

*Sylwia Jarzynka^{1,2}, Ewa Swoboda-Kopec², Maria Dąbkowska³, Ewa Augustynowicz-Kopec¹

Fenotypowa i genotypowa charakterystyka szczepów *Candida* spp. izolowanych od pacjentów z podejrzeniem fungemii odcewnikowych

Phenotypic and genotypic characteristic of *Candida* spp. strains isolated from patients with suspected catheter-related bloodstream fungal infections

¹Zakład Mikrobiologii, Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc, Warszawa
Kierownik Zakładu: prof. dr hab. n. med. Ewa Augustynowicz-Kopec

²Zakład Mikrobiologii, Centralny Szpital Kliniczny, Warszawa
P.o. Kierownika Zakładu: dr hab. n. med. Marta Wróblewska

³Katedra i Zakład Mikrobiologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny
Kierownik Zakładu: prof. nadzw. dr hab. med. Grażyna Młynarczyk

Słowa kluczowe

fungemia odcewnikowa, biofilm, proteaza aspartylowa, EFG1 czynnik filamentacji

Key words

catheter-related bloodstream fungal infections (CR-BSI), biofilm, aspartyl protease, elongation factor G

Streszczenie

Wstęp. W ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat odnotowuje się znaczny wzrost zakażeń grzybiczych u ludzi. Układowe zakażenia szczepami *Candida* spp. mogą przebiegać z rozsiewem hematogennym grzybów (fungemią).

Cel pracy. Celem pracy była charakterystyka fenotypowa i genotypowa 90 szczepów *Candida* spp. izolowanych z materiałów klinicznych pobieranych od chorych z podejrzeniem fungemii odcewnikowych.

Materiał i metody. Charakterystyka fenotypowa *Candida* spp. obejmowała ocenę aktywności enzymatycznej szczepów oraz ocenę ich zdolności do tworzenia struktury biofilmu. Charakterystyka genotypowa szczepów *Candida* spp. opierała się na wykrywaniu genów kodujących proteazy *Sap* i *Yps*.

Wyniki. Z materiałów klinicznych wyhodowano szczepy *Candida* należące do gatunków: *C. albicans* – 32,2%, *C. parapsilosis* – 30%, *C. glabrata* – 24,5%, *C. krusei* – 7,8%, *C. tropicalis* – 3,3% oraz *C. guilliermondii* – 2,2%. Szczepy *C. albicans* wykazywały odwrotną zależność między aktywnością proteaz a wzrostem w postaci biofilmu. Szczepy *C. parapsilosis* wykazywały wyższą zdolność tworzenia biofilmu w porównaniu do izolatów *C. albicans*.

Wnioski. Efg1 oraz N-acetylo- β -glukozaminidaza (NAG) mogą stanowić istotne czynniki zjadliwości szczepów *C. albicans* w aspekcie zdolności tworzenia biofilmu. W badaniach obserwowano zmniejszoną rolę proteaz aspartylowych (*Sap*) w wirulencji szczepów *C. albicans*.

Summary

Introduction. In the XXc. the high level of fungal infections is observed. Systemic fungal infections were associated with bloodstream candidiosis. Catheter-related bloodstream fungal infection is a haematogenous spread of fungi associated with vascular catheter colonization.

Aim. Aim of this work was to analyze the phenotypic and genotypic features of fungi isolated from clinical samples from patients with suspected catheter-related bloodstream fungal infection.

Material and methods. These studies are based on phenotypic methods, such as enzymatic activity and the ability to biofilm production. The genotypic evaluation were used to search for genes encoding virulence factors of fungi like *Sap* and *Yps*.

Results. The major etiological factors of catheter-related bloodstream fungal infections were species: *C. albicans* – 32.2%, *C. parapsilosis* – 30% and *C. glabrata* – 24.5%. An inverse relationship between the activity of proteases and growth of strains in the biofilm structure in the *C. albicans* strains were shown. Maximum capacity to grow the biofilm was characteristic for *C. parapsilosis* strains – 48%.

Conclusions. The presence of the EFG1 gene and NAG enzyme suggests ability to produce invasive hyphal forms, especially in aspect of biofilm formation. We observed lower role of *Sap* in *C. albicans* virulence.

Adres/address:

*Sylwia Jarzynka
Zakład Mikrobiologii I GiCHP
ul. Płocka 26, 01-138 Warszawa
tel. +48 (22) 431-21-42
jarzynka.syl@gmail.com

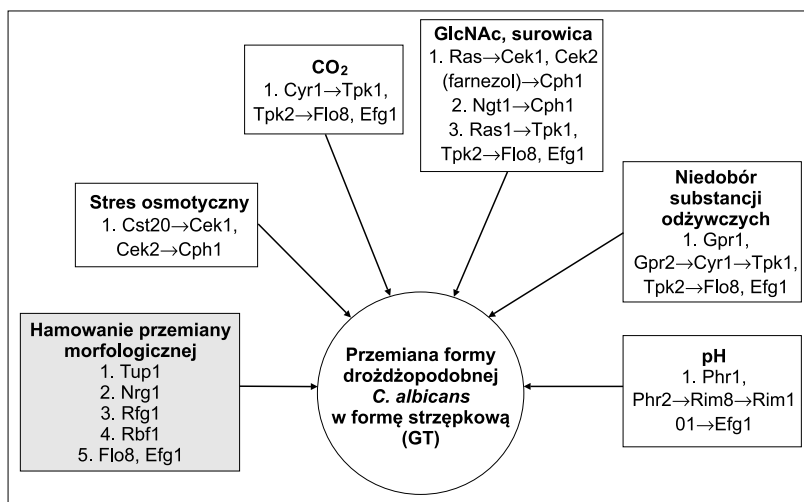
WSTĘP

W ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat odnotowuje się znaczny wzrost zakażeń grzybiczych u ludzi. Dotyczy to zwłaszcza środowiska szpitalnego w grupie osób z obniżoną odpornością. Większość zakażeń grzybiczych stanowią kandydozy. Układowe zakażenia szczepami *Candida* spp. mogą przebiegać z rozsiewem hematogennym grzybów (fungemią). Od 40 do 60% wszystkich fungemii stanowią zakażenia odcewnikowe związane z kolonizacją cewników naczyniowych (obwodowych i centralnych) przez szczepy *Candida* spp. *C. albicans* to gatunek dominujący (44,8%) wśród grzybiczych czynników etiologicznych fungemii odcewnikowych (1). Kolejne gatunki grzybów izolowane z zakażeń to *C. glabrata* (28,1%) oraz *C. parapsilosis* (10,4%) (1). Diagnostyka laboratoryjna gatunków innych niż *Candida albicans* jest długotrwała, ze względu na ich zróżnicowanie morfologiczne, specyficzne cechy biochemiczne oraz zmniejszoną wrażliwość na lek pierwszego rzutu – fulkonazol, a także echinokandyny (2).

Na chorobotwórczość grzybów mają wpływ: cechy fenotypowe i genotypowe, stopień zjadliwości, wrażliwość na chemioterapeutyki oraz przebieg zakażenia. Do czynników wirulencji grzybów należy zaliczyć: dimorfizm, *phenotypic switching*, zdolności adhezyjne, tworzenie biofilmu, *signaling* i *quorum sensing* oraz aktywność enzymatyczną. Grzyby wykazują zdolność wzrostu w różnych formach morfologicznych. Szczepy *Candida* spp. rosną w formie pojedynczych komórek – blastospor i/lub tworząc pseudostrzępki posiadające zdolność penetrowania w głąb tkanek gospodarza (3). Przemiana morfologiczna grzybów jest poprzedzona wieloma zmianami biochemicznymi, fizjologicznymi i strukturalnymi zachodzącymi w komórce grzyba. Związana jest z reorganizacją cytoszkieletu, poprzez zwiększenie zawartości chityny w strzępkach oraz z ekspresją specyficznych białek strukturalnych, enzymatycznych i regulatorowych. Do białek regulatorowych należą m.in.: Cph1, Cst20, Hst7, Cek1, Efg1, Rim101, Prr2, Ras, Tpk2, Tup1p, Rbf1, Nrg1, Rfg1,

Flo8, Czf1 i Tec1 (3, 4). Zdolność dimorfizmu jest regulowana nie tylko przez temperaturę, ale także przez wiele innych czynników, takich jak stres osmotyczny, dostępność substancji odżywczych i CO₂ czy pH środowiska (ryc. 1).

Na stopień zjadliwości grzybów drożdżopodobnych ma wpływ także różnorodność fenotypowa (*Phenotypic switching*), czyli zdolność występowania różnych form morfologicznych w obrębie tego samego gatunku. Zmiana fenotypu kolonii wiąże się z odmiennymi właściwościami biochemicznymi, metabolicznymi, chorobotwórczymi. Szczepy *Candida* spp. przechodzące przemianę morfologiczną są znacznie częściej przyczyną kandydoz przebiegających z zakażeniem krwi i/lub infekcją odcewnikową (4). Kolejnym czynnikiem wirulencji szczepów *Candida* spp. jest zdolność adhezji. Adhezyny pozwalają na adaptację komórek grzybów do różnych środowisk, m.in. do powierzchni komórek nabłonkowych, błony komórkowej, wewnątrzkomórkowych białek macierzy matrix, białek surowicy – albumin, fibrynogenu, transferyny, białek dopełniacza (5). Główne adhezyny grzybów stanowią białka ściany komórkowej: Als1-Als9 (ang. *agglutinin-like sequence proteins*), Hwp1 (ang. *hyphae wall protein*) – mannoпротеina specyficzna dla formy strzępkowej *C. albicans*, białko Eap1p oraz Epa1p (ang. *epithelial adhesion protein*) – lecytyno-zależna adhezyna charakterystyczna dla komórek *C. glabrata* (4, 6). Wśród adhezyn grzybiczych są także białka niezwiązane ze ścianą komórkową *Candida*: Int1 (ang. *integrin-like protein*) – białko powierzchniowe blastospor i strzępek wiążące białka macierzy zewnątrzkomórkowej oraz białka błonowe Mnt1 i Pmt1. Najnowsze badania opisują nowy czynnik – kinazę Tor1, która może mieć bardzo szeroki wpływ regulacyjny na adhezyny. Kinaza ta znajduje się w szlaku regulującym zapotrzebowanie grzybów na składniki odżywcze. Ponadto białko to odgrywa dużą rolę w regulacji ekspresji genów specyficznych dla blastospor i formy micelialnej, włączając geny adhezyn – *ALS1-3*, *HWP1*, oraz inhibitorów filamentacji białek – *Nrg1* i *Tup1* (6). Dowiedziono, że białko Tor1



Ryc. 1. Czynniki regulujące przemianę morfologiczną *C. albicans* [wg (4), zmodyfikowano].

w odpowiedzi na warunki pokarmowe stymuluje do działania zarówno czynniki pobudzające, jak i inhibitory adhezji oraz filamentacji *Candida* spp.

W zakażeniach odcewnikowych szczególnie istotne znaczenie w wirulencji szczepów *Candida* spp. ma zdolność tworzenia biofilmu. Biofilm *Candida* spp. to specyficzna struktura składająca się z komórek grzybów otoczonych zewnątrzkomórkowym śluzem, przylegających do powierzchni sztucznych, m.in. polimetakrylanu metylu, silikonu elastomerowego, polichlorku winylu (7, 8). Tworzenie się struktury biofilmu jest wielostopniowym i złożonym procesem, który opiera się głównie na adhezji komórek planktonicznych oraz wytworzeniu pozakomórkowej. Dojrzała forma biofilmu, w zależności od właściwości morfologicznych szczepu oraz warunków środowiska, składa się z komórek drożdżopodobnych i/lub strzępek (ryc. 2) (9-11). Do powstania dojrzałej złożonej formy biofilmu u *C. albicans* niezbędne są białko Efg1 oraz enzym N-acetyloglukozaminidaza – inicjujące tworzenie strzępek (4, 12). Wśród czynników etiologicznych fungemii odcewnikowych najwyższą zdolność do produkcji biofilmu posiadają szczepy z gatunków innych niż *C. albicans*, w szczególności gatunek *C. parapsilosis*. Grzyby tworzące strukturę biofilmu są odporne na wiele leków przeciwgrzybiczych. Lekooporność biofilmów *Candida* spp. jest związana z bardzo rozwiniętą komunikacją międzykomórkową odbywającą się wewnątrz tej struktury. Komunikacja ta zachodzi na drodze *quorum sensing* (3, 8). Obecnie trwają badania nad zastosowaniem inhibitorów *quorum sensing* jako substancji blokujących powstanie biofilmu. Alternatywą w terapii niszczącej strukturę biofilmu *Candida* spp. mogą być także inhibitory enzymów wpływających na transmisję β -1,3-glukanu do macierzy biofilmu. Glukany przeniesione ze ściany komórkowej do macierzy biofilmu mogą ograniczać penetrację leków do wnętrza tej struktury (13, 14). Zdolność budowania struktury biofilmu przez szczepy *Candida* spp. jest związana z aktywnością enzymatyczną grzybów. Do głównych, poznanych enzymów grzybów drożdżopodobnych zaliczamy: proteazy aspartylowe Sap (ang. *secreted aspartyl protease*), yapsinopodobne proteazy aspartylowe YPS (ang. *yapsin-like protease*), fosfolipazy, lipazy (Lip1-10), fosfomanoesterazę, N-acetyloglukozylaminidazę (NAG) oraz

α -glukozydazę (15, 16). Większość autorów w swoich pracach naukowych donosi o znaczącej roli proteaz w patogenezie zakażeń grzybiczych. Proteazy aspartylowe występują w komórkach *C. albicans* w postaci 10 izoenzymów. *C. parapsilosis* posiada proteazy kodowane przez geny *SAP1-2-3*, *C. tropicalis* geny *SAP1-4*, a *C. dubliniensis* – *SAP1-4*, *SAP7-10* (15, 16). Izoenzymy *Sap1-3* występują najczęściej w komórkach blastospor o zmniejszonej chorobotwórczości, najczęściej odpowiedzialnych jedynie za kolonizację nabłonka czy zakażenia błon śluzowych. Dowiedziono, że geny *SAP* ewoluowały i produkty ich ekspresji proteazy *Sap1-3* mogą być wydzielane przez szczepy *C. albicans* także w zakażeniach systemowych. Proteazy *Sap4-6* wytwarzane są przez formy strzępkowe o wysokiej zjadliwości, odpowiedzialne za kandydozy układowe (17). Prawdopodobnie proteazy *Sap5-8* mają znaczenie w tworzeniu biofilmu. Produkty genu *SAP7* mogą mieć szczególny wpływ na wirulencję szczepów wywołujących zakażenia wewnątrznaczyniowe. Szczepy *C. glabrata* posiadają geny *YPS* kodujące 11 proteaz yapsinopodobnych *Yps1-11*. Proteazy *Yps* odgrywają znaczącą rolę w utrzymywaniu integralności ściany komórkowej podczas zmiany fenotypowej szczepów *C. glabrata* (18).

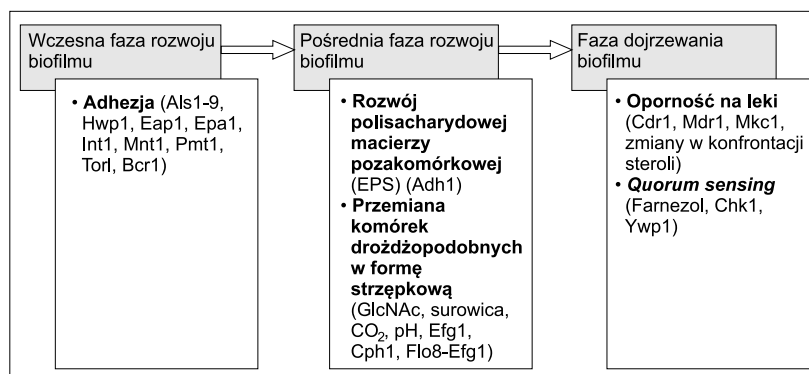
CEL PRACY

Celem badań retrospektywnych była ocena fenotypowych i genotypowych cech szczepów *Candida* spp. izolowanych od chorych z podejrzeniem fungemii odcewnikowych. Chorzy hospitalizowani byli w Centralnym Szpitalu Klinicznym w Warszawie przy ul. Banacha w latach 2005-2009.

MATERIAŁ I METODY

Analizie poddano 90 szczepów *Candida* spp. pochodzących od 30 chorych (10 kobiet, 20 mężczyzn) hospitalizowanych w oddziałach CSK. Szczepy wyizolowano z 86 materiałów klinicznych, w tym 38 próbek krwi obwodowej, 22 próbek krwi z cewników naczyniowych oraz 26 fragmentów cewników naczyniowych (centralnych i obwodowych).

Hodowlę próbek krwi prowadzono na płynnych pożywkach transportowo-wrostowych w systemie BacT/Alert w temperaturze 37°C (bioMérieux). Fragmenty cewników naczyniowych posiewano na podłoża wzro-



Ryc. 2. Fazy rozwoju biofilmu *C. albicans* [wg (10), zmodyfikowano].

stowe metodą Maki oraz metodą Brun-Bruissson. Hodowlę grzybów prowadzono na podłożu Sabourauda w temperaturze 30°C. Przynależność gatunkową grzybów drożdżopodobnych oznaczano z zastosowaniem podłoża chromogenne CHROMagar *Candida* (bioMérieux) oraz testu biochemicznego API ID32C (bioMérieux) opartego o asymilację substratów węglowodanowych.

Charakterystyka fenotypowa *Candida* spp. obejmowała ocenę aktywności enzymatycznej szczepów oraz ocenę ich zdolności do tworzenia struktury biofilmu. Aktywność proteolityczną szczepów *Candida* spp. określano metodą płytkową przy użyciu podłoża Staiba z suplementem 10% albuminy. Sekrecję proteaz oceniano na podstawie proteolizy powstałej wokół kolonii grzybów w trakcie inkubacji hodowli, w skali: „++++” 24 godz. inkubacji, „+++” 48 godz., „++” 72 godz., „+” > 72 godz., „-” > 7 dni inkubacji. Sekrecję lipaz przez szczepy *Candida* spp. wykrywano na podłożu Wernera z suplementem 8% emulsji żółtka jaja kurzego – źródła lecytyny. Reakcję rozkładu lecytyny oceniano na podstawie strefy opalescencji w podłożu wzrostowym w czasie inkubacji, w skali: „++++” 24 godz. inkubacji, „+++” 48 godz., „++” 72 godz., „+” > 72 godz., „-” > 7 dni inkubacji. Sekrecję enzymów hydrolitycznych przez badane szczepy *Candida* spp. określono przy użyciu półilościowej metody API ZYM (bioMérieux). W teście API ZYM zastosowano mikrostudzienki zawierające substraty dla 19 reakcji enzymatycznych, wykrywających enzymy należące do czterech grup: esterazy, glikozydazy, peptydazy, ureazy. Wynikiem testu był kolorymetryczny odczyt ilości zhydrolizowanego substratu wyrażony w nanomolach, zgodnie ze skalą punktową: 0 – 0 nmol, 1 – 5 nmol, 2 – 10 nmol, 3 – 20 nmol, 4 – 30 nmol, 5 – > 40 nmol. W oparciu o wykryte enzymy dokonano biotypowania szczepów *Candida* spp. zgodnie z klasyfikacją Kurnatowskiej (19).

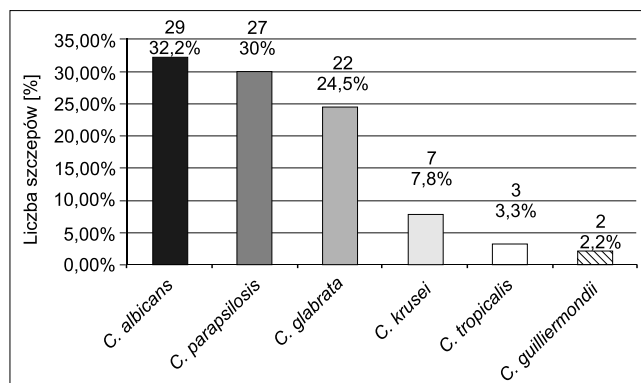
Do oceny zdolności tworzenia biofilmu przez szczepy *Candida* spp. zastosowano metodę spektrofotometryczną opisaną przez Shina i wsp. (14). Badanie przeprowadzono w mikrostudzienkach płytki titracyjnej. Zawiesiny badanych szczepów (0,5 w skali McFarlanda) inkubowano w płynnym podłożu Sabourauda z suplementem 8% glukozy w temperaturze 37°C przez 24 godz. Wynikiem badania był pomiar transmitancji (T blok) próbek, określający punktową zdolność tworzenia biofilmu w skali: 0 dla T blok < 5, 1+ dla T blok 5-20, 2+ dla T blok 20-35, 3+ dla T blok 35-50 oraz 4+ dla T blok > 50.

Charakterystyka genotypowa szczepów *Candida* spp. opierała się na wykrywaniu genów kodujących wybrane czynniki wirulencji grzybów. DNA genomowe grzybów izolowano zgodnie z protokołem zestawu izolacyjnego GeneMatrix (Eurx) z 3-dniowej hodowli szczepów *Candida* spp. w 1,5 ml płynnego podłoża Sabourauda bez dodatku antybiotyków. Detekcja wybranych genów kodujących proteazy grzybicze wykonana została w oparciu o reakcję PCR (*ang. po-*

limerase chain reaction). Analizowano występowanie genów: *SAP1-3*, *SAP4*, *SAP5*, *SAP6* i *EFG1* dla szczepów *C. albicans*, *SAP3* dla szczepów *C. parapsilosis* oraz *YPS2*, *YPS4*, *YPS6* dla szczepów *C. glabrata*. Mieszanki reakcyjne sporządzono zgodnie z protokołem zestawu PCR (Sigma) z użyciem polimerazy RedTaq Genomic DNA (Sigma). Amplifikację reakcji prowadzono w termocyklerze Engine (MJ Research) w zoptymalizowanych warunkach: dla genów *SAP* 95°C-5', 30 cykli 95°C-30'', 49°C-45'', 72°C-1', 72°C-5'; dla genu *EFG1* 95°C-5', 30 cykli 95°C-1', 51°C-1', 72°C-1', 72°C-5'; dla genów *YPS* 95°C-5', 30 cykli 95°C-1', 54°C-45'', 72°C-1', 72°C-5'.

WYNIKI

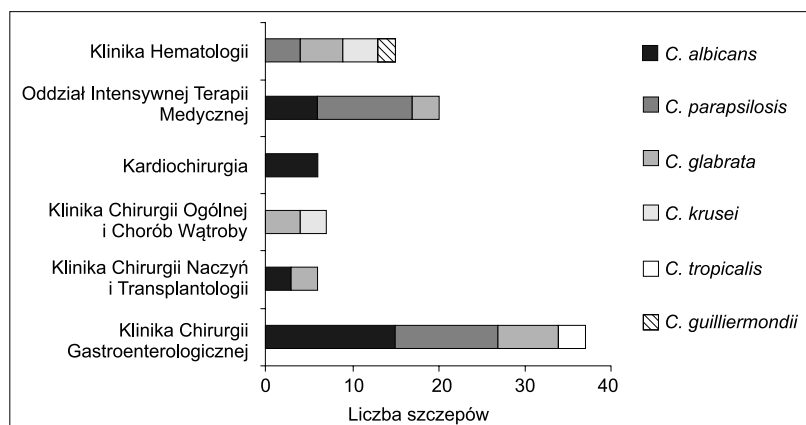
W badanym okresie w CSK stwierdzono 8877 wyników badań z dodatnim posiewem mikologicznym. Wyhodowano 9725 szczepów grzybów, z czego 308 (3,16%) stanowiły izolaty z próbek krwi oraz fragmentów cewników naczyniowych. Badaniami fenotypowymi i genotypowymi objęto 90 szczepów *Candida* spp. należących do gatunków: *C. albicans* – 29 (32,2%), *C. parapsilosis* – 27 (30%), *C. glabrata* – 22 (24,5%), *C. krusei* – 7 (7,8%), *C. tropicalis* – 3 (3,3%) oraz *C. guilliermondii* – 2 (2,2%) (ryc. 3).



Ryc. 3. Spektrum gatunkowe czynników etiologicznych fungemii odcewnikowych.

Najwięcej szczepów izolowano od chorych hospitalizowanych w Klinice Chirurgii Gastroenterologicznej – 37 (41%), Oddziale Intensywnej Terapii Medycznej – 20 (22,2%) oraz Oddziale Hematologii – 15 szczepów (16,7%) (ryc. 4).

Fenotypowa charakterystyka szczepów *Candida* spp. obejmowała ich aktywność enzymatyczną. Sekrecję proteaz wykazywało 68 (76%) badanych szczepów. Najwyższy stopień aktywności proteolitycznej (++++) określono dla szczepów: *C. albicans* – 8 (27,7%) szczepów, *C. parapsilosis* – 8 (29,6%), *C. glabrata* – 2 (9,1%) (tab. 1). Żaden szczep *Candida* spp. nie wykazywał aktywności lipolitycznej. Aktywność enzymów hydrolitycznych oceniono najwyżej dla szczepów *C. albicans*, następnie *C. parapsilosis* i *C. glabrata*. *C. albicans* wykazywały wysoką aktywność enzymatyczną (> 40 nmol) N-acetylo-β-glukozaminidazy (EXVIII) – 100% szczepów (ryc. 5). W oparciu o wyniki sekre-



Ryc. 4. Dystrybucja szczepów *Candida* spp. w oddziałach CSK.

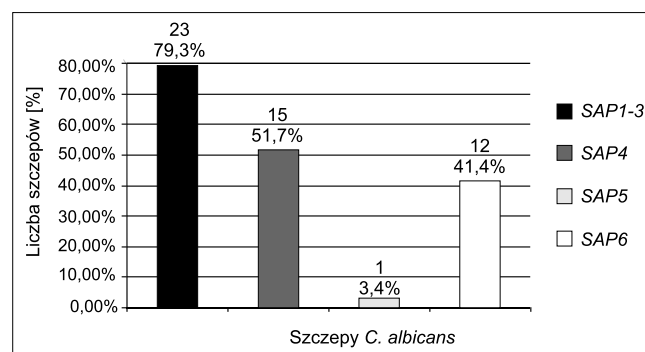
cji hydrolaz szczepu *C. albicans* zaliczono głównie do biotypów A – 10 (34,5%) oraz B – 10 (34,5%). Szczepy *C. parapsilosis* odznaczały się wysoką aktywnością (> 40 nmol) α -glukozydazy (EXVI) – 51,9% (tab. 1). Fenotypowa ocena badanych szczepów obejmowała ocenę ich zdolności do tworzenia struktury biofilmu. 58 (64,3%) szczepów *Candida* spp. wykazywało zdolność wzrostu w postaci biofilmu. Najwyższa zdolność tworzenia struktury biofilmu charakteryzowała szczepy *C. parapsilosis* – 13 (48%) (tab. 2).

Tabela 1. Aktywność hydrolaz N-acetylo- β -glukozaminidazy i α -glukozydazy szczepów *Candida* spp.

<i>C. albicanus</i> – N-acetylo-β-glukozaminidaza (NAG) > 40 nmol – 100% szczepów
<i>C. parapsilosis</i> – α-glukozydaza > 40 nmol – 51,9% 30 nmol – 22,1% 20 nmol – 7,4% 10 nmol – 7,4% 5 nmol – 3,7% Brak wydzielania enzymu – 7,4%

Charakterystyka genotypowa szczepów *Candida* spp. obejmowała geny kodujące czynniki wirulencji. Detekcja genów proteaz aspartylowych szczepów *C. albicans* wynosiła: 23 (79,3%) izolaty – SAP1-3, 15 (51,7%) – SAP4, 12 (41,4%) – SAP6, 1 (3,4%) – SAP5 (ryc. 5).

6 (20,7%) szczepów *C. albicans* wykazywało delecję wszystkich analizowanych genów SAP. Wszystkie analizowane izolaty *C. albicans* posiadały gen *EFG1*. Gen *SAP3* posiadało 20 (74%) szczepów *C. parapsilosis*. 20 (90,9%) szczepów *C. glabrata* posiadało geny *YPS2* i *YPS4*, 19 (86,4%) gen *YPS6* (ryc. 5).



Ryc. 5. Detekcja genów SAP szczepów *C. albicans*.

DYSKUSJA

Główne czynniki etiologiczne fungemii odcewnikowych stanowiły szczepy: *C. albicans*, *C. parapsilosis* oraz *C. glabrata*. Takie spektrum gatunkowe *Candida* spp. w zakażeniach odcewnikowych

Tabela 2. Aktywność proteolityczna szczepów *Candida* spp. oraz ich zdolność do tworzenia biofilmu.

Szczep	Stopień aktywności proteolitycznej					Punktowa zdolność wytwarzania biofilmu				
	-	+	++	+++	++++	-	+	++	+++	++++
<i>C. albicans</i>	6 (20,7%)	9 (31%)	3 (10,3%)	3 (10,3%)	8 (27,7%)	14 (48,3%)	12 (41,4%)	3 (10,3%)	-	-
<i>C. parapsilosis</i>	8 (29,6%)	4 (14,8%)	6 (22,3%)	1 (3,7%)	8 (29,6%)	5 (19%)	6 (22%)	-	3 (11%)	13 (48%)
<i>C. glabrata</i>	1 (4,5%)	8 (36,4%)	11 (50%)	-	2 (9,1%)	8 (37%)	8 (37%)	6 (27%)	-	-
<i>C. krusei</i>	7 (100%)	-	-	-	-	2 (28,6%)	2 (28,6%)	1 (14,2%)	2 (28,6%)	-
<i>C. tropicalis</i>	-	-	-	-	3 (100%)	1 (33,3%)	2 (66,7%)	-	-	-
<i>C. guilliermondii</i>	-	2 (100%)	-	-	-	2 (100%)	-	-	-	-
Ogółem	22 (24%)	68 (76%)				32 (35,7%)	58 (64,3%)			

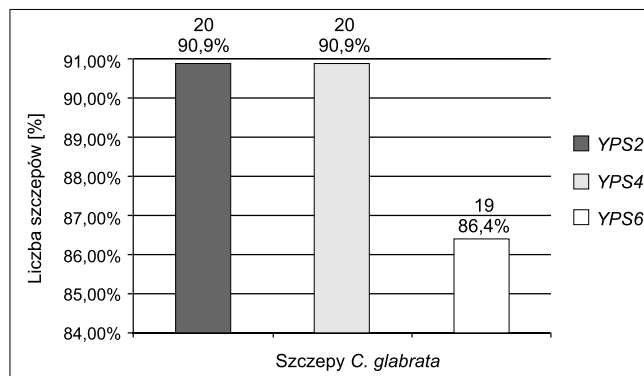
potwierdzają wyniki badań innych autorów, m.in. Giri i Kindo (20). W badaniach własnych aż 30% wyhodowanych szczepów stanowił gatunek *C. parapsilosis*. Z badań Almirante i wsp. wynika, że wśród wszystkich szczepów *C. parapsilosis* izolowanych od chorych aż 51% stanowią szczepy pochodzenia odcewnikowego (21). Inni autorzy potwierdzają, że wewnątrznaczyniowy cewnik stanowi w 97% przypadków istotne ryzyko zakażenia szczepem *C. parapsilosis* (22).

Aktywność proteolityczną wykazano dla 76% grzybów izolowanych z fungemii odcewnikowych. Proteazy szczepów *C. albicans* oraz *C. parapsilosis* charakteryzowały się najwyższą aktywnością (> 40 nmol). Podobne obserwacje opisali autorzy Mohan das i Ballal, którzy stwierdzili, że 75% szczepów *C. albicans* wytwarza proteazę (23). W badaniach własnych szczepy *C. albicans* oraz inne gatunki z rodzaju *Candida* nie wykazywały aktywności lipolitycznej. Brak sekrecji lipaz nie wpływa jednak na niższy potencjał wirulencji tych izolatów. Z badań autorów wynika, że lipazy nie biorą udziału w transmisji blastospor w formę strzępkową (23). W przemianie morfologicznej szczepów *Candida* spp. istotną rolę odgrywa N-acetylo- β -glukozaminidaza (NAG) – EXVIII. Wszystkie izolaty *C. albicans* uwalniały N-acetylo- β -glukozaminidazę (NAG), co może sugerować zdolność tych szczepów do przemiany z formy drożdżopodobnej do strzępkowej. Wysoka aktywność N-acetylo- β -glukozaminidazy jest wyrazem oddziaływania komórek grzybów na układ odpornościowy m.in. poprzez hamowanie migracji neutrofilów do ognisk zapalnych (24).

Aktywność α -glukozydazy (EXVI) stanowi kolejną cechę fenotypową wpływającą na wirulencję grzybów, szczególnie *C. albicans* i *C. parapsilosis*. Enzym ten uwalniany jest przez formy inwazyjne grzybów, bierze udział w procesie glikozylacji białek oraz ma znaczenie dla prawidłowej budowy ściany komórkowej *C. albicans*. Autorka Dąbkowska w swoich badaniach wykazała, że aktywność α -glukozydazy w komórkach *C. albicans* wzrasta w trakcie rozwoju zakażenia od poziomu 5 nmoli do poziomu 40 nmol (24). W badaniach własnych wysoką aktywność (> 40 nmol) tego enzymu opisano dla szczepów *C. parapsilosis*, co można sugerować ich znaczną wirulencję. Szczepy *C. albicans* sklasyfikowano głównie jako biotyp A i B. Szczepy *C. albicans* izolowane od tego samego chorego wykazywały zmianę biotypów. Szczepy początkowo należące do biotypu B uznano za bardziej wirulentny, stopniowo traciły aktywność również niektórych enzymów, zwłaszcza EXVI i EXVIII, zmieniając biotyp na C4→C6→D1→D3. Wiązało się to z utratą zjadliwości i nabywaniem cech szczepów kolonizujących.

Aktywność proteolityczna szczepów *Candida* spp. może być powiązana ze zdolnością tych szczepów do budowania struktury biofilmu. Szczepy *C. parapsilosis* wykazujące w najwyższym stopniu zdolność tworzenia biofilmu, wprost proporcjonalnie wydzielają proteazy (tab. 3). Podobne wyniki uzyskali badacze Tavanti i wsp. dla szczepów *C. parapsilosis*. Zaobserwowali oni

zależność pomiędzy wysoką zdolnością tworzenia biofilmu i wysoką sekrecją enzymów proteolitycznych (16). W badaniach własnych szczepy *C. albicans* tworzące biofilm wykazywały niską sekrecję proteaz (tab. 3). W badaniach autorów Ramage i wsp. odkryto podobną korelację występowania proteaz i genów *SAP* w biofilmach *C. albicans* (8). W badaniach własnych obserwowano niską detekcję genów *SAP* *C. albicans*, w szczególności *SAP4-5-6*. Wyniki badań, a także doniesienia innych autorów podkreślają zmniejszającą się rolę proteaz aspartylowych w wirulencji szczepów *C. albicans* (8). Potwierdzają to m.in. badania Jayatilake'a i wsp., w których mutanty *C. albicans* pozbawione genów *SAP1-3*, *SAP4-6* były zdolne do wytwarzania strzępkowych form inwazyjnych oraz do zakażenia tkanek w ciągu 48 godz. (25). Tworzenie form inwazyjnych i struktury biofilmu przez szczepy *C. albicans* jest związane także z czynnikiem Efg1. Aktywacja czynnika Efg1 może być powiązana z proteazami aspartylowymi. W badaniach własnych detekcja genu *SAP5* we wszystkich badanych izolatach *C. albicans* posiadających gen *EFG1* była niewielka. Szczepy *C. albicans* prawdopodobnie wytwarzały wczesną fazę biofilmu. Wykrycie genów *YPS* w szczepach *C. glabrata* wynosiło 86,4% (ryc. 6). Wysoki odsetek genów *YPS2* i *YPS6* może być związany z wysoką zjadliwością izolatów *C. glabrata*. Podobne wyniki badań uzyskali autorzy Kaur i wsp. Badacze uznali, że ekspresja genów *YPS2* i *YPS4* wpływa najsilniej ze wszystkich proteaz *C. glabrata* na wirulencję szczepów i aktywację makrofagów (26).



Ryc. 6. Detekcja genów *YPS* szczepów *C. glabrata*.

Tabela 3. Zależności pomiędzy czynnikami wirulencji szczepów *Candida* spp.

<i>C. albicans</i> Proteaza↓, <i>SAP</i> ↓, NAG↑, <i>EFG1</i> ↑ = Biofilm↑
<i>C. parapsilosis</i> Proteaza↑, <i>SAP</i> ↑, EXVI↑ = Biofilm↑
<i>C. glabrata</i> Proteaza↑, <i>YPS</i> ↑ = Biofilm↑

WNIOSKI

1. Szczepy *C. albicans*, *C. parapsilosis* i *C. glabrata* stanowiły dominujące czynniki etiologiczne fungemii odcewnikowych.
2. Szczepy *C. albicans* wykazywały odwrotną zależność między aktywnością proteaz a wzrostem w postaci biofilmu.

3. Szczepki *C. parapsilosis* wykazywały wyższą zdolność tworzenia biofilmu w porównaniu do izolatów *C. albicans*.
4. Efg1 oraz N-acetylo- β -glukozaminidaza stanowią istotne czynniki zjadliwości szczepów

C. albicans w aspekcie zdolności tworzenia biofilmu.

5. Proteazy aspartylowe (Sap) odgrywały zmniejszoną rolę w wirulencji szczepów *C. albicans*.

PIŚMIENNICTWO

1. Fernandez J, Erstad BL, Petty W, Nix DE: Time to positive culture and identification for *Candida* blood stream infections. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; 64(4): 402-407.
2. Sulik-Tyszka B, Netsvetyayeva I, Jarzynka S et al.: Inwazyjne zakażenia grzybicze – nowe możliwości terapeutyczne. *Zakażenia* 2010; 10: 62-69.
3. Lim CS, Rosli R, Seow HF, Chong PP: *Candida* and invasive candidiasis: back to basics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31(1): 21-31.
4. Huang G: Regulation of phenotypic transitions in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Virulence* 2012; 3(3): 251-261.
5. Krutkiewicz A: Czynniki chorobotwórczości *Candida albicans*. *Mikol Lek* 2010; 17: 134-137.
6. Bastidas RJ, Heitman J, Cardenas ME: The protein kinase Tor1 regulates adhesin gene expression in *Candida albicans*. *PLoS Pathog* 2009; 5(2): e1000294.
7. Różalska B, Sadowska B: Zapobieganie powstawaniu biofilmów – perspektywiczne strategie ich eradykacji. *Sepsis* 2010; 3(2): 71-78.
8. Ramage G, Coco B, Sherry L et al.: *In vitro* *Candida albicans* biofilm induced proteinase activity and SAP8 expression correlates with *in vivo* denture stomatitis severity. *Mycopathologia* 2012; 174(1): 11-19.
9. Trofa D, Gacser A, Nosanchuk JD: *Candida parapsilosis* an Emerging Fungal Pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21: 606-625.
10. Blankenship R, Mitchell A: How to build a biofilm: a fungal perspective. *Current Opinion in Microbiology* 2006; 9: 588-594.
11. Cuéllar-Cruz M, López-Romero E, Villagómez-Castro JC, Ruiz-Baca E: *Candida* species: new insights into biofilm formation. *Future Microbiol* 2012; 7(6): 755-771.
12. Yi S, Sahni N, Daniels KJ et al.: Alternative mating type configurations (α/α versus α/a or α/α) of *Candida albicans* result in alternative biofilms regulated by different pathways. *PLoS Biol* 2011; 9(8): e1001117.
13. Taff HT, Nett JE, Zarnowski R et al.: *Candida* biofilm-induced pathway for matrix glucan delivery: implications for drug resistance. *PLoS Pathog* 2012; 8(8): e1002848.
14. Shin JH, Kee S, Shin MG, Kim SH: Biofilm Production by Isolates of *Candida* Species Recovered from Nonneutropenic Patients: Comparison of Bloodstream Isolates with Isolates from Other Sources. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1244-1248.
15. Parra-Ortega B, Cruz-Torres H, Villa-Tanaca L, Hernández-Rodríguez C: Phylogeny and evolution of the aspartyl protease family from clinically relevant *Candida* species. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104(3): 505-512.
16. Tavanti A, Hensgens LA, Mogavero S et al.: Genotypic and phenotypic properties of *Candida parapsilosis sensu stricto* strains isolated from different geographic regions and body sites. *BMC Microbiol* 2010; 10: 203.
17. Gültekin B, Eyigör M, Tiryaki Y et al.: Investigation of antifungal susceptibilities and some virulence factors of *Candida* strains isolated from blood cultures and genotyping by RAPD-PCR. *Mikrobiyol Bul* 2011; 45(2): 306-317.
18. Ferrari S, Sanguinetti M, De Bernardis F et al.: Loss of mitochondrial functions associated with azole resistance in *Candida glabrata* results in enhanced virulence in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55(5): 1852-1860.
19. Kurnatowska AJ: Activity of hydrolytic enzymes of *Candida albicans* strains isolated from patients with periodontal and membrane mucosae of oral cavity diseases. *Mycopathologia* 1998; 141(2): 105-109.
20. Giri S, Kindo AJ: A review of *Candida* species causing blood stream infection. *Indian J Med Microbiol* 2012; 30: 270-278.
21. Almirante B, Rodríguez D, Cuenca-Estrella M et al.: Epidemiology, risk factors, and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol* 2006; 44(5): 1681-1685.
22. Alvarez FJ, Konopka JB: Identification of an N-acetylglucosamine transporter that mediates hyphal induction in *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* 2007; 18(3): 965-975.
23. Mohan das V, Ballal M: Proteinase and phospholipase activity as virulence factors in *Candida* species isolated from blood. *Rev Iberoam Micol* 2008; 25(4): 208-210.
24. Dąbkowska M: Badanie aktywności enzymatycznej szczepów *Candida albicans* izolowanych z materiałów klinicznych biorcy nerki. *Mikol Lek*, List do redakcji 2007; 14(1): 73-74.
25. Jayatilake JA, Samaranyake YH, Cheung LK, Samaranyake LP: Quantitative evaluation of tissue invasion by wild type, hyphal and SAP mutants of *Candida albicans*, and non-*albicans* *Candida* species in reconstituted human oral epithelium. *J Oral Pathol Med* 2006; 35(8): 484-491.
26. Kaur R, Ma B, Cormack BP: A family of glycosylphosphatidylinositol-linked aspartyl proteases is required for virulence of *Candida glabrata*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(18): 7628-7633.

otrzymano/received: 17.02.2015
zaakceptowano/accepted: 11.03.2015