 93,8% i 89,4% wyizolowanych szczepów [2, 17, 18].

Przyczyny podatności ciężarnych na zarażenia grzybami nie są wyjaśnione, ale prawdopodobnie związane są z fizjologicznymi zmianami, tj. obniżenie integralności komórkowej, wzrost poziomu hormonów, w szczególności estrogenów, obniżone pH i zwiększone stężenie glikogenu w pochwie. Wysoki poziom estrogenów powoduje zwiększenie powierzchniowej ekspresji kompleksów glikoproteinowych na powierzchni nabłonka pochwy, które działają jako receptory dla grzybów i ułatwiają im adhezję oraz penetrację ścian pochwy. W nabłonku pochwy zwiększa się również zawartość glikogenu, który jest źródłem substancji odżywczych dla wzrostu i namnażania *Candida* [4, 12, 19, 20].

W cukrzycy stwierdzono zakłócenie prawidłowej funkcji granulocytów, monocytów i limfocytów. Sprawia to, iż chorzy na cukrzycę są bardziej podatni na zarażenia grzybami między innymi narządów płciowych, jamy ustnej i przewodu pokarmowego [10, 21-23].

Obserwowane w pracy różnice we wrażliwości grzybów izolowanych w dwóch badanych grupach kobiet ciężarnych

sugerują, że cukrzyca może mieć wpływ na zwiększenie oporności grzybów na niektóre leki przeciwgrzybicze. W piśmiennictwie nie znaleziono podobnych danych. Badania Manfredi i wsp. przeprowadzone wśród osób z cukrzycą i zdrowych nie wykazały różnic między szczepami wyizolowanymi w tych grupach [24]. Dotyczyły one jednak kobiet nieciężarnych oraz jedynie grzyby jamy ustnej, a do badań wykorzystano odmienną metodę oceny wrażliwości grzybów na leki (Fungitest®, Bio-Rad). Autorzy stwierdzili jednakże różnice we wrażliwości na leki, szczepów pochodzących od pacjentów z cukrzycą z Włoch i Wielkiej Brytanii. Szczepy wyizolowane w grupie badanej w ośrodku w Londynie wykazywały większą oporność na flukonazol, mikonazol i ketokonazol, w porównaniu z grzybami uzyskanymi od pacjentów z ośrodka w Parmie. Autorzy sugerują, że lokalizacja geograficzna może mieć wpływ na zmniejszenie wrażliwości szczepów grzybów na dany lek, ponieważ częstsze jego stosowanie w danym regionie wpływa na rozwijanie się jego oporności [24].

Kuriyama i wsp. [25] opisali różnice we wrażliwości na badane leki, szczepów *Candida* pochodzących od pacjentów uprzednio leczonych, w porównaniu ze szczepami wyizolowanymi od osób, u których grzybicę jamy ustnej leczono po raz pierwszy. Łukaszuk i wsp. [26], przy użyciu metody dyfuzyjno-krażkowej na podłożu YNB, stwierdzili istotne różnice we wrażliwości szczepów grzybów izolowanych od pacjentów z chorobami nowotworowymi w porównaniu z grupą osób zdrowych. Szczepy *C. albicans* pochodzące od osób chorych wykazywały największą oporność na pimarycynę (51,1%) i nystatynę (40,4%) oraz w 22,5% oporność na pochodne imidazoli. Stwierdzili ponadto, że 48,9% szczepów wyizolowanych od chorych onkologicznych było opornych na jeden i więcej badanych leków, podczas gdy w grupie osób zdrowych tylko 27,1% [26].

Rozróżnia się dwa typy oporności grzybów na leki przeciwgrzybicze, tj. pierwotną i wtórną. W przypadku tej pierwszej, grzyby są odporne na leki, z którymi nie miały wcześniejszego kontaktu, np. *C. glabrata* i *C. krusei* w stosunku do flukonazolu. Oporność wtórna rozwija się u szczepów pierwotnie wrażliwych na drodze selekcji osobników naturalnie opornych lub pojawiających się w populacji mutantów. Taką oporność stwierdza się między innymi w przypadku *C. lusitanae* i *C. glabrata*, u których stwierdzono obecność zmodyfikowanych steroli o zmniejszonym powinowactwie do nystatyny [27, 28].

Oznaczanie wrażliwości szczepów grzybów na stosowane powszechnie leki przeciwgrzybicze nie jest rutynowo stosowane w diagnostyce mikologicznej [1]. Doniesienia wskazujące na wzrost częstości występowania szczepów grzybów opornych na leki przeciwgrzybicze lub nawet całe grupy leków sugerują, że tego typu oznaczenia powinny być częściej stosowane w praktyce, w celu zapobiegania rozprzestrzenianiu się i utrzymywaniu szczepów opornych [1, 29].

Część testowanych w pracy w warunkach *in vitro* leków przeciwgrzybiczych nie powinna być używana w trakcie ciąży lub może być stosowana tylko w wyjątkowych przypadkach. W każdej jednak sytuacji wykonanie testu wrażliwości wyizolowanych szczepów na działanie leków przeciwgrzybiczych przyczynia się do skuteczniejszego i szybszego zwalczania grzybiczy oraz umożliwia wybór leku najmniej obciążającego dla pacjenta.

Nowakowska D, et al.

Wnioski

1. Najskuteczniej działającym lekiem *in vitro* wobec szczepów wyizolowanych od kobiet ciężarnych z cukrzycą były: pimarycyna, nystatyna oraz tiokonazol, podczas gdy najwięcej szczepów wyizolowanych od zdrowych ciężarnych wykazywało wrażliwość na itraconazol i mikonazol.
2. Stwierdzone istotne różnice we wrażliwości szczepów wyodrębnionych od ciężarnych z cukrzycą na działanie klotrimazolu, itraconazolu oraz mikonazolu sugerują, że cukrzyca może mieć wpływ na zwiększenie oporności grzybów na niektóre leki stosowane w terapii.

Podziękowania

Autorzy składają podziękowania prof. dr hab. n. med. Alicji Kurnatowskiej za umożliwienie przeprowadzenia badań mikologicznych w Zakładzie Diagnostyki i Leczenia Chorób Pasożytniczych i Grzybic Katedry Biologii i Genetyki Medycznej UM w Łodzi oraz dr Annie Brot za udział w pobieraniu materiałów biologicznych do badań.

Badania były finansowane z grantu Komitetu Badań Naukowych nr 2 P05E 068 28.

Piśmiennictwo

1. Hospenthal D, Murray C, Rinaldi M. The role of antifungal susceptibility testing in the therapy of candidiasis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2004, 48, 153-160.
2. Nowakowska D, Kurnatowska A, Stray-Pedersen B, [et al.]. Species distribution and influence of glycemic control on fungal infections in pregnant women with diabetes. *J Infect.* 2004, 48, 339-346.
3. Bates S. Vaginal discharge. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2003, 13, 218-223.
4. Ferrer J. Vaginal candidosis: epidemiological and etiological factors. *Int J Gynaecol Obstet.* 2000, 71, Suppl 1, S21-S27.
5. Remington J, Klein J. Infectious diseases of the fetus and newborn infant. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2001, 1371-1418.
6. Sanglard D, Odds F. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis.* 2002, 2, 73-85.
7. Ciok-Pater E, Białucha A, Szabelska M, [i wsp.]. Mechanizmy oporności drożdży na stosowane leki przeciwgrzybicze. *Mikol Lek.* 2008, 15, 49-53.
8. Zalecenia Zespołu Ekspertów do Spraw Wczesnego Rozpoznawania Cukrzycy w Ciężcy. *Ginekol Pol.* 1995, 66, 137.
9. European IDDM Policy Group. Consensus Guidelines for the Management Insulin Dependent Diabetes. *Medicom Europe BV*, Bessum, 1993.
10. Nowakowska D, Wilczynski J, Kurnatowska A. Ocena wpływu stężenia glukozy we krwi na częstość występowania zarażeń grzybami pochwy, jamy ustnej i odbytu u kobiet ciężarnych z cukrzycą. *Diabetol Pol.* 2002, 9, 175-180.
11. Chong P, Abdul Hadi S, Lee Y, [et al.]. Genotyping and drug resistance profile of *Candida* spp. in recurrent and one-off vaginitis, and high association of non-albicans species with non-pregnant status. *Infect Genet Evol.* 2007, 7, 449-456.
12. Sobel J. Candidal vulvovaginitis. *Clin Obstet Gynecol.* 1993, 36, 153-165.
13. Hay P, Czeizel A. Asymptomatic *Trichomonas* and *Candida* colonization and pregnancy outcome. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2007, 21, 403-409.
14. Torgerson R, Marnach M, Bruce A, [et al.]. Oral and vulvar changes in pregnancy. *Clin Dermatol.* 2006, 24, 122-132.
15. Nowakowska D, Gaj Z, Nowakowska-Głąb A, [i wsp.]. Częstość występowania zarażeń grzybami u kobiet ciężarnych i nieciężarnych z cukrzycą i bez cukrzycy. *Ginekol Pol.* 2008, 80, 207-212.
16. Nowakowska D, Kurnatowska A, Wilczyński J. Multifocal fungal infections in pregnant women. *Wiad Parazytol.* 2001, 47, Suppl 1, 119-124.
17. Nowakowska D, Kurnatowska A, Stray-Pedersen B, [et al.]. Prevalence of fungi in the vagina, rectum and oral cavity in pregnant diabetic women: relation to gestational age and symptoms. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2004, 83, 251-256.
18. Trama J, Adelson M, Raffaelli I, [et al.]. Detection of *Candida* species in vaginal samples in a clinical laboratory setting. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2005, 13, 63-67.
19. Cotch M, Hillier S, Gibbs R, [et al.]. Vaginal Infections and Prematurity Study Group. Epidemiology and outcomes associated with moderate to heavy *Candida* colonization during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1998, 178, 374-380.
20. Hollmer C, Essmann M, Ault K, [et al.]. Adherence and blocking of *Candida albicans* to cultured vaginal epithelial cells: treatments to decrease adherence. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2006, 2006, 98218.
21. Hrynczewicz-Gwóźdź A, Plomer-Niezgoda E, Baran E. Trudności lecznicze grzybicy u chorych na cukrzycę. *Mikol Lek.* 2006, 13, 315-317.
22. Goswami R, Dadhwal V, Tejaswi S, [et al.]. Species-specific prevalence of vaginal candidiasis among patients with diabetes mellitus and its relation to their glycaemic status. *J Infect.* 2000, 41, 162-166.
23. Malazy O, Shariat M, Heshmat R, [et al.]. Vulvovaginal candidiasis and its related factors in diabetic women. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2007, 46, 399-404.
24. Manfredi M, McCullough M, Polonelli L, [et al.]. In vitro antifungal susceptibility to six antifungal agents of 229 *Candida* isolates from patients with diabetes mellitus. *Oral Microbiol Immunol.* 2006, 21, 177-182.
25. Kuriyama T, Williams D, Bagg J, [et al.]. In vitro susceptibility of oral *Candida* to seven antifungal agents. *Oral Microbiol Immunol.* 2005, 20, 349-353.
26. Łukaszuk C, Krajewska-Kutak E, Niczyporuk W, [i wsp.]. Wrażliwość na chemioterapeutyki przeciwgrzybicze szczepów grzybów drożdżopodobnych izolowanych od pacjentów z chorobą nowotworową. *Onkol Pol.* 1999, 4, 1-4.
27. Fryberg M, Oehlschlager A, Unrau A. Sterol biosynthesis in antibiotic-resistant yeast: nystatin. *Arch Biochem Biophys.* 1974, 160, 83-89.
28. Sojakova M, Liptajova D, Borovsky M, [et al.]. Fluconazole and itraconazole susceptibility of vaginal yeast isolates from Slovakia. *Mycopathologia.* 2004, 157, 163-169.
29. Wirsching S, Michel S, Köhler G, [et al.]. Activation of the multiple drug resistance gene MDR1 in fluconazole-resistant, clinical *Candida albicans* strains is caused by mutations in a trans-regulatory factor. *J Bacteriol.* 2000, 182, 400-404.